

GEDIENDSON RIBEIRO DE ARAUJO

COLETA FARMACOLÓGICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
GRANDES FELINOS, MANTIDOS EM CATIVEIRO E CAPTURADOS EM
VIDA LIVRE COM O USO DE ARMADILHAS DE LAÇO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A663c
2016

Araujo, Gediendson Ribeiro de, 1981-
Coleta farmacológica e criopreservação de sêmen de grandes felinos, mantidos em cativeiro e capturados em vida livre com o uso de armadilhas de laço : reprodução assistida em onças pintadas e onças pardas / Gediendson Ribeiro de Araujo. - Viçosa, MG, 2016.
x, 81f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Tarcizio Antônio Rêgo de Paula.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Onça-pintada - Reprodução. 2. Suçuarana - Reprodução. 3. Onça-pintada - Inseminação artificial. 4. Suçuarana - Inseminação artificial. 5. Biotecnologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 599.7524

GEDIENDSON RIBEIRO DE ARAUJO

COLETA FARMACOLÓGICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
GRANDES FELINOS, MANTIDOS EM CATIVEIRO E CAPTURADOS EM
VIDA LIVRE COM O USO DE ARMADILHAS DE LAÇO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA:

Antônio Carlos Csermak Júnior

Deiler Sampaio Costa

José Domingos Guimarães

Thyara de Deco Souza e Araujo
(Coorientadora)

Tarcízio Antônio Rego de Paula
(Orientador)

À minha amada esposa Thyara, meu porto seguro e inspiração.

Dedico.

“Quem acredita sempre alcança.”

Renato Russo

GRADECIMENTOS

Como passou rápido!!!! Foram quatro anos intensos, uma mistura de aprendizado com realização de sonhos. Essa Tese não seria possível sem o trabalho em equipe e a generosidade de muitas pessoas.

Agradeço primeiramente a Deus pelos livramentos, por todas as portas abertas e por ter colocado pessoas especiais em minha vida durante esses anos.

Aos meus pais, Gediel e Lana, que sempre oraram, torceram e nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. Mama e papa muito obrigado por tudo! Os senhores sempre foram e serão meus maiores exemplos. Amo vocês!!!!

Aos meus irmãos (Gediel Jr, Gedielson, Gedilana, Géssica, Gean, Gabriel, Gabriela, Geovana e Guilherme) por todo amor e por sempre torcerem por mim.

Aos meus sogros, Dona Fátima e Sr. Márcio, por todo carinho e apoio.

A todos os meus familiares, avô, avó, tios, tias, primos, primas, cunhados, cunhadas e sobrinhos por todo os momentos de alegria e amizade.

Ao meu afilhado Emmanuel que mesmo ainda sem entender o que faço, me dá energia para ser um bom exemplo de ser humano.

Em especial à minha esposa Thyara. Morena, não tenho palavras para expressar o meu amor e gratidão por você!!!! Agradeço todos os dias a Deus por ter colocado você em minha vida. Sem o teu amor, abdicção, paciência, orientação e mais paciência não teríamos chegado até aqui. Obrigado!!!

Ao meu orientador e amigo Tarcízio A. R. de Paula que sem saber, foi o responsável pela minha escolha de sair da UFERSA para fazer a graduação na UFV. Muito obrigado pelos ensinamentos sobre animais silvestres e por acreditar e confiar em mim.

Ao amigo Ronaldo Morato que abriu as portas para que hoje eu pudesse trabalhar com onças pintadas em vida livre, e que sem o seu apoio essa tese não seria possível.

Ao amigo Eduardo Mantovani por todo apoio e ensinamentos em telemetria.

Ao mestre Peter Crawshaw pela amizade e grande oportunidade em trabalhar com esse que é a referência em conservação de onças no Brasil. Muito obrigado Peter e que venham outros campos!

Aos membros da banca Deiler, JD, Eduardo Paulino, Ronaldo Morato, Cláudio, Antônio Carlos Csermak Jr e Thyara, que gentilmente aceitaram o convite para participarem da banca.

Aos amigos do projeto Suçuarana na Serra do Brigadeiro (Carlão, Leanes, Letícia, Mão, Magaldi, Fernanda, Anderson, Marcos, Sara, Jessica, Letícia, Saulo). Obrigado pelos momentos alegres e difíceis que passamos. Sei que foi um grande aprendizado para todos nós!

Ao Leanes e Carlão pela grande ajuda nas capturas e apoio logístico em Viçosa durante a reta final do doutorado. Espero que a parceria nas capturas nunca acabe!!!.

Aos amigos do CETAS (Priscila, Juliano, Moacir, Marcos, Dudu, Thaiz, Graziela, Vinícius, Milene, Fernandinha e aos demais estagiários) pelo aprendizado e compartilhamento dos ensinamentos com silvestres.

Aos amigos do REPASS Lina, Leanes, Letícia, Milene, Mayra, Graziela, Vinícius, Fernandinha, Soraia, Moema, Marcelo e os estagiários por toda a ajuda nas atividades diárias do laboratório de reprodução.

Ao CENAP nas pessoas do Ronaldo Morato, Rose, Rogério, Bia, Paulão, Mirão, Ricardo, Henrique, Danianderson e Geori, pela oportunidade de ter contribuído junto com vocês na conservação dos felinos silvestres.

Aos amigos que conheci durante os campos e que contribuíram grandemente nesse trabalho, em especial a Selma, Daniel, Tadeu, João Leite e Mayke.

À secretaria da Pós-graduação da Veterinária por todo apoio e orientação durante as dúvidas que não foram poucas. Muito obrigado Rosi e Bete!!!

Aos animais domésticos e as onças, que tive o privilégio de conviver durante esses anos e que sem dúvida acrescentaram em minha vida pessoal e profissional. Em especial ao Jaguar, nosso cão de faro de fezes de onças, pelo companheirismo e dedicação ao trabalho de campo. Também não posso esquecer de citar as onças pintadas Soneca, Lampião, Wendy, Alice e Sossego, que apesar do contato momentâneo, contribuíram grandemente na minha escolha de continuar trabalhando na conservação dos felinos silvestres.

À Capes pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao CNPq e FAPEMIG pelos financiamentos do projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Referências Bibliográficas	3
2. CAPÍTULO 1: USO DA ARMADILHA DE LAÇO NA CAPTURA DE GRANDES FELINOS EM DIFERENTES BIOMAS BRASILEIROS	7
2.1. Introdução	9
2.2. Material e Métodos	11
2.3. Resultados	19
2.4. Discussão	21
2.5. Conclusão	28
2.6. Referências Bibliográficas	28
3. CAPÍTULO 2: USO DA MEDETOMIDINA NA COLETA DE SÊMEN DE GRANDES FELINOS MANTIDOS EM CATIVEIRO E VIDA LIVRE	32
3.1. Introdução	34
3.2. Material e Métodos	35
3.3. Resultados	38
3.4. Discussão	44
3.5. Conclusão	49
3.6. Referências Bibliográficas	50
4. CAPÍTULO 3: MODIFICAÇÃO NA ETAPA DE RESFRIAMENTO VISANDO O CONGELAMENTO DE SÊMEN DE GRANDES FELINOS A CAMPO	56
4.1. Introdução	58
4.2. Material e Métodos	59
4.3. Resultados	65
4.4. Discussão	69
4.5. Conclusão	74
4.6. Referências Bibliográficas	74
5. CONCLUSÕES GERAIS	81

RESUMO

ARAUJO, Gediendson Ribeiro de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Coleta farmacológica e criopreservação de sêmen de grandes felinos mantidos em cativeiro e capturados em vida livre com o uso de armadilhas de laço.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Coorientadora: Thyara de Deco Souza e Araujo.

Os principais desafios na criopreservação de sêmen de felinos de vida livre são desenvolver ou aprimorar uma metodologia eficiente na captura de indivíduos, desenvolver uma técnica mais prática e eficiente na coleta de sêmen com boa qualidade para criopreservação, e também desenvolver equipamentos de resfriamento e congelamento que sejam portáteis e que dispensem o uso de energia elétrica. Objetivou-se, portanto, por meio do presente trabalho adaptar uma metodologia de coleta farmacológica de sêmen e de um método de criopreservação de sêmen de onças pintadas e onças pardas que sejam viáveis para animais de vida livre, capturados por armadilhas de laço. Foram usadas armadilhas de laço compostas por um sistema catapulta, um sistema de contenção e um sistema de monitoramento, nas quais foram realizadas adaptações para melhor adaptação da técnica a três biomas brasileiros Caatinga, Pantanal e Mata Atlântica. O presente trabalho foi o primeiro a capturar onças pintadas e pardas na Caatinga, sendo que a unidade de avaliação do esforço de captura foi “laços-dia”, ou seja, o número de laços armados ao dia que resultou na captura de um animal. O esforço para captura de onça pintada foi de 30,3, 212,5 e 351 laços-dia/captura para o Pantanal, Caatinga e Mata Atlântica, respectivamente. Possivelmente a baixa taxa de captura na Mata Atlântica se deu pela soma de dois fatores: a baixa densidade populacional e a topografia da região, que limitou a área de captura. O mesmo não foi observado para a onça parda neste bioma, cujo esforço de captura foi de 144 laços-dia/captura, possivelmente devido à maior densidade desta espécie. O sucesso de captura (eventos de captura/dias de campanha) de onça pintada foi semelhante ao obtido por trabalhos que usaram cães farejadores, porém essa metodologia exige a manutenção de uma matilha treinada, além de conferir maior risco de acidentes tanto para o animal, quanto para a equipe. Para o estudo da coleta farmacológica de sêmen três onças pardas (*Puma concolor*) de cativeiro e onze onças pintadas (*Panthera onca*), sendo seis mantidas em cativeiro e cinco de vida livre, foram anestesiadas com a associação de Medetomidina (0,08-0,1 mg/kg) e Ketamina (5 mg/Kg). Passados entre 20 e 40 minutos da indução

anestésica a uretra dos animais foi sondada com uma sonda uretral estéril para gatos, por onde foi possível coletar ejaculado em todos os animais. Por meio desta técnica coletou-se em média 106,7 μL de sêmen nas onças pardas contendo $524,1 \times 10^6$ /mL e 347,2 μL nas onças pintadas contendo $2635,2 \times 10^6$ espermatozoides / mL. As avaliações de vigor, motilidade e patologia espermática demonstraram que a técnica não afeta a qualidade do sêmen em relação às demais metodologias usadas em felinos. Para o congelamento do sêmen foram utilizados animais mantidos em cativeiro (seis onças pintadas e três onças pardas). A etapa de resfriamento foi dividida em dois tratamentos, um com a metodologia convencional como uso de gelo e água (Resfriamento A) e a outra com material refrigerante reciclável congelado em nitrogênio líquido (Resfriamento B). Os resultados das avaliações de rotina (vigor, motilidade e teste hiposmótico), com sondas fluorescentes e de análise computadorizada do sêmen demonstraram que não houve diferença entre os dois tratamentos testados. Por meio do presente estudo foi possível desenvolver metodologias que viabilizaram a criopreservação de sêmen de onças pintadas e onças pardas de vida livre. Portanto, o uso de armadilhas de laço associada à coleta farmacológica de sêmen por cateterização uretral, com medetomidina, e resfriamento usando gelo reciclável congelado em nitrogênio líquido mostrou-se eficiente e seguro nas atividades propostas.

ABSTRACT

ARAUJO, Gediendson Ribeiro de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Pharmacological collection and cryopreservation of semen from big felines kept in captive and captured in wild using foot snares.** Adviser: Tarcizio Antônio Rego de Paula. Co-adviser: Thyara de Deco Souza e Araujo.

The major challenges for developing assisted reproduction technologies in wild felines consist on: improve or even develop capture methodologies that are more practical and more efficient; develop new methodologies to collect great quality freezable semen; and develop portable freezing devices that can be used without electric energy. We aimed to adapt a pharmacological method for semen collection and a cryopreservation method that are more efficient for wild animals, captured through a foot snare trap. We used foot snare trap made with a catapult system, a restrain system and a tracking system, in which some adaptations were made for matching the technique to three biomes Caatinga, Pantanal and Atlantic Forest. This is the first jaguar and cougar capture report at Caatinga. The jaguar capture rate was 30.3, 212.5 and 351 snare-day/capture at Pantanal, Caatinga and Atlantic Forest, respectively. Possibly the low capture rate at Atlantic Forest was related to two factors: the low population density and the topography, which limited the capture area. However it was not observed for pumas at the same biome, whose capture rate was 144 snare-day/capture, possibly due to the higher density of this specie. The capture success (capture events/ expedition days) was similar to studies that used trailing hounds, however this method requires the maintenance of a trained pack, and confer increased risk for the animal and researchers. To study the pharmacological method for semen collection, three captive cougars and six captive and five wild jaguars were chemically restrained with a combination of medetomidine (0.08 to 0.1 mg/Kg) and Ketamine (5 mg/Kg). After the medetomidine administration – 20 to 40 minutes – the urethra was catheterized using a urinary tomcat catheter, through we could collect semen from all animals. Using this technique we could collect an average of 106.7 μ L containing 524.1 sperm/mL from the cougars and 347.2 μ L containing 2635.2 sperm/mL from the jaguars. The sperm motility, sperm progressive motility and sperm morphology analysis demonstrated that the methodology don't affect the sperm quality comparing with other technologies used in felines. To study the cryopreservation protocol we used only captive animals (six jaguars and three cougars). The cooling step was divided into two treatments, one

using a standardized method with ice and water (Cooling A) and the other one using a recyclable ice frozen in liquid nitrogen (Cooling B). All results from the routine analysis (sperm motility, sperm progressive motility, sperm morphology), the fluorescent probes and the computerized sperm analysis demonstrated that there was no difference between both treatments. Through this thesis it was possible to develop methodologies that make viable the semen cryopreservation from wild jaguars and cougars. For this purpose it is recommended the foot snare trap to capture the animals; in combination with the semen collection via urethral catheterization using a pharmacological method and the cryopreservation protocol using a recyclable ice frozen in liquid nitrogen at the cooling step.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os carnívoros possuem papel fundamental no equilíbrio dos ecossistemas onde ocorrem, porém devido a fatores como a caça e a redução e fragmentação do habitat, essas espécies estão sendo incluídas nas principais listas de animais ameaçados de extinção. Globalmente a onça pintada é listada como Quase Ameaçada “ Near Threatened ” (IUCN, 2010). No Brasil, a onça pintada e a onça parda estão listadas na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MMA, 2014). A conservação desses felinos depende de ações que visem reduzir sua vulnerabilidade, por meio de atuações na conservação *in situ* (promovendo a proteção de seus habitats e diminuindo a remoção de indivíduos na natureza) e *ex situ* (promovendo programas de educação ambiental e reprodução assistida). Essas ações estão definidas no Plano de ação nacional para a conservação da onça-pintada (PAN Onça Pintada, Portaria MMA nº 132, de 14 de dezembro de 2010) e o da onça parda (PAN Onça Parda, Portaria MMA nº 76, de 27 de junho de 2014) elaborado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) em parceria com pesquisadores especialistas na área. As ações recomendadas pelos PANs abrangem várias áreas de pesquisas, como comportamento territorial, sanidade, até pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas.

A grande parte dessas pesquisas necessita capturar indivíduos de vida livre e embora diversos métodos de captura estejam disponíveis para estudos com grandes felinos, a busca por métodos mais seguros e eficientes é uma constante (Jacques et al., 2009). Há uma carência de dados descritivos detalhados sobre essas diferentes metodologias de captura, e em especial de levantamentos das lesões decorrentes das diferentes técnicas, o que limita em muitos casos a definição do melhor risco - benefício. A divulgação desses dados, portanto é muito importante para auxiliar no desenvolvimento e aprimoramento de novas metodologias (Powell & Proulx, 2003). As principais metodologias de capturas utilizadas por pesquisadores de felinos selvagens são armadilhas do tipo gaiola e aciuamento por cães treinados (Schaller & Crawshaw, 1980). Essas metodologias além de causar riscos inerentes aos procedimentos de captura e contenção química possuem consideráveis desvantagens dependendo do tipo pesquisa a ser realizado.

Na busca de metodologias mais eficientes e mais seguras para a captura de grandes felinos começou-se a utilizar a armadilha de laço (Logan et al., 1999). Devido ao baixo custo, simplicidade e facilidade de manutenção, o laço é utilizado até os dias atuais, em alguns países, na captura de animais de interesse para comércio de pele, caça de subsistência e mesmo controle de animais problemáticos (Boddicker, 1982). Neste sentido, a partir de adaptações desenvolvidas visando a segurança do animal, esta metodologia vem sendo usada também para a captura de animais em projetos conservacionistas, em especial de felinos como: o Lince (*Lynx canadensis*; Mowat et al., 1994), o Puma (*Puma concolor*; Logan et al., 1999), o Tigre (*Panthera tigris*; Goodrich et al., 2001), o Leão (*Panthera leo*; Frank et al., 2003) e o Leopardo-das-neves (*Panthera uncia*; McCarthy et al., 2010). Recentemente, no Brasil essa metodologia vem sendo utilizada para a captura de onças pintadas e pardas, porém ainda necessita de adaptações para se adequar à realidade dos nossos biomas e do comportamento dos nossos felinos, tornando-a mais eficiente.

Outro ponto importante para a conservação dos felinos brasileiros, e que também é recomendado nos PANs, é o desenvolvimento de programas de reprodução assistida, com o objetivo de incrementar a variabilidade genética de populações. A dificuldade em se desenvolver essas tecnologias reprodutivas é claramente demonstrada quando avaliamos os artigos publicados em revistas científicas sobre o tema. Até o momento os trabalhos publicados com tecnologias reprodutivas em onças pintadas resumem-se a poucos artigos (Morato et al., 1998; Morato et al., 1999; Da Paz et al., 2000; Morato et al., 2001; Swanson et al., 2003; Da Paz et al., 2003; Morato et al., 2004; Da Paz et al., 2006; Da Paz et al., 2007), sendo que apenas um foi desenvolvido em animais de vida livre (Morato et al., 2001) e apenas três congelaram as amostras de sêmen, porém todas em animais de cativeiro (Da Paz et al., 2000; Swanson et al., 2003; Da Paz et al., 2007). No caso das onças pardas os dados são ainda mais escassos, com apenas um trabalho de criopreservação desenvolvido com esses animais no Brasil, todos mantidos em cativeiro (Deco-Souza et al., 2013).

Apesar do progresso nos estudos para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas em felinos silvestres os entraves em desenvolver tais tecnologias iniciam na dificuldade em se obter amostras representativas de sêmen, uma vez

que a metodologia da eletroejaculação, técnica amplamente utilizada, tem se mostrado pouco eficiente (Morato et al., 2001). Recentemente, a medetomidina, um sedativo alfa-2 agonista, vem sendo usado de forma promissora na coleta de sêmen de felinos. Esta metodologia já foi testada em gatos e leões africanos, possibilitando a obtenção de amostras concentradas de sêmen em animais anestesiados, dispensando o eletroejaculador e sem perda da qualidade espermática, sendo assim uma técnica promissora a ser aplicada nas demais espécies de felinos (Zambelli et al., 2008; Lueders et al., 2012).

Outro gargalo no desenvolvimento nos programas de reprodução assistida é a falta de metodologias de criopreservação de sêmen aplicáveis em animais de vida livre, principalmente devido à falta de energia elétrica em muito dos locais de captura. Desta forma, as tecnologias disponíveis para processamento de sêmen a campo, como os equipamentos de resfriamento e congelamento automáticos e os containers portáteis para transporte de sêmen refrigerado usando gelo reciclável, não se adaptam à realidade dos locais de captura de grandes felinos.

Objetivou-se, portanto, por meio do presente estudo adaptar uma metodologia de coleta farmacológica de sêmen e de um método de resfriamento e criopreservação de sêmen de onças pintadas e onças pardas que sejam viáveis para animais de vida livre, capturados por armadilhas de laço.

1.1. Referências Bibliográficas

Boddicker, M. L. Snares for predator control. Proceedings of the Tenth Vertebrate Pest Conference, 1982;p. 50-54.

Da Paz R. C. R.; Zuge R. M.; Barnabe, R. C.; 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 (Impresso), 2007; v. 5, p. 337-344.

Da Paz, R. C. R.; Morato, R. G.; Carciofi, A.; Guimarães, M. A. B. V.; Pessutti, C.; Santos, E. F.; Barnabe, R. C. Nutritional influence on quality of semen of jaguar in captivity. International Zoo Yearbook, Inglaterra, 2006; v. 41.

Da Paz, R. C. R. ; Zuge, R. M. ; Morato, R. G. ; Barnabe, V. H. ; Barnabe, R. C. ; Fellipe, P. A. N. . Capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo-SP, 2000; v. 37, n.6.

Da Paz, R. C. R.; Leme, D. P.; Zuge, R. M.; Pessuti, C.; Santos, E. F.; Barnabe, R. C. Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), em testículos de onça pintada (*Panthera onca*), utilizada como ferramenta no diagnóstico de infertilidade. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo, 2003; v. 40, p. 100-107.

Deco-Souza, T.; Paula, T.A.R.; Costa, D. S.; Costa, E. P.; Barros, J.B.G.; Araujo, G.R.; Carretta Jr, M. . Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). *Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso)*, 2013; v. 33, p. 512-516.

Frank, L.; Simpson, D.; Woodroffe, R. Foot snares: an effective method for capturing African lions. *Wildlife Society Bulletin*, 2003; 31(1):309–314.

Jacques, C. N.; Jenks, J. A.; Deperno, C. S.; Sievers, J. D.; Grovenburg, T. W.; Brinkman, T. J.; Swanson, C.C. & Stillings, B.A.: Evaluating ungulate mortality associated with helicopter net-gun captures in the northern Great Plains. - *Journal of Wildlife Management*, 2009; 73(8): 1282-1291.

Logan, K .A., Swenor, L. L., Smith, J. F., Hornocker, M. G.. Capturing pumas with foot-hold snares. *Wildlife Society Bulletin*, 1999; 27:201–208.

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 (*Pantheraleo*). *Theriogenology*, 2012; 78, 696–701.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Brasileira ameaçadas de extinção. Portaria nº 444 de 17 de dezembro de 2014. Brasília. Diário Oficial da União: 245: 121 – 126.

McCarthy, T., Murray, K., Sharma, K., Johansson, O. Preliminary results of a long-term study of snow leopards in South Gobi, Mongolia. *Cat News*, 2010; 53: 15–19.

Morato, R. G.; Conforti, V. A.; Azevedo, F. C. C.; Jacomo, A. T. A.; Silveira, L.; Sana, D.; Nunes, A. L. V.; Guimarães, M. A. B. V.; Barnabe, R. C. Comparative endocrine-ejaculate characteristics of captive versus free living jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction (Cambridge)*, 2001; v. 122, n.5, p. 745-751.

Morato, R. G.; Guimarães, M. A. B. V.; Ferreira, F.; Verreschi, I. T. N.; Barnabe, R. C. Reproductive characteristics of captive male jaguar. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, Brasil, 1999; v. 36, n.5.

Morato, R. G.; Guimarães, M. A. B. V.; Nunes, A. L. V.; Teixeira, R. H.; Carciofi, A.; Barnabe, V. H.; Barnabe, R. C. Colheita e avaliação espermática em onça pintada. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, Brasil, 1998; v. 35, n.4, p. 198-201.

Morato, R. G.; Verreschi, I. T. N.; Guimaraes, M. A. B. V.; Cassaro K.; Pessutti, C.; Barnabe, R. C. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). *Theriogenology*, 2004; v. 61, n.7-8, p. 1273-1281,

Mowat, G., Slough, B. G., Rivard, R. A comparison of three live capturing devices for lynx: capture efficiency and injuries. *Wildlife Society Bulletin*, 1994; 22:644-650.

Portaria MMA no 132, de 14 de dezembro de 2010. Plano de ação nacional para a conservação da onça pintada. PAN Onça pintada.

Portaria MMA nº 76, de 27 de junho de 2014. Plano de ação nacional para a conservação da onça parda. PAN Onça parda.

Schaller, G. B., Crawshaw Jr, P. G. Movement Patterns of Jaguar. *Biotropica*, 1980; Vol. 12, No. 3, pp. 161-168.

Swanson, W. F.; Johnson, W. E.; Cambre, R. C.; S. B. Citino; K. B. Quigley; D. M. Brousset; R. N. Morais; N. Moreira; S. J. O'Brien; and D. E. Wildt. Reproductive Status of Endemic Felid Species in American Zoos and Implications for Ex Situ Conservation. *Zoo Biology*, 2003; 22:421- 441.

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*, 2008; 69:485–90.

2. CAPÍTULO 1: USO DA ARMADILHA DE LAÇO NA CAPTURA DE GRANDES FELINOS EM DIFERENTES BIOMAS BRASILEIROS

RESUMO

Objetiva-se descrever a metodologia empregada no uso da armadilha de laço para a captura de onças pintadas e onças pardas em três biomas brasileiros, Pantanal, Caatinga e Mata Atlântica. Foram usadas armadilhas de laço compostas por um sistema catapulta, um sistema de contenção e um sistema de monitoramento. Um ponto crucial para a segurança da captura foi o monitoramento do desarme dos laços, feito por meio de transmissores VHF a cada uma a duas horas, que foi suficiente para prevenir lesões no membro do animal que foi laçado. Outro ponto crítico foi a aproximação após a captura, uma vez que o único acidente com animal durante as capturas ocorreu nesta etapa. Recomenda-se que seja feita de forma rápida, com o mínimo de barulho, evitando que o animal se estresse e se machuque ao tentar escapar. Além disso, a equipe deve observar a área de alcance do animal e manter uma distância segura desta. No presente estudo obtivemos um total de 40 eventos de captura (34 de onças pintadas e seis de onças pardas). Sendo o primeiro estudo a capturar onças pintadas e pardas no bioma Caatinga. O esforço para captura de onça pintada foi de 30,3, 212,5 e 351 laços-dia/captura para o Pantanal, Caatinga e Mata Atlântica, respectivamente. Possivelmente a baixa taxa de captura na Mata Atlântica se deu pela soma de dois fatores: a baixa densidade populacional e a topografia da região, que limitou a área de captura. O mesmo não foi observado para a onça parda neste bioma, cujo esforço de captura foi de 144 laços-dia/captura, possivelmente devido à maior densidade desta espécie. O sucesso de captura (eventos de captura/dias de campanha) de onça pintada foi semelhante ao obtido por trabalhos que usaram cães farejadores, porém essa metodologia exige a manutenção de uma matilha treinada, além de conferir maior risco de acidentes tanto para o animal, quanto para a equipe. Sendo assim, por ser eficiente e mais segura recomenda-se o uso da armadilha de laço para a captura de onças pintada e parda no Pantanal, Caatinga e na Mata Atlântica.

Palavras – chave: *Panthera onca*, *Puma concolor*, metodologia de captura.

ABSTRACT

Our objective was to describe the foot snare trap methodology employed for capturing jaguars and pumas at three Brazilian Biomes, Pantanal, Caatinga and Atlantic Forest. We used foot snares made with a catapult system, a restrain system and a tracking system. One of the crucial points for the capture safety was monitoring the snares every one to two hours with VHF transmitters, which could prevent injuries on the captured limb. Another critical point was the approach after capture since the only accident occurred during this phase, which is recommended to be done quickly, with minimal noise, preventing the animal stress and hurt himself while trying to escape. In addition, the professionals must observe the reach area of the animal and maintain a safe distance from it. In this study we obtained a total of 40 capture events, 34 jaguars and six pumas. This was the first jaguar and puma capture report at Caatinga. The jaguar capture rate was 30.3, 212.5 and 351 snare-day/capture at Pantanal, Caatinga and Atlantic Forest, respectively. Possibly the low capture rate at Atlantic Forest was related to two factors: the low population density and the topography, which limited the capture area. However it was not observed for pumas at the same biome, whose capture rate was 144 snare-day/capture, possibly due to the higher density of this specie. The capture success (capture events/ expedition days) was slightly lower than that obtained by studies that used trailing hounds, however this method requires the maintenance of a trained pack, besides conferring increased risk both for the animal, and researchers. Thus, as it is an efficient and safe method the foot snare is recommended for capture jaguars and pumas at Pantanal, Caatinga and Atlantic Forest.

Key words: *Panthera onca*, *Puma concolor*, Capture methodology.

2.1. Introdução

A onça pintada (*Panthera onca*) e a onça parda (*Puma concolor*) vem sofrendo considerável redução de suas populações, sendo estimado pelos especialistas abaixo de 10.000 indivíduos para cada espécie no Brasil (Azevedo et al., 2013; Morato et al., 2013). Diante dessa realidade, o Ministério do Meio Ambiente por meio do ICMBio elaborou os Planos de Ação Nacional para a conservação da onça pintada (PAN Onça pintada, Portaria nº 132, de 14 de dezembro de 2010) e da onça parda (PAN Onça parda, Portaria nº 76, de 27 de junho de 2014), cujos objetivos são reverter o declínio populacional dessas espécies em cada bioma brasileiro. Para isso, foram estabelecidas uma série de ações que requerem a captura de indivíduos de vida livre para a coleta de material biológico e colocação de coleiras de telemetria para monitoramento dos animais.

Embora diversos métodos de captura estejam disponíveis para estudos com grandes felinos, a busca por métodos mais seguros e eficientes é uma constante (Jacques et al., 2009). Há uma carência na literatura da área de dados descritivos detalhados destas diferentes metodologias de captura, e em especial de levantamentos das lesões decorrentes nas diferentes técnicas, o que limita em muitos casos a definição do melhor risco - benefício. Sendo ainda a divulgação desses dados necessários para o desenvolvimento e aprimoramento de novas metodologias (Powell e Proulx, 2003).

As principais metodologias de capturas utilizadas por pesquisadores de felinos selvagens são armadilhas do tipo gaiola e acumamento por cães treinados (Schaller & Crawshaw, 1980). Além de riscos inerentes aos procedimentos de captura, essas metodologias possuem consideráveis desvantagens. As armadilhas de gaiola, por exemplo, precisam ser reforçadas e por isso acabam sendo caras e pesadas, necessitando de grande investimento e esforço logístico para o transporte, o que pode inviabilizar o estudo em lugares de difícil acesso (Furtado et al., 2008). Essas armadilhas exigem grande período de aclimatação no campo, além de estímulo atrativo para a entrada do animal na armadilha. Assim, torna-se necessário o uso de iscas, o que muitas vezes é feito com animais vivos, o que gera alguma controvérsia ética além da logística para a manutenção dos mesmos. Em relação à saúde do

animal capturado, as armadilhas de gaiola apresentam risco dos animais fraturem os dentes e garras ou machucarem a face na tentativa de fuga (Rabinowitz, 1987).

No caso do uso de cães farejadores, inúmeras questões podem ser levantadas. Há a necessidade do uso de uma matilha treinada, o que nos casos de composição de um plantel próprio gera custos na aquisição, manutenção e treinamento dos cães. Assim em muitos casos são contratados os serviços de caçadores ilegais, gerando um conflito ético. Outra questão com o uso de cães é o grande risco envolvido tanto para o felino como para os cães, que por vezes entram em confronto direto, resultando em animais feridos ou mesmo mortos durante as ações, ou mesmo em conflitos entre os membros da matilha (Crawshaw, 1995; Furtado et al., 2008; Elbroch et al., 2013). Neste sentido torna-se necessário todo um aparato técnico médico veterinário para a segurança dos cães, não somente durante o esforço de captura, mas também para a manutenção hígida dos animais durante toda a campanha. Mesmo assim, não previne necessariamente os riscos sanitários ambientais envolvidos na disseminação de doenças comuns entre os animais silvestres e domésticos. Essa técnica, envolve ainda a necessidade de pessoas treinadas para conduzir os cães e somente é realizada nas horas mais frescas do dia, ficando assim inviabilizada em regiões de clima mais quentes.

Na busca de metodologias mais eficientes e mais seguras para a captura de grandes felinos começou-se a utilizar a armadilha de laço (Logan et al.,1999). Devido ao baixo custo, simplicidade e facilidade de manutenção, o laço é utilizado até os dias atuais na captura de animais de interesse para comércio de pele, caça de subsistência e mesmo controle de animais problemas (Boddicker, 1982). Neste sentido, a partir de adaptações desenvolvidas visando a segurança do animal, esta metodologia vem sendo usada também para a captura de animais em projetos conservacionistas, em especial de felinos como: o Lince (*Lynx canadensis*; Mowat et al., 1994), o Puma (*Puma concolor*; Logan et al.,1999), o Tigre (*Panthera tigris*; Goodrich et al.,2001), o Leão (*Panthera leo*; Frank et al., 2003), e o Leopardo-das-neves (*Panthera uncia*; Mccarthy et al., 2010).

Recentemente, o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros (CENAP – ICMBio) vem incentivando o uso de armadilhas de laço em projetos conservacionistas de grandes felinos a partir de cursos e workshops, por

considerar a técnica eficiente e menos lesiva aos animais. No entanto não há trabalhos relatando sua eficiência e descrevendo as adaptações necessárias para seu uso em onças pintadas e onças pardas no Brasil. Neste sentido o presente trabalho objetivou descrever a metodologia empregada no uso da armadilha de laço para a captura de onças pintadas e onças pardas em três biomas brasileiros, Pantanal, Caatinga e Mata Atlântica.

2.2. Material e Métodos

2.1.1. Autorização

O presente estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Protocolo: 727/2015) e da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo: 79/2015) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Protocolo: 46031-4).

2.2.2. Área de estudo

Esse trabalho foi realizado nos biomas Pantanal, Mata Atlântica e Caatinga, entre os anos de 2012 a 2015.

No Pantanal as capturas foram realizadas na Estação Ecológica de Taiamã, Cáceres – MT (EET; 16°48' e 16°58'S, 57° 24' e 45° 40' W), na Fazenda São Bento, Corumbá – MS (FSB; 14° e 22° S, 53° e 66°W) e na Fazenda Barranco Alto, Aquidauana – MS (19°34'38.58"S, 56° 9'12.45"O). Nas fazendas a principal atividade está relacionada a criação extensiva de gado. Neste bioma, as campanhas de captura foram realizadas em áreas onde não ocorrem onças pardas, portanto os esforços se concentraram somente em onças pintadas.

Na Mata Atlântica as capturas ocorreram nos Parque Estadual Carlos Botelho (PECB; 24° 08' S, 47° 58' W) e no Parque Estadual Intervales (PEIV; 24°12' e 24°32' S, 48°03' e 48°32' W), ambos no ano de 2014. No Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB; 42°20' e 42°40' S, 20°20' e 21°00'W), onde somente são encontradas onças pardas.

Na Caatinga foram realizadas três campanhas de capturas no Parque Nacional da Serra da Capivara (PNSC; 8° 26' e 8° 54' S, 42° 19' e 42° 45'W) no período da seca, entre os meses de julho a novembro.

2.2.3. Armadilha de laço

O artefato utilizado no presente trabalho como armadilha de laço, consiste em um conjunto de estruturas mecânicas modificadas a partir de modelo utilizado na África para a captura de leões (*Panthera leo*; Frank et al., 2003). A armadilha é composta de: a) um sistema catapulta, b) um sistema de contenção e c) um sistema de monitoramento.

O sistema catapulta é o mecanismo responsável pelo arremesso do laço (Figura 1A). Para tal apresenta uma mola de torção de dois corpos (5,0 x 40 cm), responsável pela propulsão de um braço em relação à uma base de fixação a partir de um mecanismo de disparo. O braço é formado por uma haste principal de aço carbono com 44 cm de comprimento, com uma haste transversal de 15,5 cm em uma extremidade apresentando assim um formato de “T”. O braço é acoplado ao mecanismo de mola pela extremidade livre e preso no mecanismo de disparo pela extremidade com a haste transversal quando armado. A base de fixação é de comprimento semelhante ao braço, com o mecanismo de mola em uma extremidade e a parte fixa do gatilho de disparo na extremidade oposta. O mecanismo de disparo é composto por um pedal de 25 cm de comprimento acoplado à base de fixação e descreve um movimento descendente quando sob pressão, permitido pela compressão de um bloco de espuma posicionado abaixo. Usou-se uma espuma quadrada com 25 cm dos lados e 10 cm de espessura.

O sistema de contenção é responsável pelo aprisionamento do animal propriamente dito, sendo um mecanismo de lançamento auto travante fixado ao solo para a contenção do animal. Este sistema é composto por: um laço, uma base de amortecimento e um ancoramento (Figura 1B). O Laço foi produzido em cabo de 3/16" de diâmetro, em construção de 7x19 e alma de aço inox (AACI), com torção regular à direita (TRD). Para cada laço usou-se 1,20 metros de cabo, sendo que 15 cm de cada extremidade foi usado para a confecção das alças que foram presas com talurites 3/16" de alumínio. Dessa forma o laço passou a ter 105 cm de comprimento. Usou-se um dispositivo em forma de “L” (2 x 3 cm) confeccionado em aço carbono como mecanismo de travamento, permitindo o movimento do laço em apenas um sentido, evitando assim que o laço abra após ser fechado (Figura 1B).

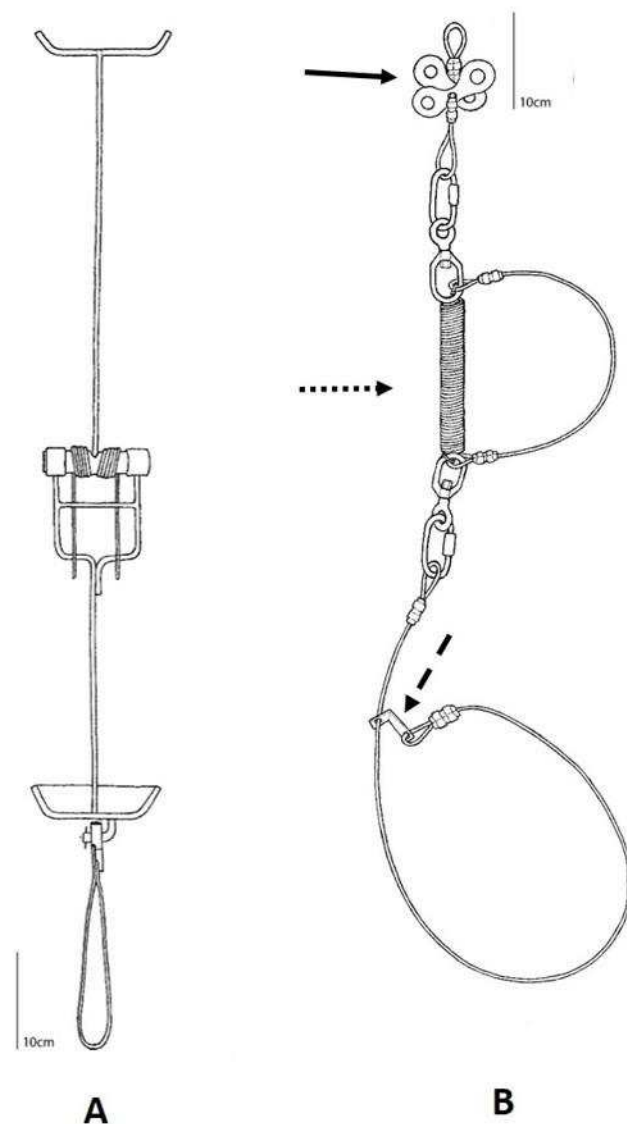


Figura 1. Armadilha de laço para captura de onças pardas e onças pintadas contendo: Sistema Catapulta (A) e Sistema de Contenção (B) formado pelo laço que possui o dispositivo de freio (seta tracejada), base de amortecimento (seta pontilhada) e ancoramento (seta cheia).

A base de amortecimento é um mecanismo de conexão entre o laço e o ancoramento, com o objetivo de amortecer o tracionamento pelo animal e evitar a torção do laço, dando maior segurança durante a contenção. Este dispositivo compõe-se por destorcedores, mosquetões, mola de tração e um limitador. O limitador foi construído com 55 cm de cabo de aço inox (5/16) com alças nas duas extremidades, resultando num comprimento de 40 cm, tomando cuidado para que medisse entre 10 a 20 cm a mais que o comprimento da mola. A mola utilizada foi do tipo tração (mola TRA 4,2X24X207 CARB B) cujas extremidades foram fixadas em

cada alça do limitador, assim como um conjunto destorcedor x mosquetão em ambas as extremidades.

O ancoramento compõe-se de duas chapas arqueadas metálicas (borboletas) de 15 cm de comprimento e posicionadas cruzadas, tendo cada uma dois orifícios de ½ polegada nas extremidades e um de 3/16" no centro (Figura 1B). Formando uma cruzeta com um lado côncavo e um lado convexo. No orifício central desta cruzeta foi passado um cabo de 35 cm (construído em aço inoxidável, 3/16" de diâmetro, construção 7x19), contendo uma alça de 20 cm no lado convexo, funcionando como alça de ancoramento, e uma alça de 10 cm, no lado côncavo funcionando como travamento da alça de ancoramento. Para o ancoramento no solo foram inseridos vergalhões, de ½ polegadas de diâmetro com 1 metro de comprimento cada, através dos orifícios nas extremidades das borboletas. Uma das pontas dos vergalhões foi forjada e achatada para evitar que a cruzeta se soltasse. Cuidado especial foi dado na colocação dos vergalhões, sendo inseridos na posição oblíqua (45 °) em relação ao solo para aumentar a área ancorada.

O sistema de monitoramento é composto por um transmissor de VHF na faixa de 150.000 Mhz que possui opção entre duas frequências de bips, uma frequência lenta (um bip a cada três segundos) e uma frequência rápida (um bip por segundo). A mudança de frequência é deflagrada com a ativação de uma chave comutadora acionada magneticamente, assim, pela retirada de um artefato imantado (ímã) do corpo do transmissor, o mesmo muda da frequência lenta (repouso) para a frequência rápida (acionamento). O transmissor é montado utilizando-se um fio (linha multifilamentada) conectando o laço ao ímã, assim, quando capturado o movimento da tentativa de fuga do animal leva à remoção deste ímã e conseqüente mudança na frequência de bips. Para o monitoramento da frequência de bips do transmissor, é utilizado um aparelho de rádio recepção dotado de uma antena omnidirecional no acampamento de apoio. As armadilhas foram monitoradas em intervalos máximo de duas horas.

Para aumentar a eficiência da transmissão dos sinais de VHF, os transmissores foram colocados nos topos de árvores e para facilitar esse procedimento foi desenvolvido um mecanismo de elevação dos transmissores, composto por um estilingue profissional acoplado a um molinete de pescaria (Figura 2). O Estilingue

foi utilizado para lançar um projétil preso ao fio do molinete a uma forquilha em árvore próxima, o mais alto possível, formando um sistema de içamento para o transmissor. A mesma metodologia foi utilizada para a elevação da antena receptora omnidirecional no acampamento de apoio.

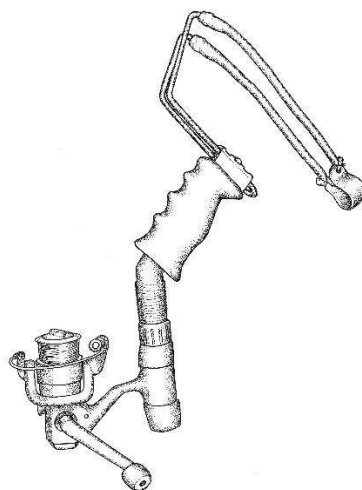


Figura 2: Lançador desenvolvido para auxiliar na montagem dos transmissores de VHF.

2.2.4. Montagem das armadilhas

As armadilhas foram montadas em trilhas e estradas observando a presença de indícios da utilização pelos felinos, como pegadas ou fezes, ou após o monitoramento das áreas com o uso de armadilhas fotográficas. Para aumentar a chance de captura em algumas áreas foram montadas duas armadilhas de laço, uma ao lado da outra.

Após escolher as áreas foi necessário observar alguns aspectos importantes na montagem da armadilha:

- a) Área de Perigo Iminente (API): a API é uma área ao redor do ancoramento do sistema de contenção onde o animal pode alcançar com a sua pata. O raio de alcance foi calculado considerando-se o comprimento do laço e da base de amortecimento (145 cm) somado à envergadura dos membros

torácicos da espécie. Assim, tomou-se cuidado para que dentro da API não tivesse obstáculos fixos que pudessem machucar o animal como, por exemplo, árvores grossas ou com forquilhas, proximidade com cercas, barranco, ou qualquer coisa que possa causar danos ao animal.

b) Antes de montar o laço verificou-se a firmeza do solo para realizar um ancoramento de forma segura. No caso de estradas, a armadilha foi montada em um dos traçados formados pelos pneus de veículos, pois geralmente os animais optam por andar nesses trilhos.

c) Quando se usou carcaças animal ou iscas vivas, preferencialmente foi feito um cercado de galhos (boma), com uma ou mais entradas onde eram montados os laços. Em algumas situações as armadilhas foram apenas instaladas em volta da carcaça. Foram utilizados peixes em algumas armadilhas, sendo pendurados acima dos laços (altura superior a 150 cm), já as iscas de cheiro (caldo de peixe ou urina de onça) eram colocadas nas trilhas à frente dos laços.

A montagem da armadilha iniciou com a abertura do solo onde foi inserida a espuma, para dar apoio ao pedal da catapulta. Em seguida instalou-se a base da catapulta fixando-a no solo por meio de duas estacas de ferro de aproximadamente 25 cm cada, uma próxima ao gatilho para evitar que o mesmo destrave e a outra próxima a mola de torção para evitar que se desloque para frente, durante o acionamento.

O laço foi então colocado sobre o gatilho formando um círculo de aproximadamente 30 cm de diâmetro e sua extremidade foi posicionada sobre a haste transversal do braço da catapulta (Figura 3). Para concentrar toda a força de alavancamento sobre o laço, fixou-se a porção final da extremidade do laço na base de fixação da catapulta, próximo ao gatilho, com um arame liso.

O passo seguinte foi instalar o ancoramento, fixando quatro vergalhões em posição oblíqua ao solo (45°) através dos orifícios das borboletas. A alça do ancoramento foi então conectada ao laço através da base de amortecimento por meio de um mosquetão.

Por fim, a armadilha foi camuflada com areia, terra e folhas. Para o direcionamento do animal exatamente sobre o pedal da armadilha foram utilizados cadenciadores, bloqueadores primários e secundários (Figura 3). Os cadenciadores são pequenos troncos dispostos transversalmente e equidistantes na trilha, direcionando a passada do animal para a armadilha. Os bloqueadores primários e secundários foram construídos com galhos secos, troncos, bambu e folhas, sendo que o bloqueador primário foi disposto transversalmente na trilha, especificamente no local onde os laços eram montados. Os bloqueadores secundários foram montados antes e após o laço numa distância de pelo menos quatro metros da armadilha, quando esta foi instalada em estradas ou trilhas largas.

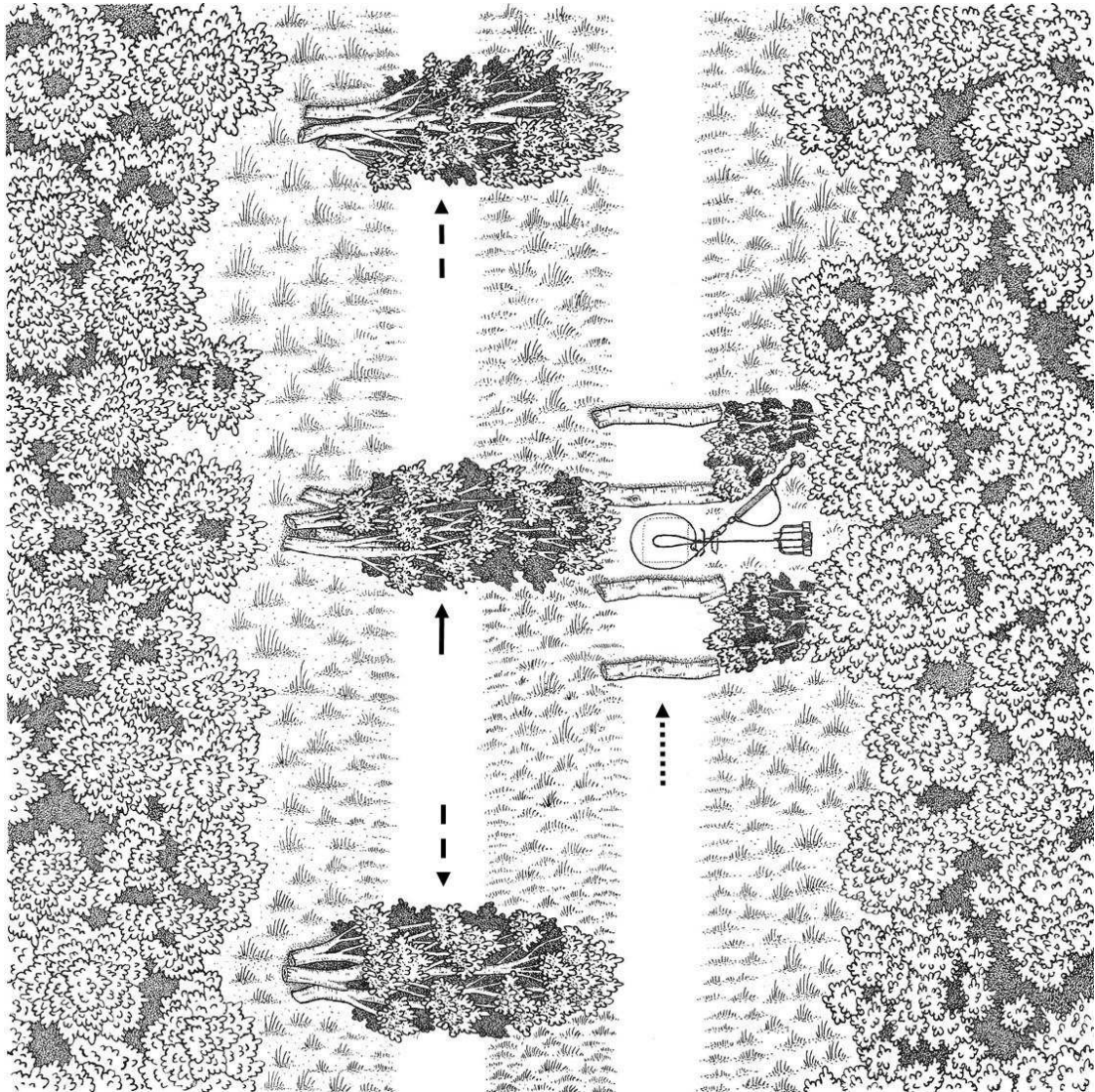


Figura 3: Disposição dos componentes da armadilha de laço para a captura de onças pintadas e onças pardas no campo, contendo: Cadenciadores (seta pontilhada), Bloqueios primário (seta contínua) e Bloqueio secundário (seta espaçada).

2.2.5. Aproximação e Contenção química

Após a confirmação do desarme do laço pelo sinal de VHF a equipe se deslocou para o local para realizar a contenção química. Chegando ao local foi realizada a aproximação de reconhecimento, respeitando uma distância de no mínimo 10 metros da API, o mais silenciosamente possível. Na captura noturna a aproximação foi feita com apenas um foco de luz. Neste momento observa-se a posição do laço no animal e estima-se o peso para o cálculo da dose anestésica.

Posteriormente, já com os dardos anestésicos preparados, realiza-se a segunda aproximação, para efetuar o disparo do dardo anestésico. Essa aproximação foi feita sempre que possível em duas frentes de ação, a uma distância de no mínimo seis metros da API, cada uma com uma arma anestésica e posicionados diagonalmente em relação ao animal. Desta forma, a frente de ação com melhor ângulo efetuou o disparo. Tomou-se cuidado para que as frentes nunca ficassem posicionadas em 180 graus, para evitar acidente de disparo. Quando disponível apenas uma arma, uma frente de ação era responsável apenas por chamar a atenção do animal (Figura 4).



Figura 4: Aproximação para o disparo do dardo anestésico com a participação de duas frentes de ação na captura de uma onça parda usando armadilha de laço.

Os protocolos anestésicos utilizados foram a combinação de Tiletamina com Zolazepam (Zoletil®, Virbac do Brasil) na dose de 8 a 12 mg/kg e de Propofol (Provive®, Meizier Biopharma S.A) na dose de 2-4 mg/kg nos casos em que foi preciso aprofundar a anestesia. Outro protocolo anestésico utilizado foi a associação

da Medetomidina (0,08-0,1 mg/kg, Precision Pharmacy, CA, USA) com a Ketamina (5 mg/Kg, Dopalen®, Vetbrands, SP, Brasil), sendo que nesse protocolo foi utilizado o Atipamezole (0,25 mg/kg, Precision Pharmacy, CA, USA) para reverter a Medetomidina.

Efetuada o disparo aguardou-se 10 minutos para a aproximação de contato ou redosagem anestésica. Com o animal já anestesiado foi realizado os seguintes procedimentos: 1 – Pesagem do animal e verificar se há necessidade de aprofundar a anestesia; 2 – Acesso venoso na veia cefálica ou safena medial para coleta de sangue e em seguida manutenção por fluxo de solução fisiológica; 3 – Monitoramento da anestesia quanto aos parâmetros de frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura corporal utilizando um monitor multiparamétrico; 4 – Coleta de biometria corporal, odontograma e testicular; 5- Avaliação da possibilidade de colocação de coleira de monitoramento; 6- Finalizado os procedimentos o animal é colocado em local seguro onde recebe uma dose de Atipamezole para reverter a anestesia.

2.2.6. Análise dos dados

Os dados foram apresentados para cada bioma quanto ao total de dias de esforço de captura total de campanhas por bioma, área de laços armados, eventos de captura, média de laços abertos por dia, total laços dia, esforço laços dia por captura e taxa de captura. Os dias de esforço de captura compreenderam o período que as armadilhas estiveram abertas. A área efetiva de laços em cada bioma foi obtida pela média das áreas calculadas pelo estimador Mínimo Polígono Convexo (MPC). O evento de capturas correspondeu ao somatório das capturas e recapturas. A média de laços abertos por dia foi calculada dividindo o total de laços-dia pelos dias de esforço em cada bioma. O cálculo dos laços-dia foi determinado somando a quantidade de laços abertos durante os dias de esforço. Para determinar o esforço de laços-dias necessários para se conseguir um evento de captura foi dividido o total de laços-dias de cada bioma pela quantidade de eventos de captura. Por fim, a taxa de captura foi calculada dividindo a quantidade de eventos de captura de cada bioma pelo total de dias de esforço do respectivo bioma e multiplicando por 100.

2.3. Resultados

Ao todo foram capturadas 30 onças pintadas, 16 fêmeas e 14 machos, sendo que três animais do bioma Pantanal foram capturados mais de uma vez, totalizando 34 eventos de captura. No Pantanal foi necessário o menor esforço para captura de onças pintadas, enquanto que esse esforço foi maior no bioma Mata Atlântica (Tabela 1).

A taxa de recaptura foi de 15,4 % para onças pintadas no Pantanal e de 25% para onças pardas na Mata Atlântica, sendo que esses animais não eram monitorados por telemetria.

Tabela 1: Esforço e eficiência de captura de onças pintadas usando a armadilha de laço no Pantanal, Caatinga e Mata Atlântica.

	Pantanal	Caatinga	Mata atlântica	Total
Dias de esforço	101,0	51,0	39,0	191,0
Média de Área de laço (Km²)	45,6	43,6	15,9	35,0
Eventos de captura	30,0	3,0	1,0	34,0
Média Laços aberto/dia	9,0	12,5	9,0	10,2
Total laços-dia	909,0	637,5	351,0	1941,0
Esforço de Laços-dia/captura	30,3	212,5	351,0	57,1
Taxa de captura (%)	29,7	6,0	2,6	17,8

O esforço de laços-dia para a captura de um indivíduo de onça pintada e onça parda foi semelhante na Caatinga, porém na Mata Atlântica foi necessário um esforço muito maior para capturar uma onça pintada em relação as onças pardas (Tabela 1 e 2). Na Caatinga ocorreu escape de uma onça pintada e uma onça parda e na Mata Atlântica ocorreu escape de uma onça parda.

Em relação a capturas não previstas, no Pantanal ocorreu a captura de uma anta, dois bovinos, um jacaré e um queixada. Na Caatinga foram capturados quatro tamanduás bandeira e na Mata Atlântica foram capturadas duas antas.

Tabela 2: Esforço e eficiência de captura de onças pardas usando a armadilha de laço na Caatinga e Mata Atlântica.

	Caatinga	Mata atlântica	Total
Dias de esforço	51,0	96,0	147,0
Média de Área de laço (Km²)	43,6	10,5	27,1
Eventos de captura	2,0	4,0	6,0
Média Laços aberto/dia	12,5	6,0	9,3

Total laços-dia	637,5	576,0	1359,8
Esforço de Laços-dia/captura	318,7	144,0	226,6
Taxa de captura (%)	4,0	4,2	4,1

De um total de 40 eventos de captura de onças pintadas e onças pardas ocorreu apenas um caso de autolesão em uma onça pintada capturada no bioma Pantanal. Nesse animal foi necessário realizar limpeza do local com aplicação de antisséptico, cicatrizante e repelente.

2.4. Discussão

A metodologia do laço, apesar de já ser utilizada na captura de grandes felinos na África e América do Norte, teve que ser adaptada para as características peculiares dos biomas brasileiros. Nas primeiras campanhas foi possível observar, com o uso de armadilhas fotográficas, que os felinos além de não respeitarem os cadenciadores colocados na direção dos laços, erguiam pouco as patas durante as passadas pela armadilha. Essa situação facilitava o reflexo de retirada do membro do animal durante o fechamento do laço, ficando o laço preso apenas nas extremidades dos dedos, o que pode explicar a fuga de uma onça pintada e uma onça parda no bioma Caatinga e de uma onça parda no bioma Mata Atlântica. Devido a isso, a alternativa utilizada foi colocar cadenciadores mais espessos próximos ao gatilho o que evitou a ocorrência de escapes nas capturas seguintes. Além disso, em algumas áreas foram montados um laço ao lado do outro. Também foi possível observar em uma ocasião, onde o laço estava montado em um traçado de uma estrada e com apenas o bloqueio primário, que uma onça parda ao aproximar do bloqueio primário conseguiu atravessá-lo sem passar pelo laço. Nesse tipo de local o animal pode optar por andar em mais de um traçado, mas com a colocação de um bloqueio antes e depois do laço, o animal é obrigado a mudar para o traçado onde o laço foi armado. Devido a esse episódio foram acrescentados à metodologia bloqueadores secundários nos laços montados em estradas ou trilhas largas.

A onça parda é mais arisca do que a onça pintada ao se aproximar das armadilhas de laço, principalmente no primeiro dia da montagem ou quando o bloqueio primário era feito com galhos de árvores recém cortadas. Por isso, optou-se por utilizar galhos secos que já se encontravam no solo e tomando cuidado para não deixar cheiros fortes durante a montagem dos laços.

O sucesso da captura de onças pintadas no Pantanal do presente trabalho foi de 29,7%, inferior aos 36,7% obtidos por Furtado (2010) quando utilizou cães treinados no mesmo bioma. No entanto, analisando os dados de evento de captura dessa pesquisadora foi possível observar que 33% foram recapturas de animais monitorados com coleiras de VHF-GPS, o que proporcionou melhor logística de recaptura, aumentando sua eficiência. No presente trabalho, no entanto, apesar de terem ocorridos eventos de recaptura (15,4%), nenhum deles se deu com o auxílio de monitoramento remoto dos indivíduos uma vez que na época da captura os GPS não funcionavam. Desta forma, considerando apenas os eventos de captura de ambos estudos, sem considerar as recapturas, Furtado (2010) obteve um sucesso de 24,44%, semelhante aos 25,7% obtidos no presente trabalho. Vale ressaltar que, um dia de esforço de Furtado (2010) que utilizou matilha de cães treinados, correspondeu a um dia com nove laços abertos do presente trabalho. Infelizmente a maioria dos artigos relacionados a estudos que envolveram capturas de onça pintada e ou onça preta não mencionam as taxas de captura, inviabilizando a comparação da eficiência dessas metodologias.

As áreas de captura no Pantanal - ESEC Taiamã, Fazenda São Bento e Fazenda Barranco Alto – são margeadas por rios e, uma vez que as onças pintadas nesta região usam preferencialmente os barrancos para suas atividades diárias, optou-se por montar os laços preferencialmente nessas áreas. Apesar da onça preta ser amplamente distribuída no Pantanal, essa espécie tem preferência pela utilização de áreas mais secas (Azevedo et al., 2013) onde não houve esforço de captura neste trabalho e por isso nenhum indivíduo desta espécie foi capturado.

No Pantanal as armadilhas foram iscadas com peixes, caldo de peixes e ou urina de onça pintada. Em uma ocasião, na ESEC Taiamã, o uso de uma carcaça de jacaré auxiliou na captura de dois indivíduos de onça pintada em dias distintos. Na fazenda São Bento quatro onças pintadas foram capturadas com armadilhas de laço armadas ao redor de carcaças de bovinos. Esse tipo de isca mostrou-se bem eficiente nesta região, uma vez que, bovinos se tornaram uma presa constante de onças pintadas (Crawshaw & Quigley, 2002). Além disso, os animais costumavam retornar às carcaças e dependendo do tamanho do bovino, este era consumido por vários felinos e durante vários dias, possibilitando a captura de novos indivíduos com a mesma carcaça.

Na Caatinga as populações de onça pintada e de onça parda encontram-se em declínio, e estimativas indicam uma população efetiva inferior a 250 indivíduos para a onça pintada e de no máximo 2.500 indivíduos para onça parda (Azevedo et al., 2013; Morato et al., 2013). Existem poucos dados sobre a ocorrência da onça pintada neste bioma, com registro de apenas cinco subpopulações distribuídas em 10 % da Caatinga (Paula et al., 2012). Uma dessas subpopulações ocorre na região do Parque Nacional da Serra da Capivara, onde foram realizadas as campanhas de captura desse trabalho.

O presente estudo foi o primeiro a capturar onças pintadas e onças pardas na Caatinga, sendo uma onça pintada fêmea, duas onças pintadas macho, sendo uma melânica, e duas onças pardas machos, demonstrando a eficiência da metodologia mesmo em regiões com baixa densidade desses felinos. Em 51 dias de campanha obtivemos três eventos de captura de onça pintada e duas de onça parda. O sucesso de captura de onça pintada foi de 6 % necessitando de 17 dias para a captura de um indivíduo, enquanto que os 4 % de sucesso em onças pardas foram necessários 25,5 dias para capturar cada indivíduo. Uma peculiaridade importante nesse bioma e que está relacionada ao sucesso de captura é a escolha do período climático para realizar a campanha. Foi observado que no período da seca os animais tendem a ficar próximo das fontes de água que se tornam escassas nesse período. Diante dessa observação os laços foram montados próximos aos caldeirões (fontes artificiais de água) para aumentar as chances de capturas.

Na Mata Atlântica capturou-se um indivíduo de onça pintada após 351 laços-dia, resultando em 2,6% de sucesso. Nesse trabalho esse foi o bioma que exigiu o maior esforço para a captura de onças pintadas. Possivelmente a baixa taxa de captura obtida se deu pela soma de dois fatores: a baixa densidade populacional - cerca de 250 indivíduos em todo o bioma (Beisiegel et al., 2012; Galetti et al., 2013) - e a restrição na área de armadilhamento que foi de 15,9 Km², a menor área de laço entre os biomas estudados. A topografia montanhosa da Mata Atlântica interferiu na transmissão e recepção do sinal de VHF dos transmissores, sendo um fator limitante para a escolha dos locais de armadilhamento. Desta forma, mesmo colocando os transmissores nos topos de árvores e tendo uma média de nove locais de armadilhamento por campanha – média próxima aos demais biomas – as armadilhas de laço permaneceram próximas, abrangendo o território de poucas onças pintadas.

Uma das alternativas para abranger maior área de captura nesse bioma é a realização de campanhas simultâneas, com mais de uma equipe, ou a utilização de monitoramento por sistema de GPS para aumentar a área de laços.

Nesse mesmo bioma, com total de 576 laços-dias, foi possível obter quatro eventos de captura de onças pardas, com um esforço de 24 dias para capturar um indivíduo. O sucesso na captura de onça parda na Mata Atlântica foi maior em relação ao da onça pintada, mostrando maior eficiência de captura, apesar de estar sobre a influência dos mesmos fatores descritos anteriormente. Possivelmente a maior efetividade na captura de onças pardas esteja relacionada com sua maior densidade na Mata Atlântica (Azevedo et al., 2013; Morato et al., 2013).

O sucesso de captura (captura/dia de campanha) de onças pardas (4,16% na Mata Atlântica e 4 % na Caatinga) foi inferior aos 19% descritos por Elbroch et al. (2013) e aos 8,5% descritos por Logan et al. (1999). No entanto, quando se considera a quantidade de laços-dias necessários para a captura de um indivíduo, o maior sucesso de captura de Logan et al. (1999) se deu às custas de maior esforço de captura (193 laços-dias/captura) em relação ao presente estudo no bioma Mata Atlântica (144 laços-dias/ captura). Neste sentido, a análise de capturas usando armadilhas de laço é mais eficiente quando mensurada com base em laços-dia/captura, permitindo uma comparação mais fidedigna entre trabalhos usando esta metodologia.

Em ambos os biomas, Caatinga e Mata Atlântica, há denúncias de predação de pequenos ruminantes por grandes felinos e por isso optou-se por utilizá-los como iscas vivas. Esses animais foram mantidos em sistema de boma (cercados construídos com galhos de árvores) com a montagem do laço na entrada, de forma que o animal não fosse predado pelos felinos. No entanto, não houve sucesso de captura com este tipo de isca. Inclusive, foi possível filmar um evento em que uma onça parda passou por uma boma contendo um cabrito, observando-o por alguns segundos, mas optou por não entrar na armadilha.

Foram observados quatro importantes pontos críticos que estão relacionados ao surgimento de lesões nos animais causadas por essa metodologia de captura: a escolha da API, frequência do monitoramento das armadilhas, confecção da base de amortecimento e aproximação para a contenção química. A escolha da API é uma

etapa crucial na montagem do laço, pois será a esta área que o animal terá acesso para a briga durante a captura. Dessa forma a API tem que ser segura para o animal como também para a equipe de trabalho. Cuidado especial deve ser dado aos obstáculos fixos dentro dessa área, principalmente árvores grossas e/ou com forquilhas baixas. Durante a captura os animais procuram escapar do laço subindo nas árvores e ao fazer isso podem ficar pendurados apenas pelo cabo de aço ocasionando lacerações ou fraturas. Conhecer os limites da API é muito importante principalmente nas aproximações de visualização e de contenção, que necessitam de um distanciamento seguro para a equipe. Apesar de alguns estudos citarem a possibilidade de realizar o ancoramento do laço em tronco de árvores, no presente trabalho nenhum ancoramento foi realizado dessa forma (Frank et al., 2003), pois além de limitar o local da montagem da armadilha, o animal pode subir na árvore e se machucar.

Quanto mais o animal tenta se desvencilhar do laço, mais ele se fecha dificultando a circulação sanguínea e assim provocando edemaciação no membro a ponto de perder a sensibilidade. A falta da sensibilidade pode levar o animal a morder o próprio membro causando uma lesão mais grave. Por isso, o monitoramento dos laços é uma etapa importante nesta metodologia. O monitoramento por telemetria realizado no máximo a cada duas horas foi eficiente em prevenir esse tipo de acidente.

A base de amortecimento do sistema de contenção possui dois mecanismos que são importantes para a segurança do animal capturado: o destorcedor e a mola. A função do destorcedor é evitar que o cabo de aço enrole em seu próprio eixo, rompendo-se ou aumentando a constrição do membro laçado do animal. Já a mola impede que o animal de tranco abrupto, evitando a ocorrência de traumas no membro. Nas primeiras capturas foi observado que quando se utilizava apenas um destorcedor unindo o laço a base de amortecimento, muitas das vezes o destorcedor travava ao se enrolar no fio usado no transmissor de VHF ou até mesmo em fibras vegetais que se enrolavam durante a captura. Nessas mesmas capturas também foi possível observar que algumas molas ficavam totalmente estiradas e desprendidas da base do laço, devido ao comprimento do limitador da base de amortecimento ser bem superior ao tamanho da mola. Depois dessas observações a base do laço recebeu mais um destorcedor e o cabo de aço limitador foi reduzido para um comprimento

máximo de dez a vinte centímetros a mais em relação ao comprimento da mola (Figura 1B).

A aproximação para o disparo do dardo anestésico é o evento de maior tensão tanto para o animal como para a equipe, e por isso deve-se ser realizado de forma rápida, eficiente e segura. Nas capturas de onça parda foi possível observar que os indivíduos tendem a se esconder no momento da aproximação, ao contrário da onça pintada que normalmente avança em direção à equipe. Observou-se que quando a aproximação para a contenção era feita por apenas uma frente de ação o procedimento de contenção era mais demorado, uma vez, que o animal tende a acompanhar os movimentos da frente de ação, dificultando o acesso da região de eleição para o disparo do dardo no animal. Sendo assim, a utilização de duas frentes armadas e posicionadas uma em cada diagonal do animal mostrou-se mais eficiente, resultando em contenções químicas mais rápidas. Caso somente uma arma esteja disponível, uma frente deve ser a responsável por chamar a atenção do animal. Nesse tipo de aproximação as frentes devem tomar cuidado para não ficarem na área de tiro.

O presente trabalho totalizou 40 eventos de captura com 34 contenções em onças pintadas e seis em onças pardas. Dos animais capturados, algumas onças pintadas apresentaram edema momentâneo no membro que ficou preso ao laço, devido à tração durante as tentativas de soltura. Todos os casos de edema foram normalizados após a realização de massagens localizadas. Apenas um animal causou um ferimento em um dos dedos do membro torácico direito, em decorrência do estresse causado por uma aproximação inadequada. Nesse animal foi necessário realizar limpeza do local e aplicação de antisséptico, cicatrizante e repelente. Posteriormente por meio de câmeras trap foi possível observar que o animal se recuperou bem da lesão.

Apesar de diversas pesquisas com grandes felinos no Brasil usarem cães treinados, são poucos os dados publicados relatando acidentes relacionados com os eventos de captura (Rabinowitz, 1986; Crawshaw & Quigley, 1991; Silveira, 2004; Soisalo & Cavalcanti, 2006; Azevedo & Murray, 2007; Furtado, 2010). No estudo de Logan et al. (1999) com pumas no Novo México, além de conseguir capturar grande quantidade de indivíduos (107) com o uso de laços, apenas 2,4% dos felinos tiveram

ferimentos fatais e segundo o próprio autor esta metodologia causou menos injúrias letais em comparação com trabalhos que usaram cães treinados. Possivelmente esses acidentes causados pela armadilha de laço podem estar relacionados com a baixa frequência de monitoramento dos laços, realizado na maioria das vezes apenas uma vez ao dia. Corroborando Logan et al. (1999), Elbroch et al. (2013) recomendou a metodologia de laço para captura de onças pardas, uma vez que, em seu estudo a taxa de pumas lesionados foi de 86% com 10% de mortes quando usou cães treinados e de apenas 3,8% quando usou armadilhas de laço. Além disso, podem ocorrer eventos que resultam em mortes de cães utilizados em capturas de onça pintada, como relatado por Crawshaw (1995) no bioma Mata Atlântica.

A armadilha de caixa atualmente vem sendo pouco utilizadas na captura de onças pintadas e onças pardas, devido principalmente à baixa eficiência na captura desses felinos, além de serem onerosas, de difícil instalação e transporte (Logan et al., 1999; Frank et al., 2003; Silveira, 2004; Furtado, 2010). Furtado (2010) realizou um esforço de 2.460 armadilhas-noites no bioma Cerrado para a captura de onças pintadas, resultando na captura de apenas um indivíduo, apesar ter sido registrada a presença de onças pintadas em frente as armadilhas. Esse mesmo autor realizou um esforço de 189 armadilhas-noite de caixa na tentativa sem sucesso de captura de onças pintadas no bioma Amazônico.

Em todos os biomas estudados no presente trabalho ocorreram onze eventos de capturas não previstas, sendo capturadas três antas, quatro tamanduás bandeiras, um jacaré, um queixada e dois bovinos. Para a retirada dos animais silvestres do laço optou-se pelo uso da contenção física com o intuito de diminuir o tempo de trabalho com esses animais. No caso das antas, foi realizado apenas a aproximação com muita cautela para não estressar o animal e poder acessar o membro laçado para cortar o cabo de aço. Por se tratar de um animal muito forte não foi utilizado o cambão para não correr o risco de ficar preso ao animal após a soltura. Os tamanduás bandeiras foram contidos com cambão ketch-all para facilitar o trabalho de retirada do laço. No caso dos bovinos, no entanto, foi necessário sedar os animais com xilazina (0,01 mg/kg) (Xilazin[®], Syntec) e em seguida realizar a contenção física laçando os animais com cordas para derrubá-los. Nas situações em que os animais estão ativos ou contidos apenas fisicamente e a soltura é feita com o corte do cabo de aço, deve-se tomar cuidado para que o laço se desprenda por completo do membro do animal.

Uma opção muito eficiente é cortar a alça do cabo de aço que prende o mecanismo de freio do laço.

2.5. Conclusão

A armadilha de laço é uma metodologia eficiente e segura para a captura de onças pintadas e onças pardas no Pantanal, na Caatinga e na Mata Atlântica. Entretanto para assegurar a eficácia desta metodologia, faz-se necessário considerar as particularidades comportamentais das espécies em cada bioma, adaptando-a a cada realidade.

Dentre os três biomas estudados, a Mata Atlântica exige o maior esforço (laços-dia) para a captura de um indivíduo de onça pintada, sendo necessário aumentar a área de armadilhas de laço para aumentar as possibilidades de captura.

O monitoramento das armadilhas por telemetria previne lesões aos animais capturados e o lançador facilita a instalação do sistema de monitoramento via VHF nas árvores, permitindo uma ampliação das áreas de captura.

2.6. Referências Bibliográficas

Azevedo, F. C. C. and Murray, D. L. Spatial organization and food habits of jaguars (*Panthera onca*) in a floodplain forest. *Biological Conservation*, 2007; 137, 391-401.

Azevedo, F. C.; Lemos, F. G.; Almeida, L. B.; Campos, C. B.; Beisiegel, B. M.; Paula, R. C.; Crawshaw JR, P. G.; Ferraz, K. M. P. M.; Oliveira, T. G. Avaliação do risco de extinção da onça-parda (*Puma concolor*, Linnaeus, 1771) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 2013;v. 3, p. 107-121.

Beisiegel, B. M.; Sana, D. A.; Moares Jr., E. A. The jaguar in the Atlantic Forest. *Cat News (Bougy)*, 2012; v. 7, p. 14-18.

Boddicker, M. L. Snares for predator control. *Proceedings of the Tenth Vertebrate Pest Conference*, 1982; p. 50-54.

Crawshaw Junior, P. G. Comparative ecology of ocelot (*Felis pardalis*) and jaguar (*Panthera onca*) in a protect subtropical forest in Brazil and Argentina. Florida, 1995. 190p. (Thesis (Ph.D.)- University of Florida.

Crawshaw Junior P. G.; Quigley, H. Jaguar spacing, activity and habitat use in a seasonally flooded environment in Brazil. *Journal of Zoology*,1991; 223, 357-370.

Crawshaw, P. G; Quigley, H. B. Hábitos alimentarios del jaguar y el puma en el Pantanal, Brasil. In MEDELLÍN, R. A. et al. El jaguar en el nuevo milenio. 1ª edición. México: Fondo de Cultura Económica, Universidad Nacional Autónoma de México, Wild Conservation Society. 2002. p. 209-222.

Elbroch, L.; Jansen, M. B. D.; Grigione, M. M.; Sarno, R. J.; Wittmer, H. U. Trailinghounds vs foot snares: comparing injuries to pumas *Puma concolor* captured in Chilean Patagonia. *Wildlife Biology*, 2013; 19(2):210-216.

Frank, L.; Simpson, D.; Woodroffe, R. Foot snares: an effective method for capturing African lions. *Wildlife Society Bulletin*,2003; 31(1):309–314.

Furtado, M. M. Estudo epidemiológico de patógenos circulantes nas populações de onça pintada e animais domésticos de áreas preservadas de três biomas brasileiros: Cerrado, Pantanal e Amazônia. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, 2010; p. 282.

Furtado, M. M.; Carrillo-Percestequi, S. E.; Jácomo, A. T. A.; Powell, G., Silveira, L.; Vynne, C.; Sollmann, R. Studying Jaguars in the Wild: Past Experiences and Future Perspectives. *CAT News Special Issue 4 - The Jaguar in Brazil*, Autumn, 2008.

Galetti, M.; Eizirik, E.; Beisiegel, B. M.; Ferraz, K. M. P. M.; Cavalcanti, S. M. ; Srbek-Araujo, A. C.; Crawshaw JR, P. G.; Paviolo, A.; Galetti, P. M.; Jorge, M. L. S. P.; Marinho Filho, J.; Vercillo, U.; Morato, R. G. Atlantic Rainforest s Jaguars in Decline. *Science (Paris. 1936)*, 2013; v. 342, p. 930-930,

Goodrich, J. M.; Kerley, L. L.; Schleyer, B. O.; Miquelle, D. G.; Quigley, K. S.; Smirnov, Y. N.; Nikolaev, I. G.; Quigley, H. B.; Hornocker, M.G. Capture and

chemical anesthesia of Amur (Siberian) tigers. *Wildlife Society Bulletin*, 2001; 29, 533-42.

Jacques, C. N.; Jenks, J. A.; Deperno, C. S.; Sievers, J. D.; Grovenburg, T. W.; Brinkman, T. J.; Swanson, C.C. & Stillings, B.A.: Evaluating ungulate mortality associated with helicopter net-gun captures in the northern Great Plains. - *Journal of Wildlife Management*. 2009; 73(8): 1282-1291.

Logan, K. A.; Sweanor, L. L.; Smith, J. F.; Hornocker, M. G. Capturing pumas with foot-hold snares. *Wildlife Society Bulletin*, 1999; 27:201–208.

McCarthy, T.; Murray, K.; Sharma, K.; Johansson, O. Preliminary results of a long-term study of snow leopards in South Gobi, Mongolia. *Cat News*, 2010; 53: 15–19.

Morato, R. G.; Moura C. A.; Crawshaw Jr, P. G. Chemical restraint of free ranging jaguars (*Panthera onca*) with tiletamine-zolazepam combination. In *Jaguars in the new millennium. A status assessment, priority detection, and recommendations for the conservation of jaguars in the Americas*. Medellín, R.; Chetkiewicz, C.; Rabinowitz, A.; Robinson, J. G.; Sanderson, E. and Taber A (Eds). UNAM/WCS, Mexico D. F., 2002; Pp. 91-99.

Morato, R. G.; Beisiegel, B. M.; Ramalho, E. E.; Campos, C. B.; Boulhosa, R. L. P.; Oliveira, T. G. Avaliação do risco de extinção da onça-pintada (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 2013; v. 3, p. 122-132.

Mowat, G.; Slough, B. G.; Rivard, R. A comparison of three live capturing devices for lynx: capture efficiency and injuries. *Wildlife Society Bulletin*, 1994; 22:644-650.

Paula, R. C.; Campos, C. B.; Oliveira, T. G. Red List assessment for the jaguar in the Caatinga Biome. *CAT News Special*, 2012, Issue 7, Spring.

Portaria MMA nº 132, de 14 de dezembro de 2010. Plano de ação nacional para a conservação da onça pintada. PAN Onça pintada.

Portaria MMA nº 76, de 27 de junho de 2014. Plano de ação nacional para a conservação da onça parda. PAN Onça parda.

Powell, R.A. & Proulx, G. Trapping and marking terrestrial mammals for research: integrating ethics, standards, techniques, and common sense. - Institute of Laboratory Animal Research Journal, 2003; 44: 259-276.

Rabinowitz A. R. Jaguar: one man's struggle to establish the world's first jaguar preserve. Island Press, Washington, D.C. 1987; p 368.

Rabinowitz, A. R. Jaguar predation on domestic livestock in Belize. Wildlife Society bulletin 1986;14, 170-174.

Schaller, G. B.; Crawshaw Jr, P. G. Movement Patterns of Jaguar. Biotropica, 1980; Vol. 12, No. 3, p. 161-168.

Silveira L. Ecologia Comparada e Conservação da Onça-pintada (*Panthera onca*) e Onça-parda (*Puma concolor*), no Cerrado e Pantanal. PhD Thesis, University of Brasilia, Brasilia, Brasil, 2004; p. 218.

Soisalo, M. K. and Cavalcanti, S. M. C. Estimating the density of a jaguar population in the Brazilian Pantanal using camera-traps and capture-recapture sampling in combination with GPS radio-telemetry. Biological Conservation, 2006; 129, 487-496.

3. CAPÍTULO 2: USO DA MEDETOMIDINA NA COLETA DE SÊMEN DE GRANDES FELINOS MANTIDOS EM CATIVEIRO E VIDA LIVRE

RESUMO

O emprego de tecnologias reprodutivas, como a criopreservação de gametas, em felinos silvestres aparece como importante ferramenta para a conservação de populações com baixa variabilidade genética. A dificuldade inicial em se desenvolver tais tecnologias consiste em obter amostras representativas de sêmen, o que ainda não é viável por meio das técnicas rotineiramente usadas em animais domésticos. Desta forma, objetivou-se por meio do presente estudo adequar a metodologia de coleta farmacológica de sêmen com sondagem uretral em onças pardas e onças pintadas mantidas em cativeiro e onças pintadas de vida livre. Três onças pardas (*Puma concolor*) de cativeiro e 11 onças pintadas (*Panthera onca*), sendo: seis mantidas em cativeiro e cinco de vida livre, foram anestesiadas com a associação de Medetomidina (0,08-0,1 mg/kg) e Ketamina (5 mg/Kg). Passados entre 20 e 40 minutos da indução anestésica a uretra dos animais foi sondada com uma sonda uretral estéril para gatos, por onde foi possível coletar ejaculado em todos os animais. Por meio desta técnica coletou-se em média 106,7 µL de sêmen nas onças pardas contendo $524,1 \times 10^6$ espermatozoides /mL e 347,2 µL nas onças pintadas contendo $2635,2 \times 10^6$ espermatozoides /mL. As avaliações de vigor, motilidade e patologia espermática demonstraram que a técnica não afeta a qualidade do sêmen em relação às demais metodologias usadas em felinos. Desta forma, a metodologia proposta consiste em uma técnica mais prática e eficiente na coleta de sêmen com boa qualidade, sendo viável de ser empregada tanto em felinos mantidos em cativeiro quanto em vida livre, viabilizando o desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida nessas espécies. OBS: COLOCAR DADOS DE PATOLOGIA

Palavra-chave: Reprodução assistida, *Panthera onca*, *Puma concolor*.

ABSTRACT

Reproductive technologies – as gamete cryopreservation – can be an important tool for feline conservation, especially in populations with low genetic variability. The first point on developing those technologies is to collect representable semen samples, which is not available using the routine methods for domestic animals. We aimed to collect semen from captive cougars and captive and wild jaguars via urethral catheterization using a pharmacological method (CT). Three captive cougar and six captive and five wild jaguars were chemically restrained with a combination of medetomidine (0.08 to 0.1 mg/Kg) and Ketamine (5 mg/Kg). After the medetomidine administration – 20 to 40 minutes – the urethra was catheterized using an urinary tomcat catheter, through we could collect semen from all animals. Using this technique we could collect an average of 106.7 μ l containing 524.1 sperm/ml from the cougars and 347.2 μ l containing 2635.2 sperm/ml from the jaguars. The sperm motility, sperm progressive motility and sperm morphology analysis demonstrated that the methodology don't affect the sperm quality. Thus, we can conclude that the CT is a more practical and efficient method to collect great quality freezable semen from captive and wild felines, which enables developing reproduction assisted technologies in cougar and jaguars.

Key-words: Medetomidine, *Panthera onca*, *Puma concolor*

3.1. Introdução

A onça pintada (*Panthera onca*) e a onça parda (*Puma concolor*) assim como todos os felinos selvagens no mundo, vem sofrendo grandes pressões antrópicas que tem resultado na diminuição das populações de vida livre (Crawshaw, 1991). Devido a essa situação alarmante o governo brasileiro por meio do Ministério do Meio Ambiente editou o Plano Nacional de Conservação da Onça Pintada (PAN Onça Pintada, Portaria MMA nº 132, de 14 de dezembro de 2010) e o da Onça Parda (PAN Onça Parda, Portaria MMA nº 76, de 27 de junho de 2014) com a finalidade de propor ações de pesquisa e manejo dessas espécies em cativeiro e vida livre.

Uma das ações recomendadas em ambos os PAN é o desenvolvimento de programas de reprodução assistida, que têm como objetivo auxiliar no aumento da variabilidade genética das espécies. As tecnologias de reprodução assistida, como a criopreservação de gametas, a inseminação artificial e a fertilização in vitro, permitem a translocação apenas do material genético entre as populações de vida livre ou entre animais de vida livre e cativeiro (Swanson, 1998). Além disso, reduzem os riscos de transmissão de doenças infecciosas e o estresse causado pela translocação dos indivíduos (Wildt, 1990). Desta forma, a consolidação de programas de reprodução assistida possui papel fundamental na conservação de espécies por auxiliar na manutenção de uma população geneticamente viável.

Apesar do progresso nos estudos para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas em felinos silvestres os entraves em desenvolver tais tecnologias iniciam na dificuldade em se obter amostras representativas de sêmen. A obtenção de sêmen de animais de vida livre é ainda mais complexa pois envolve a captura dos animais, muitas vezes em locais que não possuem estrutura adequada para a coleta e manipulação do sêmen. O método de eletroejaculação é a técnica de escolha para coleta de sêmen em felinos silvestres, porém por exigir equipamentos específicos, operador treinado e principalmente resultar em amostras de sêmen muito diluídas e as vezes contaminadas com urina, torna-se uma técnica pouco viável para animais de vida livre (Zambelli et al., 2008; Lueders et al., 2012). Além disso, a estimulação elétrica inerente à eletroejaculação excita o animal exigindo doses anestésicas maiores para garantir a analgesia e a segurança da equipe.

Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas mais práticas de coleta de sêmen torna-se uma importante ferramenta no desenvolvimento de programas de reprodução assistida em felinos como as onças pintadas e onças pardas.

A medetomidina é um alfa-2 agonista que vem sendo usado de forma promissora na coleta de sêmen de felinos (Zambelli et al., 2008; Lueders et al., 2012). Esse fármaco provoca a contração dos ductos deferentes auxiliando a ejaculação (Turner et al., 1995) e já foi testado em gatos e leões africanos, possibilitando a obtenção de amostras concentradas de sêmen em animais anestesiados, dispensando o eletroejaculador e sem perda da qualidade espermática, sendo assim uma técnica promissora a ser aplicada nas demais espécies de felinos (Zambelli et al., 2008; Zambelli, 2010; Lueders et al., 2012; Prochowska, 2014). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi adequar a metodologia de coleta de sêmen com sondagem uretral após aplicação da medetomidina em onças pardas e onças pintadas mantidas em cativeiro e de vida livre.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Animais

Foram usadas três onças pardas (*Puma concolor*) e onze onças pintadas (*Panthera onca*) – seis mantidas em cativeiro e cinco de vida livre. Os felinos de cativeiro eram mantidos em três instituições: duas onças pardas e duas onças pintadas eram mantidas na ONG Mata Ciliar localizada em Jundiá-SP (23°10'41.30"S / 46°56'29.50"O), uma onça pintada e uma onça parda mantidas no Zoológico de Paulínia-SP (22°45'58.40"S / 47° 9'13.60"O) e três onças pintadas mantidas na ONG Nex localizada no município de Corumbá de Goiás-GO (15°51'33.29"S / 48°28'34.44"O). Todos os animais eram mantidos em recintos separados com água ad libitum e dieta a base de carne de bovino e de suíno.

Os animais de vida livre foram capturados nos biomas Pantanal e Caatinga. Duas onças pintadas foram capturadas na Estação Ecológica da Taiamã (ESEC Taiamã, 16°50'34.83"S / 57°35'3.95"O), localizada no Pantanal em Cáceres-MT; duas foram capturadas na região do Rio Negro (Fazenda Barranco Alto, 19°34'38.58"S / 56° 9'12.45"O) localizado no Pantanal em Aquidauana-MS; e uma

foi capturada no Parque Nacional Serra da Capivara (PARNA Serra da Capivara, 8°46'3.05"S / 42°33'38.31"O) localizado na caatinga em São Raimundo Nonato-PI.

A idade dos animais de cativeiro foi obtida em prontuários das respectivas instituições mantenedoras, já para os animais de vida livre a idade foi estimada pela coloração e desgaste dos dentes.

A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Protocolo: 727/2015) e da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo: 79/2015) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Protocolo: 46031-4).

3.2.2. Captura e anestesia

Para a captura dos animais de vida livre foi utilizada a metodologia de armadilhamento de laço, que consiste em um conjunto de estruturas mecânicas modificadas a partir do modelo utilizado na África para a captura de leões (*Panthera leo*; Frank et al., 2003). A fim de evitar danos ao animal, foram conectados transmissores de VHF aos laços que permitiram o monitoramento remoto do momento exato da captura, propiciando uma intervenção rápida.

Os animais mantidos em cativeiro e os de vida livre foram anestesiados usando o mesmo protocolo anestésico, sendo que os animais mantidos em cativeiro ficaram em jejum alimentar de 12 horas antes de serem anestesiados. Foi utilizada a associação de Medetomidina (0,08-0,1 mg/kg, Precision Pharmacy, CA, USA) e Ketamina (5 mg/Kg, Dopalen®, Vetbrands, SP, Brasil) (Filliers et al., 2010), por meio de dardo projetado por arma específica. Após o término dos procedimentos a anestesia foi revertida utilizando o Atipamezole (0,25 mg/kg, Precision Pharmacy, CA, USA) via intramuscular. Os parâmetros vitais (frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura) foram monitorados durante todo o procedimento por um médico veterinário.

3.2.3. Coleta de sêmen por cateterização uretral

O procedimento da sondagem uretral foi realizado entre 20 e 40 minutos após a aplicação do anestésico de forma a permitir a ação da medetomidina sobre a

ejaculação (Lueders et al., 2012). O pênis foi exposto para realizar a limpeza com soro fisiológico e gaze e facilitar a sondagem da uretra. Para cada coleta de sêmen foi utilizada uma sonda uretral estéril para gatos (Tom Cat), de 14 cm de comprimento, descartável, semi flexível e sem janela lateral. A sonda foi lubrificada com soro fisiológico estéril e inserida com bastante cuidado para não machucar a mucosa da uretra. Após este procedimento foi acoplada uma seringa de 1 ml à sonda para facilitar a coleta do sêmen. Logo em seguida, a sonda foi retirada da uretra e o sêmen acondicionado em um tubo graduado mantido a 37°C em banho Maria para avaliação e processamento.

3.2.4. Avaliação e processamento espermático

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto a sua coloração como leitosa (coloração esperada), aquosa (indicativo de amostra muito diluída), amarelada (indicativo de contaminação por urina) ou avermelhada (indicativo de contaminação por sangue). Imediatamente após esta análise, o sêmen foi diluído na proporção 2:1 em meio de manutenção (MM; 24g/L de TRIS, 14 g/L de ácido cítrico, 8 g/L de glicose, 2 g/L de amicanina, 200 g/L de gema de ovo; Nutricell®, SP-Brasil) e mantido em banho Maria a 37°C para ser avaliado. Para uma aferição precisa do volume, foi utilizada uma micropipeta de volume ajustável.

O sêmen foi avaliado quanto ao vigor e motilidade espermática, concentração e morfologia espermática. Uma alíquota de sêmen foi depositada diretamente sobre lâmina de vidro e coberta por lamínula, mantidas a 37°C, e observada em microscópio óptico com contraste de fase (200x). A avaliação subjetiva foi expressa em porcentagem para a motilidade, e escores de zero a cinco para o vigor, sendo zero equivalente à ausência de movimento e cinco representando movimento retilíneo progressivo intenso (CBRA, 2013).

Para a concentração espermática (sptz/mL) foi usada a diluição de sêmen em água destilada na proporção 1:100. Uma alíquota desta diluição foi depositada nos dois lados de uma câmara de Neubauer espelhada e observada em microscópio óptico (200x). A contagem dos espermatozoides foi feita da média da quantidade encontrada nos cinco quadrantes de cada lado. A concentração foi determinada pela fórmula padrão apresentando o número de espermatozoides por ml do ejaculado. $C =$

$5 \times 10 \times N \times D \times 10^3$ sptz /mL. Em que: C é a concentração, 5 é o número de quadrantes contados em cada lado da câmara, 10 é a altura entre câmara e lamínula, N é a média do número de espermatozoides contados em cada lado da câmara, D é o fator de diluição da amostra (100) e 10^3 corresponde à transformação de mm^3 para ml. O total de espermatozoides por ejaculado foi calculado multiplicando-se a concentração pelo volume do ejaculado.

A morfologia espermática foi realizada com uma alíquota de sêmen fixada em formol salino tamponado (1:10). Foram contadas 200 células em preparação úmida utilizando um microscópio de contraste de fase e classificadas em normais ou quanto aos tipos de defeitos maiores e menores (CBRA, 2013).

3.2.5. Análises estatísticas

Os dados obtidos nas análises do sêmen fresco das onças pintadas e onças pardas de cativeiro e das onças pintadas de vida livre foram analisados usando o Test- t da análise Bayesina (Kery, 2010). Os dados que não cumpriram os pressupostos de normalidade, avaliadas usando o teste de Shapiro-Wilk (Royston, 1982) com uma significância de 5%, foram log-transformados. Distribuições posteriores marginais de parâmetros foram estimadas usando o método de Markov Monte Carlo (MCMC). As análises foram implementadas no programa R (R Development Core Team, 2011) usando o pacote rjags (Plummer et al., 2010), versão 3.2.0 JAGS. Cada um dos parâmetros do MCMC foi executado para 100000 interações; as primeiras 20000 interações foram descartadas. A convergência foi avaliada por inspeção visual dos gráficos dos parâmetros do sêmen das onças pintadas de cativeiro e de vida livre para assegurar uma exploração razoável do parâmetro, e garantindo que o fator potencial de redução de escala foi $<1,02$ para cada variável (Gelman e Rubin, 1992). Os resultados foram transformados de volta se necessário. Em cada passo MCMC, calculou-se a Bayesiana equivalente a um valor de p para avaliar se a média de um grupo foi maior do que o outro.

3.3. Resultados

A coleta de sêmen foi efetiva em todos os animais mantidos em cativeiro e nos de vida livre, no entanto, os animais de cativeiro Pc3 (Puma concolor, n3) e Po6 (Panthera onca, n6) só ejacularam líquido seminal (Tabela 1 e 2). As amostras de

sêmen foram coletadas com a introdução da sonda uretral, em média 12 cm e por meio de uma leve pressão negativa na seringa, foi possível a identificação da desembocadura dos ductos ejaculatórios através da movimentação da sonda (Figura 1).



Figura 1. Coleta farmacológica de sêmen, com exposição do pênis para sondagem uretral e coleta do ejaculado

A coloração observada nos ejaculados foi leitosa, com exceção apenas dos animais Pc3 e Po6 que foi translúcida. O volume do ejaculado em onças pintadas variou de 2 a 800 μ L (Tabela 2) e não houve diferença ($p>0,05$) nas médias dos ejaculados entre os animais de cativeiro e de vida livre (Figura 2). Já para as onças pardas o volume variou de 80 μ L a 140 μ L (Tabela 1).

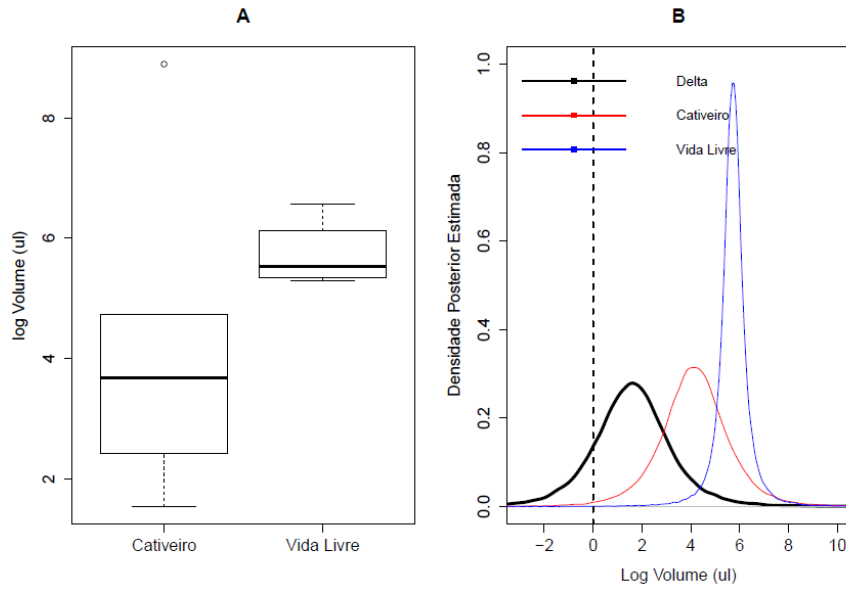


Figura 2: Valores do Volume dos ejaculados das onças pintadas de cativo e vida livre

O vigor espermático mensurado de onças pintadas variou de 3 a 4,5 (Tabela 1) não havendo diferença ($p > 0,05$) entre os animais de cativo e de vida livre (Figura 3), e foi em média 3 em onças pardas (Tabela 1). Já a motilidade espermática do sêmen de onças pintadas (Tabela 2) variou de 50 a 90 % sem diferença ($p > 0,05$) em relação aos animais de cativo e vida livre (Figura 4) enquanto que a média das onças pardas foi de 70 % (Tabela 1).

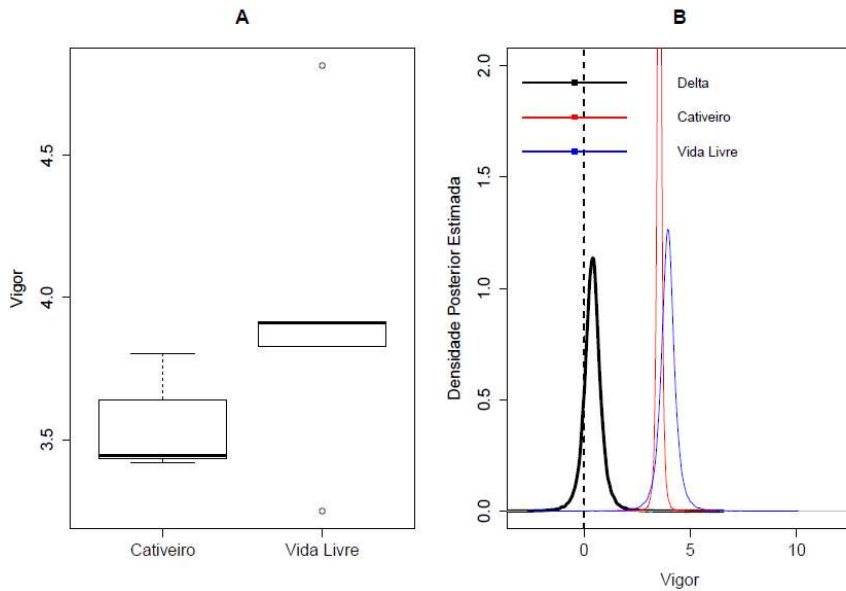


Figura 3. Valores de Vigor do sêmen de onças pintadas de cativo e de vida livre

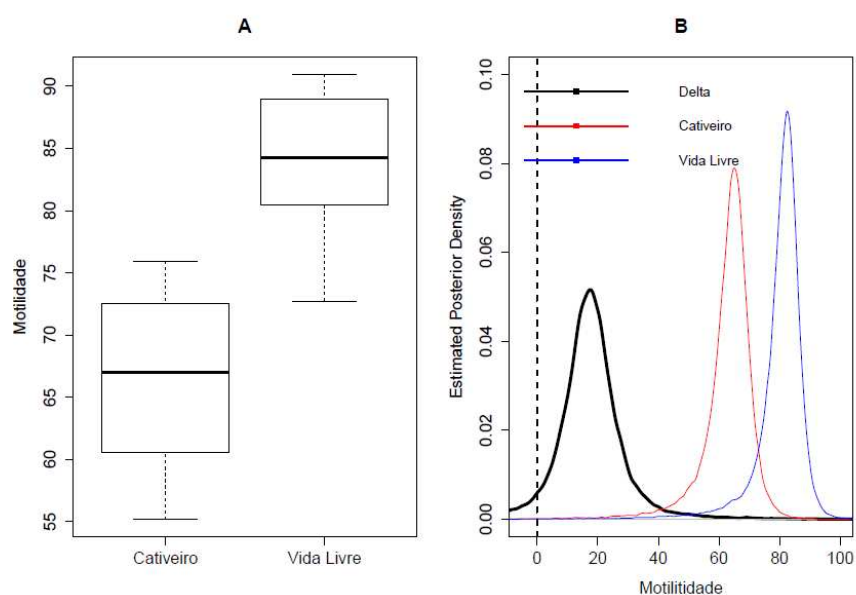


Figura 4. Valores de Motilidade do sêmen de onças pintadas de cativoiro e de vida livre

Tabela 1. Morfometria e avaliação do sêmen coletado por sondagem uretral após aplicação de medetomidina em onças pardas (*Puma concolor*; Pc) mantida em cativoiro (N=3)

Animal	Idade (anos)	Peso (Kg)	Volume (μ l)	Concentração (10^6 sptz/ml)	Espermatozoides por ejaculado (10^6 sptz)	Vigor (0-5)	Motilidade espermática (%)
Pc1	2.5	51	140	485.7	68	3	70
Pc2	3	54	80	562.5	45	3	70
Pc3	20	41	100	NM	NM	NM	NM
Média \pm DV	8,5 \pm 10	48,7 \pm 6,8	106,7 \pm 30,5	524,1 \pm 54,3	56,5 \pm 16,3	3 \pm 0	70 \pm 0

NM – não mensurado

Tabela 2. Morfometria e avaliação do sêmen coletado por sondagem uretral após aplicação de medetomidina em onças pintadas (*Panthera onca*; Po) mantida em cativeiro (N=6) e de vida livre (N=5)

Animal	Origem	Idade (anos)	Peso (Kg)	Volume (µl)	Concentração (10 ⁶ spz/ml)	Espermatozoides por ejaculado (10 ⁶ spz)	Vigor (0-5)	Motilidade (%)
Po1	Cativeiro	3	70	100	1727	173	3	80
Po2	Cativeiro	10	65	115	1939	223	4	85
Po3	Cativeiro	4	52	2	5115	10	4	70
Po4	Cativeiro	7	70	700	1452	1016	3.5	80
Po5	Cativeiro	4	53.4	720	224	161	3.5	50
Po6	Cativeiro	12	60	115	NM	NM	NM	NM
Po7	Pantanal	6	96	390	2185	852	4	80
Po8	Pantanal	8	101	800	2480	1984	4	90
Po9	Pantanal	5	130	NM	NM	NM	4	80
Po10	Pantanal	7	115	350	4350	1523	3	70
Po11	Caatinga	5	37	180	4245	764	4.5	85
Média ± DV		6,45 ± 2,7	77,2 ± 29,2	347,2 ± 295,6	2635,2 ± 1598,1	745,1 ± 680,6	3,75 ± 0,5	77 ± 11,4

NM – não mensurado

A concentração espermática das onças pintadas variou de 224 a 5115 x 10⁶ espermatozoides /mL não havendo diferença (p>0,05; Tabela 2) entre os animais mantidos em cativeiro e os de vida livre (Figura 5). A concentração espermática das onças pardas variou de 485,7 a 562,5 x 10⁶ espermatozoides /mL (Tabela 1).

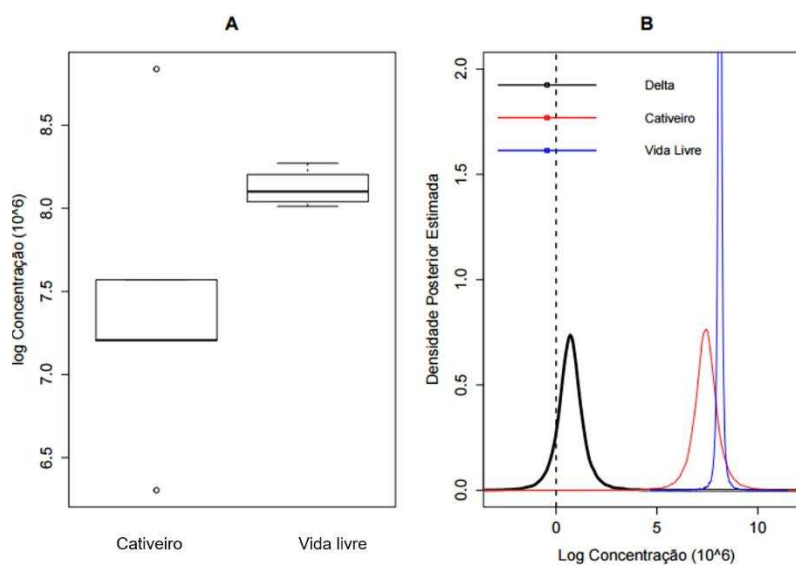


Figura 5. Valores da Concentração do sêmen de onças pintadas de cativeiro e de vida livre

O total de espermatozoides por ejaculado em onças pintadas variou de 10 a 1984 x 10⁶(Tabela 2) sendo que houve diferença (p< 0,05) entre as médias dos animais de cativeiro e de vida livre (316,6 x 10⁶ a 1280,7 x 10⁶, respectivamente) (Figura 6). O total de espermatozoides por ejaculado de onças pardas variou de 45 a 68 x 10⁶ (Tabela 2).

Tabela 3. Avaliação espermática do sêmen de onças pintadas (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro (N=6) e de vida livre (N=5) coletado por sondagem uretral após aplicação de medetomidina.

	Cativeiro	Vida livre
Volume (µL)	292 ± 326,58 ^a	430 ± 262,93 ^a
Concentração (x10 ⁶ /ml)	2091,4 ± 1816,2 ^a	3315 ± 1141,7 ^a
Total espermatozoide/ ejaculado (x10 ⁶)	316,7 ± 399,1 ^a	1280,7 ± 578,5 ^b
Vigor (0-5)	3,6 ± 0,4 ^a	3,9 ± 0,5 ^a
Motilidade (%)	73 ± 14 ^a	81 ± 7,4 ^a

Médias com letras diferentes na mesma linha diferiram entre si (p<0,05)

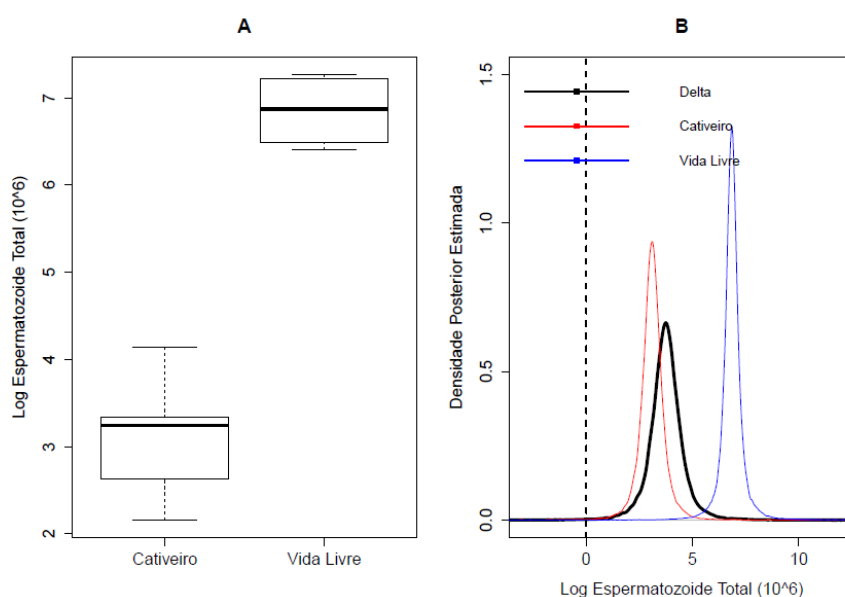


Figura 6. Valores do Total de espermatozoides no sêmen de onças pintadas de cativeiro e de vida livre

O total de patologias espermáticas das onças pintadas de cativeiro, de vida livre e das onças pardas de cativeiro variou de 34 a 49 %, de 25 a 77 % e de 54 a 65 %, respectivamente (Tabela 4). Dentre os animais estudados, o principal defeito maior verificado foi cauda fortemente dobrada e nos defeitos menores foi a cauda dobrada. Não houve diferença (p>0,05) entre as patologias registradas em onças pintadas de cativeiro e vida livre (Tabela 4).

Tabela 4. Morfologia espermática do sêmen de onças pintadas (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro (N=6), vida livre (N=5) e de onças pardas (*Puma concolor*, N=2) coletado por sondagem uretral após aplicação de medetomidina

	Onça pintada		Onça parda
	Cativeiro	Vida livre	Cativeiro
Normal	60,75 ± 6,8 ^a	51,0 ± 22,8 ^a	40,5 ± 7,78
Patologia			
Defeitos maiores	21 ± 6,6	23,4 ± 15,3	41 ± 12,7
Subdesenvolvido	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
Pequeno Anormal	0,25 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Gota citoplasmática proximal	0,5 ± 0,6	1,0 ± 1,4	0,5 ± 0,7
Peça intermediária com edema	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,9	0,5 ± 0,7
Cauda fortemente dobrada	15 ± 7,6	11,2 ± 4,0	25,5 ± 2,1
Cauda fortemente enrolada	5,25 ± 2,9	10,2 ± 14,0	14 ± 12,7
Cauda enrolada na cabeça	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,7
Defeitos menores	18,3 ± 12,2	25,6 ± 19,0	18,5 ± 4,9
Cabeça isolada normal	0,25 ± 0,5	2,0 ± 2,0	0,5 ± 0,7
Gigante	0,25 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Abaxial	0,5 ± 1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Retroaxial	0,25 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Oblíquo	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
Cauda dobrada	12 ± 9,4	17,2 ± 16,3	17,5 ± 3,5
Cauda enrolada	4,25 ± 5	5,2 ± 5,9	0,5 ± 0,7
Cauda dobrada com gota citoplasmática dista	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
Gota citoplasmática distal	0,75 ± 0,5	1 ± 1,7	0,0 ± 0,0

Médias com letras diferentes na mesma linha diferiram entre si (p<0,05)

3.4. Discussão

O resultado do presente estudo apresenta a primeira descrição das características seminais de onças pintadas e de onças pardas, coletado por sondagem uretral após aplicação da Medetomidina (SU). Além disso, apresenta a primeira avaliação seminal de onça pintada de vida livre da Caatinga.

A Medetomidina é um sedativo da classe dos alfa-2-adrenérgicos que possui a maior seletividade para os receptores α_2 e consequentemente maior eficácia dentre os sedativos da categoria (Moens et al., 2003). A utilização de alfa-2-adrenérgicos mostrou-se efetivo na estimulação da ereção e ejaculação em cavalos (Turner et al., 1995), na duração da ereção peniana em Rinoceronte branco (Silinski et al., 2002) e

no aumento da concentração de espermatozoides no ejaculado de cães (Dooley et al., 1990). Zambelli et al. (2007) relatam que a Medetomidina em gatos não causou ereção e nem a ejaculação, mas promoveu a liberação dos espermatozoides na uretra. Esta liberação possivelmente está relacionada à estimulação dos receptores alfa-2-adrenérgicos que promovem a contração dos ductos deferentes, do trígono vesical e do esfíncter da bexiga durante a ejaculação (Turner et al., 1995). Desta forma, apesar da medetomidina não promover ereção ou ejaculação em felinos, ao sondar esses animais foi possível coletar o sêmen liberado na uretra.

Ejaculados foram obtidos em todos os animais do estudo, no entanto uma onça pintada (Po6) e uma onça parda (Pc3) ejacularam apenas líquido seminal. No exame andrológico foi observado que os testículos desses dois indivíduos apresentavam consistência muito firme, indicando possível degeneração testicular grave. A degeneração testicular é a lesão mais frequente associada a infertilidade e baixa qualidade seminal (Elcock e Schoning, 1984). No início se apresenta com flacidez testicular e tamanho da gônada normal a levemente reduzida; em casos mais avançados, o órgão se torna diminuído de volume, com consistência firme à palpação. Dependendo da gravidade da lesão o ejaculado pode conter baixa concentração espermática e elevada taxa de espermatozoides morfológicamente anormais e nos casos mais graves pode ocorrer azospermia (Nascimento e Santos, 2003).

Para diferenciar entre azospermia e ejaculação incompleta (somente fluido prostático) foi realizada na onça pintada aspiração testicular com agulha fina (Da Paz et al, 2003) onde observou-se apenas a presença de raras espermátides arredondadas, demonstrando reduzida atividade espermatogênica e azospermia. A associação entre os resultados da aspiração e palpação testicular indica que neste animal a azospermia estava associada a um processo de degeneração testicular. Uma variedade de agentes é capaz de induzir lesões degenerativas no epitélio seminífero, incluindo idade, nutrição, temperatura, inflamação devido a infecções, trauma ou agentes nocivos (Elcock e Schoning, 1984). A onça pintada em questão tratava-se de um animal de idade avançada (12 anos de idade). A onça parda por sua vez, tratava-se de um animal idoso (20 anos) e por isso não foi submetida a aspiração testicular, no entanto, o quadro geral de idade avançada, consistência testicular muito firme e ausência de espermatozoide no ejaculado é um forte indício de degeneração testicular.

A sonda uretral rígida sem janela lateral usada em gatos (tomcat), devido ao seu diâmetro pequeno, possibilitou uma sondagem tranquila na uretra e facilitou a coleta do sêmen por capilaridade. Além disso, a inserção de 12 cm da sonda foi suficiente para coletar o sêmen nos animais, sem o perigo de sondar a bexiga e contaminar o sêmen com urina. Apenas na coleta de sêmen do animal Po9 foi utilizada uma sonda uretral flexível (n. 4) que prejudicou o processo de coleta, resultando em uma pequena amostra de sêmen, suficiente apenas para análise de vigor e motilidade espermática.

Massagens da próstata via transretal estimulam a glândula auxiliando na liberação dos espermatozoides na uretra e conseqüentemente no aumento do volume do ejaculado. Nos animais Po4 e Po5 foi realizada a massagem prostática com o auxílio de uma probe transretal de 2,5 cm de diâmetro que possibilitou a coleta de um segundo ejaculado. Apesar desse segundo ejaculado ter sido mais diluído em relação ao primeiro, essa prática possibilitou a coleta de maior número de espermatozoides sem comprometer a qualidade espermática (vigor e motilidade espermática) e o processamento do sêmen para a criopreservação. Desta forma, nesses animais o segundo ejaculado foi acrescentado ao primeiro para avaliação e processamento.

Os valores de vigor e motilidade espermática das onças pintadas de cativeiro do presente estudo foram superiores aos registrados por outros autores (Morato et al., 1998; Morato et al., 1999; Morato et al., 2001; Swanson et al., 2003; Da Paz et al., 2003; Morato et al., 2004; Da Paz et al., 2006), assim como dos animais de vida livre (Morato et al., 2001). Já os dados de vigor e motilidade espermática das onças pardas foi superior (2,5 a 3 e 40 a 50%, respectivamente) aos obtidos por Miller et al (1999) e inferior (3,5 e 75%, respectivamente) aos descritos por Deco et al. (2010). Esses resultados demonstram que o procedimento de coleta farmacológica do presente estudo não prejudica a qualidade seminal.

Na comparação das características seminais das onças pintadas de cativeiro e vida livre foi verificada apenas diferença ($p= 0,02$) no total de espermatozoides coletado (Tabela 3). O valor inferior verificado nos animais de cativeiro pode estar relacionado a vários fatores nutricionais, genéticos (não houve seleção genética) e ambientais (Barth e Oko, 1989). Segundo Da Paz et al. (2000) a baixa qualidade

seminal em onças pintadas mantidas em cativeiro pode estar relacionada a deficiência de vitaminas A e E, uma vez que alterações e redução na espermatogênese foram associados a deficiência dessas vitaminas. Nesse mesmo sentido, Morato et al. (1998) relata que a falta de suplementação mineral e vitamínica nas dietas fornecidas pelos zoológicos sul-americanos interferem na qualidade espermática, levando a diminuição da concentração espermática e aumentando a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais, quando comparadas às dietas suplementadas. Outro grande problema citado por esses autores é o estresse que esses animais estão sujeitos no ambiente de cativeiro, causando alteração em sua homeostase e interferindo no ciclo espermatogênico. Possivelmente estes fatores sozinhos ou em combinação estejam afetando a qualidade espermática desses indivíduos, sendo necessário o aprofundamento dos estudos.

A média de espermatozoides morfológicamente anormais observados no presente trabalho foi de 39,5% nas onças pintadas de cativeiro, 49% nas onças pintadas de vida livre e 59,5% nas onças pardas. As principais patologias encontradas na categoria de defeitos maiores para ambas espécies foram cauda fortemente dobrada e cauda fortemente enrolada, enquanto que na categoria de defeitos menores foi observado maior quantidade de cauda dobrada. Segundo Howard et al. (1986) na família Felidae é comum a alta porcentagem de patologias espermáticas, no entanto, a etiologia das anormalidades específicas assim como seu impacto sobre a fertilidade ainda é controversa. Porém dificilmente espermatozoides com defeitos maiores na cabeça, danos acrossomais ou cauda fortemente dobrada podem participar da fertilização (Wildt et al., 1988).

Em estudos com sêmen de onças pintadas verificado na literatura, foi observado que todos utilizaram o método de eletroejaculação para a coleta de sêmen, resultando na obtenção de grandes volumes de ejaculado (5,3 a 11 mL) porém, com concentrações (1,6 a 13,8 $\times 10^6$ sptz/mL) e total de espermatozoides muito baixos (4,56 a 114,4 $\times 10^6$ sptz) (Morato et al., 1998; Morato et al., 1999; Da Paz et al., 2000; Morato et al., 2001; Da Paz et al., 2003; Swanson et al., 2003; Morato et al., 2004; Da Paz et al., 2006; Da Paz et al., 2007). Apesar do volume do ejaculado do presente estudo (347,2 μ L) ter sido inferior aos descritos por esses autores, a concentração espermática foi muito superior (2635,2 $\times 10^6$ sptz/mL), assim como o total de espermatozoides no ejaculado (745,1 $\times 10^6$ sptz). Esses resultados (baixo volume com

grande concentração de espermatozoides por mL e no ejaculado) foram semelhantes aos descritos por Zambelli et al. (2008) em gatos e por Lueders et al. (2012) em leões africanos, utilizando a mesma metodologia do presente trabalho. Da mesma forma, comparando os parâmetros seminais das onças pintadas de vida livre do presente estudo com o único artigo publicado com sêmen de onça pintada de vida livre (Morato et al., 2001), é possível observar que o total de espermatozoides no ejaculado no presente estudo ($1280,7 \times 10^6$ sptz) foi substancialmente maior ao obtido pelo método da eletroejaculação (152×10^6 sptz).

Nas onças pardas o volume do ejaculado foi inferior aos 3,4 mL descritos por Wild et al. (1988) e aos 450 μ L descritos por Deco et al. (2010), usando a eletroejaculação para a coleta de sêmen. Apesar da concentração espermática dos ejaculados do presente estudo ter sido superior aos trabalhos citados, o total de espermatozoides no ejaculado foi menor em relação aos encontrados por esses autores ($74,8 \times 10^6$ sptz, Wild et al (1988); $93,50 \times 10^6$ sptz, Deco et al., 2010). Devido ao reduzido número de onças pardas avaliadas neste trabalho, não é possível afirmar que o resultado inferior em termos de total de espermatozoides coletados é um reflexo da metodologia aplicada, podendo estar relacionado às características dos indivíduos. O volume testicular é correlacionado com a produção espermática, e no presente estudo esses dois indivíduos apresentaram volume testicular (3,2 mL no testículo direito e 2,7 mL no testículo esquerdo) muito inferior ao descrito por Deco et al. (2010) (7,59 mL no testículo direito e 7,49 mL no testículo esquerdo), podendo indicar a diferença de espermatozoides coletados nas duas pesquisas.

No presente estudo a metodologia de coleta proposta não foi confrontada com a metodologia da eletroejaculação, no entanto, as características dos ejaculados coletados foram semelhantes aos obtidos em gatos por Zambelli et al. (2008) quando se compara as duas metodologias de coleta. Apesar das diferenças obtidas nesses protocolos, os resultados na criopreservação e fertilização *in vitro* foram semelhantes (Zambelli et al., 2008). Ainda segundo esses autores o volume pequeno e a concentração espermática elevada na coleta por sondagem uretral podem indicar ausência ou presença mínima de líquido seminal, ao contrário do que ocorre com a metodologia eletroejaculação. Na eletroejaculação ocorre as contrações da musculatura lisa no assoalho da ampola retal do animal que podem aumentar os estímulos na próstata, resultando no aumento do líquido seminal no ejaculado, sendo

necessário na maioria das vezes a centrifugação para corrigir a concentração e retirada do plasma seminal (Ball, 1986). Além disso, diferentes fatores também podem determinar falhas no fechamento do colo da bexiga durante o método da eletroejaculação, possibilitando a contaminação das amostras por urina – tóxica para os espermatozoide - além de ejaculação retrógrada (Howard, 1999). A contaminação do sêmen por urina é o principal problema na eletroejaculação de felinos (Morato et al., 1998). Os ejaculados do presente trabalho apresentaram coloração leitosa, indicando elevada concentração espermática, com exceção dos dois animais azospérmicos em que as amostras eram translúcidas, no entanto em nenhum dos animais houve contaminação da amostra por urina. Desta forma, por meio da coleta farmacológica é possível coletar amostras de sêmen com qualidade semelhante porem mais concentrada em relação a metodologia da eletroejaculação, ainda tendo a vantagem de ser uma técnica simples e prática.

Até o presente momento somente Morato et al. (2001) coletaram e avaliaram sêmen a fresco de onças pintadas de vida livre (N=6). Segundo esses autores, a captura desses animais e a dificuldade de uma logística adequada para a coleta e manipulação do sêmen a campo foram as principais barreiras para realizar a pesquisa com reprodução em animais de vida livre. A metodologia de coleta de sêmen proposta facilitou a logística a campo, por permitir a coleta de amostras com alta concentração de espermatozoides e baixa concentração de líquido prostático, dispensando o uso da centrífuga, e principalmente por se tratar de um procedimento muito mais rápido e prático que a metodologia da eletroejaculação. Outra vantagem do protocolo anestésico proposto para a coleta de sêmen foi a reversão imediata dos efeitos da medetomidina após aplicação do Atipamezole, diminuindo substancialmente o tempo despendido no manejo do animal capturado. Desta forma, a associação da ketamina com a Medetomidina aparece como um protocolo anestésico indicado para sedação de animais a campo independente da intenção de coleta de sêmen.

3.5. Conclusão

A metodologia proposta mostrou-se eficiente para a coleta de sêmen com qualidade em onças pintadas e onças pardas, dispensando o uso da eletroejaculação, sendo ainda prática e segura para ser aplicada em animais de vida livre.

3.6. Referências Bibliográficas

Ball, L. Electroejaculation. In: Klemm WR (Ed). Applied electronics for veterinary medicine and animal physiology. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1986; p.395-441.

Barth, A.D.; Oko, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, 1989; 285p.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, 2013. 104 p.

Central de processamento de dados, Viçosa. (1999). Sistema de análise estatística e genética (SAEG). Minas Gerais, Brasil: Author.

Crawshaw Jr., P. G. Recommendations for study design on research projects on neotropical felids. In: MONDOLFI, E. Felinos de Venezuela: biología, ecología y conservación. Venezuela:Fudeci, 1991. p.187-222.

Da Paz R. C. R.; Zuge R. M.; Barnabe, R. C.; 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 (Impresso), 2007; v. 5, p. 337-344.

Da Paz, R. C. R.; Morato, R. G.; Carciofi, A.; Guimarães, M. A. B. V.; Pessutti, C.; Santos, E. F.; Barnabe, R. C. Nutritional influence on quality of semen of jaguar in captivity. International Zoo Yearbook, Inglaterra, 2006; v. 41.

Da Paz, R. C. R.; Zuge, R. M.; Morato, R. G.; Barnabe, V. H.; Barnabe, R. C.; Fellipe, P. A. N. Capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo-SP, 2000; v. 37, n.6.

Da Paz, R. C. R.; Leme, D. P.; Zuge, R. M.; Pessutti, C.; Santos, E. F.; Barnabe, R. C. Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), em testículos de onça pintada

(*Panthera onca*), utilizada como ferramenta no diagnóstico de infertilidade. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, 2003; v. 40, p. 100-107.

Deco, T. S.; Paula, T. A. R.; Costa, D. S.; Araújo, G. R.; Garay, R.M.; Vasconcelo, G.S. C.; Csermak Junior, A. C.; Carretta-Júnior, M.; Silva, L. C.; Barros, J.B.G. Coleta e avaliação de sêmen de puma (*Puma concolor*, Linnaeus, 1771) adultos mantidos em cativeiro. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, 2010; 34: 252-259.

Dooley, M. P.; Pineda, M. H.; Hopper, J. G.; Hsu, W. H. Retrograde flow of spermatozoa into urinary bladder of cat during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. *Am J Vet Res*, 1991;52: 687–91.

Dooley, M. P.; Pineda, M. H.; Hopper, J. G.; Hsu, W. H. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of dogs during ejaculation or after sedation with xylazine. *Am J Vet Res*, 1990; 51: 1574–9.

Elcock, L. H., and P. Schoning. Age-related changes in the cat testis and epididymis. *American Journal of Veterinary Research*, 1984; 45:2380–2384.

Filliers, M.; Rijsselaere, T.; Bossaert, P.; Zambelli, D.; Anastasi, P.; Hoogewijs M, et al. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two collection techniques. *Theriogenology*, 2010;74:31–9.

Frank, L.; Simpson, D.; Woodroffe, R. Foot snares: an effective method for capturing African lions. *Wildlife Society Bulletin*, 2003; 31(1):309–314.

Gelman, A.; Rubin, D. B. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Stat. Sci.* 1992; doi:10.1214/ss/1177011136

Howard, J. G.; Bush, M.; Wildt, D. E. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow D (Ed.). *Current therapy in theriogenology II*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.1047-1053.

Howard JG. Assisted reproductive techniques in non-domestic carnivores. In: Fowler ME, Miller RE (Ed.), *Zoo and wild animal medicine*. Toronto: Saunders, 1999. p.449-457.

Kery, M. (Ed.), *Introduction-to-WinBUGS-for-Ecologists-Bayesian-approach-to-regression-ANOVA-mixed-models-and-related-analyses*, 1st ed. Elsevier Inc., Amsterdam.2010.

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*, 2012; 78, 696–701.

McCarthy, M. *Bayesian methods for ecology*, 1st ed, Chemistry & biodiversity. Cambridge University Press, New York. 2007. doi:10.1017/CBO9780511802454

Miller, A. M.; Roelke, M. E.; Goodrowe, K. L.; Howard, J. G.; Wildt, D. E. Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (*Felis concolor*). *J Reprod Fertil*, 1990; v.88, p.249-258.

Moens, Y.; Lanz, F.; Doherr, M. G.; Schatzmann, U. A comparison of the antinociceptive effects of xylazine, detomidine and romifidine on experimental pain in horses. *Veterinary Anaesthesia Analgesia*. Davis, 2003; v.30, p.183-190.

Morato, R. G.;Verreschi, I. T. N.; Guimaraes, M. A. B. V.; Cassaro, K.; Pessutti, C.; Barnabe, R. C. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). *Theriogenology*, Estados Unidos, 2004; v. 61, n.7-8, p. 1273-1281.

Morato, R. G.;Conforti, V. A.; Azevedo, F. C. C.; Jacomo, A. T. A.; Silveira, L.; Sana, D.; Nunes, A. L. V.; Guimarães, M. A. B. V.; Barnabe, R. C. Comparative endocrine-ejaculate characteristics of captive versus free living jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction (Cambridge)*, 2001; v. 122, n.5, p. 745-751.

Morato, R. G.; Guimarães, M. A. B. V.; Nunes, A. L. V.; Teixeira, R. H.; Carciofi, A.; Barnabe, V. H.; Barnabe, R. C. Colheita e avaliação espermática em onça pintada. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, Brasil, 1998; v. 35, n.4, p. 198-201.

Morato, R. G.; Guimarães, M. A. B. V.; Ferreira, F.; Verreschi, I. T. N.; Barnabe, R. C. Reproductive characteristics of captive male jaguar. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, Brasil, 1999; v. 36, n.5.

Nascimento, E. F.; Santos, R. L. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. 2.ed. Belo Horizonte, MG:2003.

Plummer, M.; Best, N.; Cowles, K.; Vines, K., 2010. *Coda:Output analysis and diagnostics for MCMC*.

Portaria MMA no 132, de 14 de dezembro de 2010. Plano de ação nacional para a conservação da onça pintada. PAN Onça pintada.

Portaria MMA nº 76, de 27 de junho de 2014. Plano de ação nacional para a conservação da onça preta. PAN Onça preta.

Prochowska, S.; Nizanski, W.; Ochota, M.; Partyka, A. Effect of dilution rate on feline urethral sperm motility, viability, and DNA integrity. *Theriogenology*, 2014; 82 1273–1280.

R Development Core Team, R., 2011. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Found. Stat. Comput., R Foundation for Statistical Computing. doi:10.1007/978-3-540-74686-7

Royston, P. The W test for normality. *Appl. Stat.* 1982.176–180.

Shivaji, S.; Jayaprakash, D.; Patil, S. B. Assessment of inbreeding depression in big cats: testosterone levels and semen analysis. *CurrSci*, 1998;75:923–30.

Silinski, S.; Walzer, C.; Schwarzenberger, F.; Slotta-Bachmayr, L.; Stolla, R. Pharmacological methods of enhancing penile erection for ex-copula semen collection in standing white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). In: European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV), 4th scientific meeting, joint with the annual meeting of the European Wildlife Disease Association (EWDA); 2002.

Swanson, F.W. Curso de extensão – Felinos Selvagens, Biotécnicas reprodutivas e Conservação. Curitiba, Brasil: Setor de ciências biológicas – UFPR. 1998.

Turner, R. M. O.; McDonnell, S. M.; Hawkins, J. F. Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen from stallion with a fractured radius. JAVMA, 1995;12:1906–8.

Swanson, W. F.; Johnson, W. E.; Cambre, R. C.; Citino, S. B.; Quigley, K. B.; Brousset, D. M.; Morais, R. N.; Moreira, N.; O'Brien, S. J.; and Wildt, D. E. Reproductive Status of Endemic Felid Species in American Zoos and Implications for Ex Situ Conservation. Zoo Biology, 2003; 22:421- 441.

Wildt, D. E.; Phillips, L. G.; Simmons, L. G.; Chakraborty, P. K.; Brown, J.L.; Howard, J.G.; Teare, A.; Bush, M. A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard, and puma. Biol Reprod. 1988; v.38, p.245- 255.

Wildt, D.E. Potencial applications of IVF technology for species conservation. IN: Bavisester B.D. Cummins J., Roldan E.R.S (eds). Fertilization in mammals. Serono Symposium, Norwell. 1990; PP. 349-364.

Zambelli, D.; Cunto, M.; Prati, F.; Merlo, B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. Theriogenology, 2007;68:796–803.

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, 2008; 69:485–90.

Zambelli, D.; Raccagni, R.; Cunto, M.; Andreani, G.; Isani, G. Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. Theriogenology, 2010; 74, 1396–1402.

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*, 2008; 69, 485–490.

4. CAPÍTULO 3: Modificação na etapa de resfriamento visando o congelamento de sêmen de grandes felinos a campo

RESUMO

A criopreservação do sêmen possibilita seu armazenamento em bancos de germoplasma e dessa forma pode ser utilizado em programas de reprodução assistida. No entanto essa técnica é extremamente dificultada em trabalho com felinos a campo devido os equipamentos de congelamento necessitarem de energia elétrica. Desta forma, objetivou-se por meio do presente estudo adequar uma metodologia de congelamento de sêmen de grandes felinos com portabilidade adequada para uso a campo. Seis onças pintadas (*Panthera onca*) e três onças pardas (*Puma concolor*) mantidas em cativeiro foram anestesiadas com a associação de Medetomidina (0,08-0,1 mg/kg) e Ketamina (5 mg/Kg). O sêmen foi coletado farmacologicamente, por sondagem uretral e avaliado por testes de rotina. Em seguida foi realizada a etapa de resfriamento em dois tratamentos, um com a metodologia convencional como uso de gelo e água (TA) e a outra com material refrigerante reciclável (TB). A coleta farmacológica foi eficiente no presente estudo uma vez que foi possível coletar ejaculados com qualidade para criopreservação em todos os animais. As amostras descongeladas do sêmen de onças pintadas tiveram redução significativa nos parâmetros de Vigor (TA - 2,3; TB - 2,4) e Motilidade espermática (TA - 31,0; TB - 38,6) e no Teste hiposmótico (TA - 26,4; TB - 24,3) em relação ao sêmen fresco. Já no sêmen descongelado das onças pardas ocorreu diminuição apenas no teste hiposmótico (TA - 13,5; TB - 25). No presente estudo não houve diferença na qualidade do sêmen descongelado entre o Tratamento A e o Tratamento B, quanto aos testes de rotina como também na avaliação por sondas fluorescentes e na análise computadorizada do sêmen em onças pintadas e onças pardas. Dessa forma, a técnica de resfriamento usando gelo reciclável congelado em nitrogênio líquido pode ser usada para a criopreservação de sêmen de onças pintadas e onças pardas, dispensando o uso de energia elétrica para o processamento, sendo assim uma técnica mais prática de ser usada a campo.

Palavras chave: Criopreservação, *Panthera onca*, *Puma concolor*.

ABSTRACT

Sperm cryopreservation enables formation of sperm resource banks, which can be used for assisted reproduction programs. However the technologies available for this purpose are not viable for wild animals, as the device available requires electrical energy. We aimed to adjust the sperm cryopreservation methodology so it can have suitable portability for field programs. Six captive jaguars and three captive cougars were chemically restrained with a combination of medetomidine (0.08 to 0.1 mg/Kg) and Ketamine (5 mg/Kg). Sperm was collected pharmacologically via urethral catheterization and evaluated using routine tests. Then the cooling was done using a standardized method with ice and water (cooling A) and using a recyclable ice frozen at liquid nitrogen (cooling B). The sperm volume varied from 2 to 720 μl for the jaguars and from 80 to 140 μl for the cougars. Sperm concentration varied from 224 to 5115×10^6 sperm/ml for the jaguars and from 485,7 to $562,5 \times 10^6$ sperm/ml for the cougars. All routine analysis (sperm motility, sperm progressive motility, sperm morphology) was higher or similar to the literature. Concerning the cooling treatments, there was no difference in frozen-thawed sperm quality between cooling A and cooling B, in both species. Thereby, the cooling method using recyclable ice frozen in liquid nitrogen can be used for semen cryopreservation in felines, eliminating the need for electric energy. Thus it is a more practical technique to be used in the field.

Key words: Cryopreservation, *Panthera onca*, *Puma concolor*.

4.1. Introdução

A onça pintada (*Panthera onca*) e a onça parda (*Puma concolor*), por ocuparem o topo da cadeia alimentar e desta forma regular a população de outras espécies, possuem papel fundamental no equilíbrio dos ecossistemas onde ocorrem (Crawshaw, 1991). Com a caça e a fragmentação de seu habitat a conservação destas espécies está ameaçada, dentre outros fatores, devido à perda da variabilidade genética das populações (Morato et al., 2001). Neste sentido, a conservação desses felinos depende de uma série de pesquisas e manejos que visem reduzir sua vulnerabilidade. Essas ações estão definidas no Plano de ação nacional para a conservação da onça-pintada (PAN Onça Pintada, Portaria MMA nº 132, de 14 de dezembro de 2010) e o da onça parda (PAN Onça Parda, Portaria MMA nº 76, de 27 de junho de 2014) elaborado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) em parceria com pesquisadores especialistas na área.

Uma das ações recomendadas pelos PANs é estimular a pesquisa em reprodução assistida, que têm como objetivo auxiliar na manutenção de uma população geneticamente viável. Dentre essas técnicas a criopreservação do sêmen possibilita a formação de banco de germoplasma por manter os espermatozoides viáveis por tempo indeterminado (Silva et al., 2004). Além disso, a criopreservação de sêmen permite a translocação apenas do material genético entre as populações, dispensando o deslocamento de indivíduos, o que reduz o estresse causado pela translocação e os riscos de transmissão de doenças infecciosas (Wildt, 1990; Swanson, 1998).

Para ser criopreservado o sêmen deve ser resfriado lentamente a partir da temperatura corporal até 5⁰C para posteriormente ser congelado em vapor de nitrogênio a – 70 ⁰C e em nitrogênio líquido a – 196 ⁰C, onde pode ser mantido por tempo indeterminado (Pukazhenthil et al., 1999; Zambelli et al., 2010). Diversos equipamentos de resfriamento e congelamento automáticos estão disponíveis no mercado, porém são grandes e não dispensam o uso de energia elétrica. Também são comercializados containers portáteis para transporte de sêmen refrigerado que utilizam gelo reciclável, porém a metodologia exige que os gelos recicláveis sejam congelados por 12 horas. Esses equipamentos não são viáveis para serem usados em

campanhas de coleta em animais de vida livre, uma vez que os locais de captura geralmente são de difícil acesso e sem estrutura adequada para a coleta, avaliação e criopreservação do sêmen, principalmente devido à falta de energia elétrica. Esta dificuldade é claramente demonstrada quando avaliamos os artigos publicados em revistas científicas sobre o tema, em que apenas um trabalho descreve as características do sêmen a fresco de onças pintadas em vida livre (Morato et al., 2001), porém nenhum chegou a criopreservar as amostras.

Desta forma, um dos desafios no desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida em felinos de vida livre consiste na falta de equipamentos de resfriamento e congelamento que sejam portáteis e que dispensem o uso de energia elétrica. Objetivou-se, portanto, por meio do presente trabalho desenvolver uma metodologia de criopreservação de sêmen para onças pintadas e onças pardas que seja viável para animais de vida livre.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Animais

Foram usadas seis onças pintadas (*Panthera onca*) e três onças pardas (*Puma concolor*), mantidas por três instituições: Associação Mata Ciliar, Jundiá-SP (23°10'41.30"S / 46°56'29.50"O) - duas onças pardas e duas onças pintadas; Zoológico de Paulínia, Paulínia-SP (22°45'58.40"S / 47° 9'13.60"O) - uma onça pintada e uma onça parda; ONG Nex, Corumbá de Goiás-GO (15°51'33.29"S / 48°28'34.44"O) - três onças pintadas. Todos animais eram mantidos em recintos separados com água ad libitum e dieta a base de carne de bovino e suíno com complementos minerais. A idade dos animais foi obtida em prontuários das respectivas instituições mantenedoras.

A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Protocolo: 727/2015) e da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo: 79/2015) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Protocolo: 46031-4).

4.2.2. Contenção química

Os animais ficaram em jejum alimentar por 12 horas antes de serem anestesiados. Foi utilizada a associação de Medetomidina (0,08-0,1 mg/kg, Precision Pharmacy, CA, USA) e Ketamina (5 mg/Kg, Dopalen®, Vetbrands, SP, Brasil) (Filliers et al., 2010), por meio de dardo projetado por arma específica. Após o término dos procedimentos a anestesia foi revertida utilizando o Atipamezole (0,25 mg/kg, Precision Pharmacy, CA, USA) via intramuscular. Os parâmetros vitais (frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura) foram monitorados durante todo o procedimento por um médico veterinário utilizando um monitor multiparâmetro e cada animal recebeu criterioso acompanhamento até a recuperação da anestesia.

4.2.3. Coleta de sêmen por cateterização uretral

O procedimento da sondagem uretral foi realizado entre 20 e 40 minutos após a aplicação do anestésico de forma a permitir a ação da medetomidina sobre a ejaculação (Lueders et al., 2012). O pênis foi exposto para realizar a limpeza com soro e gaze e facilitar a sondagem da uretra. Para cada coleta de sêmen foi utilizada uma sonda uretral estéril para gatos, de 14 cm de comprimento, descartável, semi flexível e sem janela lateral. A sonda foi lubrificada com soro fisiológico estéril e inserida com bastante cuidado para não machucar a mucosa da uretra. Após este procedimento foi acoplada uma seringa de 1 ml à sonda para facilitar a coleta do sêmen. Logo em seguida, a sonda foi retirada da uretra e o sêmen acondicionado em um tubo graduado mantido a 37°C em banho maria para avaliação e processamento.

4.2.4. Avaliação espermática e processamento do sêmen fresco

Imediatamente após a coleta o sêmen foi diluído na proporção 2:1 em meio de manutenção (MM; 24g/L de TRIS, 14 g/L de ácido cítrico, 8 g/L de glicose, 2 g/L de amicanina, 200 g/L de gema de ovo; Nutricell®, SP-Brasil) e mantido em banho Maria a 37°C para ser avaliado. Para uma aferição precisa do volume, foi utilizada uma micropipeta de volume ajustável.

O sêmen foi avaliado quanto ao vigor e motilidade espermática. Uma alíquota de sêmen foi depositada diretamente sobre lâmina de vidro e coberta por lamínula, mantidas a 37°C, e observada em microscópio óptico (200x). A avaliação subjetiva foi expressa em porcentagem para a motilidade, e escores de zero a cinco para o

vigor, sendo zero equivalente à ausência de movimento e cinco representando movimento retilíneo progressivo intenso (CBRA, 2013).

Para a concentração espermática (sptz/ mL) foi usada a diluição de sêmen em água destilada na proporção 1:100. Uma alíquota desta diluição foi depositada nos dois lados de uma câmara de Neubauer espelhada e observada em microscópio óptico (200x). A contagem dos espermatozoides foi obtida pela média da quantidade encontrada nos cinco quadrantes de cada lado. A concentração foi determinada pela fórmula padrão apresentando o número de espermatozoides por ml do ejaculado. $C = 5 \times 10 \times N \times D \times 10^3$ sptz/ ml. Em que C é a concentração, 5 é o número de quadrantes contados em cada lado da câmara, 10 é a altura entre câmara e lamínula, N é a média do número de espermatozoides contados em cada lado da câmara, D é o fator de diluição da amostra (100) e 10^3 corresponde à transformação de mm^3 para ml. O total de espermatozoides por ejaculado foi calculado multiplicando-se a concentração pelo volume do ejaculado.

Para o teste hiposmótico: uma alíquota de 20 μL do sêmen diluído será incubada com 250 μL de solução de sacarose, a 150 mOsmol/kg por 30 minutos a 38°C. Posteriormente será fixada com em formol salino tamponado para posterior avaliação em microscópio de contraste de fase. No teste hiposmótico, serão classificados 200 espermatozoides em duas populações: cauda alterada (englobando caudas enroladas, dobradas, fortemente enroladas e fortemente dobradas) e cauda normal, indicando membrana plasmática funcional ou lesada, respectivamente (Kumi-diaka, 1993). O valor bruto de espermatozoides reativos será corrigido excluindo-se da população total a parcela com as mesmas características contabilizadas no teste de patologia (CBRA, 2013).

A morfologia espermática foi realizada com uma alíquota de sêmen fixada em formol salino tamponado (1:10). Foram contadas 200 células utilizando um microscópio de contraste de fase e classificadas em normais ou quanto aos tipos de defeitos maiores, menores e defeitos totais (CBRA, 2013).

4.2.5. Criopreservação

Para a criopreservação, amostras do sêmen foram padronizadas na concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL a partir de diluição com meio de

manutenção. Posteriormente foram rediluídas em meio de congelamento na proporção 1:1 (TGE: TRIS-Glicerol-Equex (12% de glicerol, 1% de Equex STM Paste[®] diluídos em MM) e envasadas em palhetas de 0,25mL.

Em cada animal foram testados dois métodos de resfriamento:

Tratamento A: Foi utilizado a metodologia convencional ao Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Animais Silvestres do departamento de veterinária da Universidade Federal de Viçosa, o qual foi desenvolvido para uma curva – 0,53 °C até a estabilização em 5 °C. Para tal foi utilizado recipiente térmico de 12 L com tampa, contendo em seu interior uma mistura de água em temperatura ambiente e gelo, ocupando uma altura de 11cm (Deco-Souza et al., 2013). Para este método, as palhetas foram colocadas em tubo de ensaio de vidro com tampa rosqueada e este foi imerso em um frasco de vidro com tampa contendo 600 mL de água a 37°C. Este conjunto foi colocado no recipiente térmico onde permaneceu por uma hora e meia.

Tratamento B: usando um recipiente térmico de 4,26 L com tampa, contendo em seu interior nove blocos de 81 cm³ cada de gelo reciclável Ice Foam[®] (Polar técnica, SP - Brasil) que foram mantidos imersos em Nitrogênio líquido até o momento do processamento. Para este método, as palhetas foram colocadas em tubo de ensaio de vidro com tampa rosqueada e este foi imerso em um frasco de vidro com tampa contendo 600 mL de água a 37°C (Figura 1). Este conjunto foi colocado no recipiente térmico circundado pelos blocos de gelo reciclável, onde permaneceu por uma hora e meia. A quantidade de blocos de gelo reciclável foi previamente definida para alcançar a curva de resfriamento semelhante ao método convencional.



Figura 1. Confeção dos blocos com gelo reciclável (A e B), congelamento e manutenção em botijão criogênico (C) e resfriamento do sêmen (D)

As palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido, usando um suporte onde as palhetas foram postas horizontalmente e permaneceram a uma altura de 10 cm sobre uma lâmina de 3cm de nitrogênio líquido em caixa isotérmica de 12L, por 15 minutos (Deco-Souza et al., 2013) e posteriormente foram imersas em nitrogênio líquido.

As palhetas foram descongeladas em banho Maria a 37°C por 1 minuto para avaliação da qualidade espermática pós descongelamento e comparação da qualidade espermática entre os dois métodos de resfriamento usados.

4.2.6. Avaliação do sêmen descongelado

A avaliação do sêmen descongelado foi semelhante à realizada com o sêmen a fresco, com a inclusão da análise seminal por sondas fluorescentes e análise computadorizada pelo software Computer Assisted Sperm Analysis (CASA).

Foram utilizadas sondas fluorescentes para a avaliação das membranas plasmática e acrossomal. Para tal foi usada a associação de três sondas fluorescentes: o iodeto de propídio (IP) que cora a membrana plasmática lesionada, o Hoechst 33342 (H342) que cora a membrana plasmática íntegra e o Aglutinina Pisium Sativum conjugada com Isotiocionato de Fluoresceína (FITC-PSA) que cora a membrana acrossomal lesionada. Para isso, foram adicionadas 2 µL de IP (0,5 mg/mL em DPBS), 10 µL de Hoechst 33342 (25 µg/mL em DPBS) e 60 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS) em microtubo contendo 10 µL do sêmen (Araujo, et al. 2015). O sêmen foi incubado por 8 minutos a 38°C, mantido sob escuro, e uma gota foi visualizada em microscópio de epifluorescência com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm) (Nikon H550S) nos aumentos de 400 e 1000 vezes. Foram contabilizadas 200 células por análise e os resultados expressos em número de células coradas.

Para a avaliação computadorizada do sêmen descongelado foi utilizado o software Sperm Class Analyzer (SCA[®]), utilizando a mesma configuração de Lueders et al (2012). Uma alíquota de 4 µl do sêmen na concentração de 25 x 10⁶ espermatozoides/ml foi depositada em lâmina específica para o sistema. As características analisadas foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade do trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade

curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

4.2.7. Análises estatísticas

Avaliou-se os parâmetros de qualidade espermática entre o Resfriamento A e o Resfriamento B usando teste – T Bayesiano com variâncias desiguais (Kery, 2010). Além disso, avaliou-se os grupos sêmen fresco, Resfriamento A e Resfriamento B usando análise de variância simples (one-way ANOVA) com efeito fixo com modelagem hierárquica Bayesiana. Este método de análise permite inferir sobre a população e fornece indicativos da probabilidade de que os parâmetros estimados para cada grupo derivaram da mesma distribuição. De acordo com McCarthy (2007) and Kery (2010) o modelo de especificação foi:

$$y_{ijk} = \alpha_j(i) + \epsilon_i$$

$$\epsilon_i \sim \text{Normal}(0, \sigma^2)$$

Em que: y_{ijk} corresponde ao parâmetro observado k do animal i na população j , $\alpha_j(i)$ corresponde ao valor esperado para os parâmetros na população j , e ϵ_i residual corresponde ao desvio aleatório do parâmetro espermático do animal i da média da sua população $\alpha_j(i)$. Observações que não atenderam as premissas de normalidade, acessada por meio do teste Shapiro-Wilk (Royston, 1982) com significância de 5% foram Log transformados. As distribuições marginais posteriores dos parâmetros foram estimadas usando o método Markovchain Monte Carlo (MCMC). As análises foram implementadas no programa R (R Development Core Team, 2011) usando o pacote rjags (Plummer et al., 2010), versão JAGS 3.2.0. Cada uma das cadeias de MCMC foi avaliada para 100000 iterações; as primeiras 20000 iterações foram descartadas (burn-in). A convergência foi acessada por inspeção visual dos gráficos de rastreamento para garantir uma exploração razoável do parâmetro e pela garantia de que a redução do fator da escala potencial foi $<1,02$ para cada variável (Gelman and Rubin, 1992). Os resultados foram transformados de volta se necessário. A cada passo do MCMC, calculou-se o equivalente Bayesiano por um valor de p avaliando se a média de um grupo foi maior que a média de outro.

O teste de correlação de Pearson foi realizado nos parâmetros da qualidade do sêmen descongelado nos tratamentos A e B em onças pintadas e onças pardas, utilizando pacote estatístico SAEG (1999).

4.3. Resultados

A coleta de sêmen foi efetiva em todos os animais, no entanto, uma onça parda e uma onça pintada só ejacularam líquido seminal e por isso não entraram na estatística dos tratamentos. A coloração observada nos ejaculados foi leitosa, com exceção apenas desses animais em que a coloração foi translúcida.

A sondagem uretral após aplicação da Medetomidina permitiu a coleta de ejaculados de onças pintadas e onças pardas com volume e concentração suficientes para serem processados (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão da morfometria e avaliação do sêmen coletado por sondagem uretral em onças pintadas (*Panthera onca*, Po; N=6) e onças pardas (*Puma concolor*; Pc; N=3) mantidas em cativeiro.

	Onça pintada	Onça parda
Idade (anos)	6,7 ± 3,7	8,5 ± 10,0
Peso (Kg)	61,7 ± 7,9	48,7 ± 6,8
Volume (µl)	292,0 ± 326,6	106,7 ± 30,6
Concentração (10 ⁶ sptz/ml)	2091,4 ± 1816,2	524,1 ± 54,3
Espermatozoides por ejaculado (10 ⁶ sptz)	316,6 ± 399,0	56,5 ± 16,3

Nas onças pintadas houve diferença para o vigor e a motilidade espermática entre o sêmen fresco e os descongelados nos dois tratamentos (Tabela 2; Figura 2).

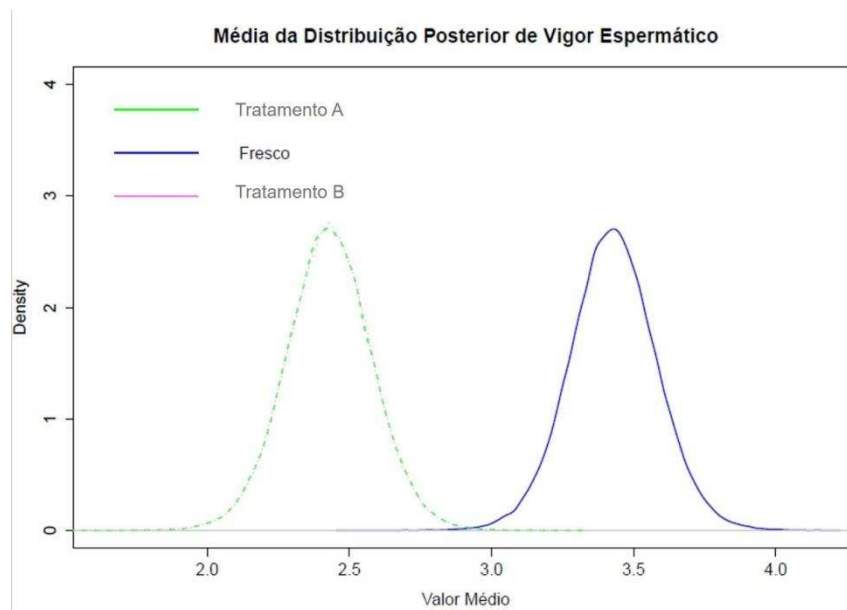


Figura 2. Valores médios do vigor espermático de onças pintadas entre os tratamentos fresco, tratamento A e tratamento B.

A motilidade espermática também variou ($p < 0,05$) (Figura 3) entre o sêmen fresco e os tratamentos A e B, variando de 50 a 85 % no sêmen fresco, de 10 a 60 % no tratamento A e de 10 a 50 % no tratamento B.

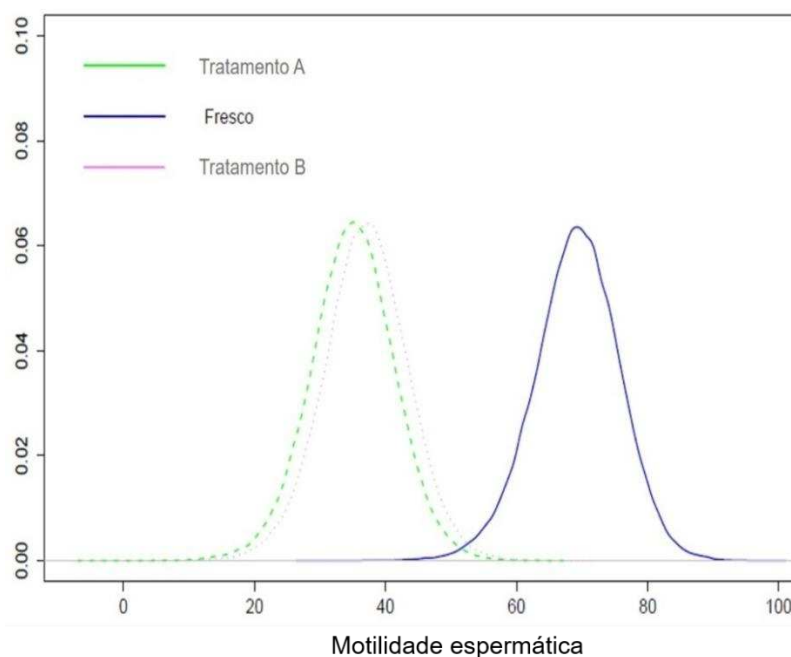


Figura 3. Valores médios da motilidade espermática de onças pintadas entre os tratamentos fresco, tratamento A e tratamento B.

No teste hiposmótico também foi observado redução dos valores médios dos espermatozoides pós descongelamento dos tratamentos A e B em relação ao sêmen a

fresco (Figura 4). Na avaliação da morfologia espermática das onças pintadas foi observada variação de 51 a 66 % de espermatozoides normais no sêmen a fresco. Em ambos os tratamentos A e B ocorreu uma diminuição ($p < 0,05$) no percentual de espermatozoides normais em relação ao sêmen fresco (Tabela 3). No entanto, não foram observadas diferenças nas análises entre os tratamentos A e B em onças pintadas, como observado nas Tabela 2 e 3.

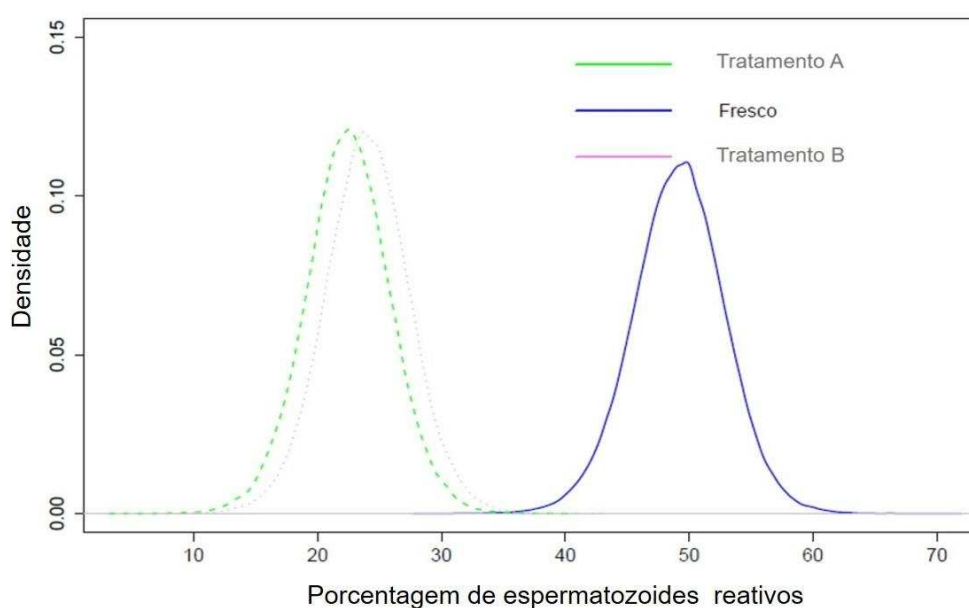


Figura 4. Valores médios da porcentagem de espermatozoides reativos de onças pintadas entre os tratamentos fresco, tratamento A e tratamento B.

Tabela 2. Média e desvio padrão da avaliação espermática do sêmen a fresco e descongelado de onças pintadas (*Panthera onca*; N=5) mantidas em cativeiro.

	Fresco	Descongelado	
		Resfriamento A	Resfriamento B
Vigor	$3,6 \pm 0,4^a$	$2,3 \pm 0,3^b$	$2,4 \pm 0,3^b$
Motilidade	$73,0 \pm 14^a$	$31,0 \pm 19^b$	$38,6 \pm 17,7^b$
Teste hiposmótico	$55,0 \pm 9,55^a$	$26,4 \pm 5,8^b$	$24,3 \pm 6,5^b$
Iodeto de propídeo		$55,0 \pm 19^a$	$42,3 \pm 10,2^a$
Hoechst 33342		$21,2 \pm 15,6^a$	$27,9 \pm 14,5^a$
FITC-PNA		$24,0 \pm 16^a$	$29,9 \pm 16^a$
Motilidade total		$28,4 \pm 14^a$	$28,8 \pm 5,9^a$
Motilidade progressiva		$2,0 \pm 1,9^a$	$1,8 \pm 1,2^a$
VAP		$10,5 \pm 4,5^a$	$10,5 \pm 3,4^a$

VSL	6,6 ± 4,3 ^a	6,8 ± 3,1 ^a
VCL	23,5 ± 6,4 ^a	23,5 ± 3,8 ^a
ALH	2,2 ± 1,8 ^a	2,1 ± 1,4 ^a
BCF	7,2 ± 6,2 ^a	8,5 ± 6,2 ^a
STR	58,6 ± 13,4 ^a	62,0 ± 12,5 ^a
LIN	26,3 ± 11,4 ^a	27,8 ± 9,7 ^a

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

VAP - velocidade do trajeto ($\mu\text{m/s}$); VSL - velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$); VCL - velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$); ALH - deslocamento lateral da cabeça (μm); BCF - frequência de batimento (Hz); STR - retilinearidade (%); LIN - linearidade (%).

Nas onças pintadas foi realizado testes de correlação com os parâmetros estudados em cada tratamento. No tratamento A foi observado alta correlação do teste hiposmótico com a velocidade média da trajetória (VAP; $r = 0,94$; $p = 0,02$), a velocidade linear progressiva (VSL; $r = 0,95$; $p = 0,01$), a velocidade curvilínea (VCL; $r = 0,88$; $p = 0,05$) e com a Retilinearidade (STR; $r = 0,93$; $p = 0,03$). Ocorreu também correlação do vigor espermático desse tratamento com a amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; $r = 0,98$; $p = 0,003$) e com a frequência de batimento flagelar cruzado (BCF; $r = 0,95$; $p = 0,01$). No tratamento B foi observado correlação do Vigor espermático com a velocidade curvilínea (VCL; $r = 0,88$; $p = 0,05$), a amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; $r = 0,98$; $p = 0,003$) e com a frequência de batimento flagelar cruzado (BCF; $r = 0,95$; $p = 0,01$).

Tabela 3. Média e desvio padrão da morfologia espermática do sêmen a fresco e descongelado em onças pintadas (*Panthera onca*; N=5) e onças pardas (*Puma concolor*; N=2) mantidas em cativeiro

	Onça Pintada			Onça Parda		
	Fresco	Resfriamento A	Resfriamento B	Fresco	Resfriamento A	Resfriamento B
Normal	60,75 ± 6,8 ^a	46 ± 11,4 ^b	47,8 ± 5,3 ^b	40,5 ± 7,8 ^d	23,5 ± 2,1 ^d	31,5 ± 0,7 ^d
Defeitos Maiores	21 ± 6,6 ^a	24,6 ± 12,6 ^a	24,8 ± 6,4 ^a	41 ± 12,7 ^d	26,5 ± 2,1 ^d	36 ± 5,6 ^d
Defeitos Menores	18,25 ± 12,2 ^a	29,4 ± 7,6 ^a	27,4 ± 3,9 ^a	18,5 ± 4,9 ^d	44,5 ± 6,4 ^e	32,5 ± 6,4 ^{d,e}

Médias com letras diferentes na mesma linha diferiram entre si ($p < 0,05$).

Nas onças pardas foi observada diferença nos valores médios do teste hiposmótico do sêmen fresco com os tratamentos A e B e diferença dos defeitos menores no sêmen fresco com o tratamento A. Nas demais análises não foram observadas diferenças entre os tratamentos A e B em onças pardas (Tabela 3 e 4).

Tabela 4. Média e desvio padrão da avaliação seminal do sêmen a fresco e descongelado em onças pardas (*Puma concolor*; N=2) mantidas em cativeiro.

	Fresco	Descongelado	
		Resfriamento A	Resfriamento B
Vigor	3,0 ± 0 ^a	2,8 ± 0,3 ^a	2,8 ± 0,3 ^a
Motilidade	70,0 ± 0 ^a	50,0 ± 14,1 ^a	50,0 ± 14,1 ^a
Teste hiposmótico	39,5 ± 6,4 ^a	13,5 ± 3,5 ^b	25,0 ± 1,4 ^b
Iodeto de propídeo		38,0 ± 1,4 ^a	50,5 ± 6,4 ^a
Hoest 33342		44,0 ± 9,9 ^a	39,0 ± 12,7 ^a
FITC-PNA		18,0 ± 8,5 ^a	10,5 ± 6,4 ^a
Motilidade total		40,0 ± 4,7 ^a	36,3 ± 3,2 ^a
Motilidade progressiva		6,3 ± 1,7 ^a	5,8 ± 4,3 ^a
VAP		20,8 ± 4,6 ^a	21,3 ± 4,1 ^a
VSL		13,7 ± 4,3 ^a	14,7 ± 3,9 ^a
VCL		40,7 ± 6,7 ^a	39,6 ± 9,2 ^a
ALH		3,6 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,3 ^a
BCF		12,9 ± 2,8 ^a	14,3 ± 1,7 ^a
STR		65,3 ± 6,3 ^a	68,4 ± 5,3 ^a
LIN		33,3 ± 5,1 ^a	36,9 ± 1,3 ^a

Médias com letras diferentes na mesma linha diferiram entre si ($p < 0,05$).

VAP - velocidade do trajeto ($\mu\text{m/s}$); VSL - velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$); VCL - velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$); ALH - deslocamento lateral da cabeça (μm); BCF - frequência de batimento (Hz); STR - retilinearidade (%); LIN - linearidade (%).

4.4. Discussão

Até o presente momento, todos os estudos com reprodução de onças pintadas e onças pardas utilizaram a eletroejaculação para a obtenção de sêmen. Na eletroejaculação ocorrem contrações da musculatura lisa no assoalho da ampola retal que podem aumentar os estímulos na próstata, resultando no aumento do líquido seminal no ejaculado, sendo necessário na maioria das vezes a centrifugação para corrigir a concentração e retirada do plasma seminal (Ball, 1986). Além disso, diferentes fatores também podem determinar falhas no fechamento do colo da bexiga durante a eletroejaculação, possibilitando a contaminação das amostras por urina – tóxica aos espermatozoides - além de ejaculação retrógrada (Howard, 1999). A

contaminação do sêmen por urina é o principal problema do método de coleta por eletroejaculação em felinos (Morato et al., 1998).

Diante dessa problemática, a coleta de sêmen por sondagem uretral após aplicação da Medetomidina (SU) desenvolvida por Zambelli et al (2007) em gatos domésticos, apresenta-se como alternativa eficiente, uma vez que no presente estudo possibilitou a coleta de ejaculado em todos os animais. Os ejaculados do presente estudo apresentaram coloração leitosa, com exceção de uma onça pintada e uma onça preta em que as amostras eram azospérmicas e translúcidas, no entanto em nenhum dos animais houve contaminação da amostra por urina.

Em estudos com sêmen de onças pintadas, foi observado que todas as coletas de sêmen por eletroejaculação resultaram na obtenção de grandes volumes de ejaculado (5,3 a 11 mL), porém com concentrações (1,6 a 13,8 x10⁶sptz/mL) e total de espermatozoides muito baixos (4,56 a 114,4 x10⁶sptz) (Morato et al., 1998; Morato et al., 1999; Da Paz et al., 2000; Morato et al., 2001; Swanson et al., 2003; Da Paz et al., 2003; Morato et al., 2004; Da Paz et al., 2006; Da Paz et al., 2007). Apesar do volume do ejaculado do presente estudo (347,2 µL) ter sido inferior aos descritos por esses autores, a concentração espermática foi muito superior (2635,2 x10⁶ sptz/mL) resultando em maior concentração no total de espermatozoides no ejaculado (745,1 x10⁶ sptz). Esses resultados foram semelhantes aos descritos por Zambelli et al. (2008) em gatos domésticos e por Lueders et al. (2012) em leões africanos, que utilizaram a mesma metodologia. Desta forma, os ejaculados coletados por meio da SU apresentam qualidade superior para serem criopreservados em relação aos coletados pelo método de eletroejaculação.

Nas onças pretas, o volume do ejaculado foi inferior aos 3,4 mL descritos por Wild et al. (1988) e aos 450 µL descritos por Deco et al. (2010), sendo que ambos utilizaram o método da eletroejaculação para a coleta de sêmen. Apesar da concentração espermática do presente estudo ter sido superior aos trabalhos citados, o total de espermatozoides no ejaculado foi menor em relação aos encontrados por esses autores (74,8 x 10⁶sptz/ejaculado e 93,50 x 10⁶sptz/ejaculado, respectivamente). No entanto, devido ao reduzido número de onças pretas avaliadas neste estudo, não é possível afirmar que o resultado inferior em termos de total de espermatozoides no ejaculado é um reflexo da metodologia aplicada, podendo estar

relacionado as características dos indivíduos. De qualquer forma, os ejaculados coletados apresentaram volumes e concentrações suficientes para serem criopreservados, usando uma técnica muito mais prática em relação a eletroejaculação.

Os valores de vigor e motilidade espermática (3,6 e 76%, respectivamente) em onças pintadas foram superiores aos descritos na literatura para a espécie, com o vigor espermático variando de 2,2 a 3,3 e a motilidade espermática variando de 50,6 a 64% (Morato et al., 1998; Morato et al., 1999; Morato et al., 2001; Swanson et al., 2003; Da Paz et al., 2003; Morato et al., 2004; Da Paz et al., 2006). Os parâmetros de vigor e motilidade do sêmen fresco de onças pardas, por sua vez, foram superiores aos encontrados por Miller et al. (1999) em onças pardas nos Estados Unidos (2,5 a 3 e 40 a 50%, respectivamente) e semelhantes aos descritos por Deco et al. (2010) em onças pardas no Brasil (3,5 e 75%, respectivamente). Ambos os parâmetros foram considerados com boa qualidade para criopreservação em ambas espécies.

As onças pintadas apresentaram boa porcentagem de espermatozoides normais no sêmen a fresco, com média superior aos descritos por outros autores (Morato et al., 1998 – 46,7%; Morato et al., 1999 – 49%; Da Paz et al., 2000 – 31,7%; Morato et al., 2001 – 50%; Swanson et al., 2003 – 57,3%; Da Paz et al., 2003 – 48,7%). Já as onças pardas a porcentagem de espermatozoides normais no sêmen a fresco foi inferior em comparação as onças pintadas, mas sua média foi superior a maioria dos estudos publicados com onças pardas (Wildt et al., 1988 – 26%; Miller et al., 1990 – 1 a 18%; Pukazhenti et al., 2001 – 8,6%) com exceção apenas aos 46,13 % descrito por Deco et al. (2010). As principais patologias encontradas na categoria de defeitos maiores para ambas as espécies foram cauda fortemente dobrada e cauda fortemente enrolada, enquanto que na categoria de defeitos menores foi observada maior quantidade de cauda dobrada. Segundo Howard et al. (1986) na família Felidae é comum a alta porcentagem de patologias espermáticas, no entanto, a etiologia das anormalidades específicas assim como seu impacto sobre a fertilidade ainda é controversa. Porém, dificilmente espermatozoides com defeitos maiores na cabeça, danos acrossomais ou cauda fortemente dobrada podem participar da fertilização (Wildt et al., 1988).

Em relação a qualidade do sêmen descongelado do presente estudo, houve redução ($p < 0,05$) do vigor e motilidade espermática, porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico e espermatozoides normais de ambos tratamentos (A e B) em relação ao sêmen fresco de onça pintada. Nas onças pardas ocorreu redução apenas do número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico de ambos tratamentos (A e B) em relação ao sêmen a fresco e redução dos defeitos menores do tratamento A em relação ao sêmen fresco. A queda na qualidade do sêmen descongelado é causada pelo processo da criopreservação, que provoca danos aos espermatozoides prejudicando sua capacidade de fertilização. No entanto, baixos valores de vigor e motilidade podem ser compensados depositando o sêmen mais próximo ao local da fertilização, aumentando assim a taxa de fertilidade (Villaverde e Lopes, 2007). Apesar da redução na qualidade do sêmen descongelado em ambas as espécies, os valores de vigor e motilidade foram semelhantes aos descritos em onça pintada (Da Paz et al., 2000 – vigor: 2,7 e motilidade 30%; Da Paz et al., 2007 – vigor 3,1 e motilidade 26,7%), como também semelhantes ao encontrado na literatura para onças pardas (Deco et al., 2013 – vigor 2,5 e motilidade 42 %).

Segundo os dados obtidos na literatura, o presente estudo foi o primeiro a utilizar avaliação computadorizada (CASA) no sêmen de onças pintadas e onças pardas. Na avaliação da fertilidade humana e animal já foi observado que os parâmetros VAP, VSL e VCL foram maiores em amostras que produziram mais de 50% de ovócitos fertilizados e que também espermatozoides com LIN e BCF elevados apresentam melhor migração e penetração no muco cervical (Mortimer, 2000; Versteegen et al., 2002). Esses parâmetros foram correlacionados com os testes de rotina utilizados nesse estudo e observou-se que no tratamento A de onças pintadas ocorreu alta correlação da velocidade média da trajetória (VAP; $r= 0,94$; $p= 0,02$), da velocidade linear progressiva (VSL; $r= 0,95$; $p= 0,01$) e da velocidade curvilínea (VCL; $r= 0,88$; $p= 0,05$) com o teste hiposmótico. Ocorreu também correlação da amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; $r= 0,98$; $p= 0,003$) e da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF; $r= 0,95$; $p= 0,01$) com o vigor espermático. No tratamento B, ainda em onças pintadas, foi observado correlação da velocidade curvilínea (VCL; $r= 0,88$; $p= 0,05$), da amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; $r= 0,98$; $p= 0,003$) e da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF; $r= 0,95$; $p= 0,01$) com o vigor espermático. Os valores de VAP, VSL e VCL

demonstram a qualidade da movimentação dos espermatozoides. Já os parâmetros de VCL e LIN foram correlacionados com espermatozoides hiperativados em ratos e que possuíam grande capacidade de fertilização (Cancel et al., 2000). No entanto, o processo de hiperativação também pode ser induzido pela criopreservação e nessa situação ocorre a redução da sobrevivência do espermatozoide (Jayaprakash et al., 2001).

Apesar do sistema CASA reduzir a subjetividade das avaliações seminais, ainda é necessário aprofundar os estudos principalmente em espécies que possuem espermatozoides pequenos - como é o caso dos felinos - que muitas vezes são confundidos com partículas do próprio meio de manutenção, prejudicando a leitura e interpretação da análise. Além disso, essa metodologia utiliza equipamento difícil de ser levado em trabalhos a campo, principalmente pela fragilidade e necessidade do uso de energia elétrica. Dessa forma, os testes de rotina ainda são essenciais para avaliação da qualidade seminal. A correlação obtida entre o teste hiposmótico e alguns dos parâmetros avaliados pelo CASA indicam que este teste é de grande importância para avaliação espermática, principalmente nas situações em que os métodos mais sofisticados não estão acessíveis.

A criopreservação é o método de conservação que envolve a refrigeração e o congelamento, com o uso respectivo de temperaturas acima e abaixo do ponto de fusão dos líquidos para a conservação da célula espermática (Luvoni et al., 2003). No resfriamento o sêmen é mantido em meio diluidor na temperatura de 4 a 5°C, podendo permanecer viável por vários dias. No entanto, quando a finalidade é a criopreservação o sêmen é resfriado até chegar no equilíbrio, em seguida é congelado em vapores de nitrogênio a - 70 °C e depois as amostras são mergulhadas em nitrogênio líquido - 196°C por tempo indeterminado (Luvoni et al., 2006). Diversos protocolos e equipamentos de congelamento vem sendo desenvolvidos para a criopreservação de espermatozoides de carnívoros (Wood et al., 1993; Tsutsui et al., 2000; Zambelli et al., 2002; Luvoni et al., 2003; Tsutsui et al., 2003; Macente et al., 2012). Algumas dessas metodologias já foram utilizadas também em felinos selvagens, como leão asiático (Patil et al., 1998), tigre indiano (Patil et al., 1998), leopardo indiano (Jayaprakash et al., 2001), assim com felinos neotropicais como onça pintada (Morato et al., 2000; Da Paz et al., 2007), onça parda (Deco et al., 2013), jaguatirica (Araujo et al., 2015) e o gato do mato pequeno (Araujo et al., 2015). A etapa de resfriamento (4 a 5 °C) da maioria dos protocolos são realizados em

refrigeradores, equipamentos de resfriamento e/ou congelamento automático ou até mesmo em containers portáteis que utilizam gelo reciclável previamente congelados. Apesar desses equipamentos serem eficientes no resfriamento e congelamento do sêmen, muitas vezes inviabilizam o trabalho a campo devido a logística desfavorável, principalmente relativo a falta de energia.

A metodologia de congelamento, com o uso da etapa de resfriamento convencional (Tratamento A) já foi utilizada com bons resultados em onças pardas (Deco et al., 2013) e em jaguatiricas (Araujo et al., 2015). Apesar de esta metodologia dispensar refrigeradores elétricos, uma vez que a curva de resfriamento é feita com gelo e água, há a necessidade de um congelador para a produção e manutenção o gelo antes de ser utilizado. Devido a isso, o presente estudo utilizou um material refrigerante reciclável e atóxico para fazer a mesma curva na etapa de resfriamento, com a vantagem de ser reutilizável e principalmente poder ser congelado e mantido em nitrogênio líquido, que necessariamente faz parte das etapas posteriores de congelamento do sêmen. Dessa forma, pode ser usado a campo onde não seja possível o uso da energia elétrica. Não houve diferença em todos os parâmetros avaliados entre os dois métodos de resfriamento, isso mostra que o método proposto pode ser utilizado no congelamento de felinos a campo sem comprometer a qualidade do sêmen. Sendo assim, essa metodologia pode viabilizar a formação de um banco de sêmen de onças pintadas e onças pardas de vida livre incrementando o estoque genético dessas espécies a serem usados em futuros programas de reprodução assistida.

4.5. Conclusão

A técnica de resfriamento usando gelo reciclável congelado em nitrogênio líquido pode ser usada para a criopreservação de sêmen de felinos, dispensando o uso de equipamentos de congelamento de sêmen que utilizam energia elétrica, sendo assim uma técnica mais prática de ser usada a campo.

4.6. Referências Bibliográficas

Araujo, G. R.; Paula, T. A. R.; Deco-Souza, T.; Garay, R. M.; Ferreira, L. B. C.; Csermak-Jr, A. C.; Silva, L. C.; Alves, S. V. P. Ocelot and ocelot spermatozoa

can bind hen egg perivitelline membranes. *Animal Reproduction Science (Print)*, 2015; v. 163, p. 56-62.

Ball, L. Electroejaculation. In: Klemm WR (Ed). *Applied electronics for veterinary medicine and animal physiology*. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1986. p. 395 - 441.

Boddicker, M. L. Snares for predator control. *Vertebr. Pest Conf.* 1982; 10:50-54.

Cancel, A.; Lobdell, D.; Mendolo, P.; Perreault, D.; Objective avaliation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Hum Reprod.* 2000; v.15, p.1322-1328.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte, 2013;3.ed. 104 p.

Crawshaw Jr., P. G. Recommendations for study design on research projects on neotropical felids. In: MONDOLFI, E. *Felinos de Venezuela: biologia, ecologia y conservación*. Venezuela: Fudeci, 1991. p.187-222.

Da Paz, R. C. R.; Zuge, R. M.; Barnabe, R. C.; 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 (Impresso)*, 2007; v. 5, p. 337-344.

Da Paz, R. C. R.; Morato, R. G.; Carciofi, A.; Guimarães, M. A. B. V.; Pessutti, C.; Santos, E. F.; Barnabe, R. C. Nutritional influence on quality of semen of jaguar in captivity. *International Zoo Yearbook*, Inglaterra, 2006; v. 41,

Da Paz, R. C. R.; Zuge, R. M.; Morato, R. G.; Barnabe, V. H.; Barnabe, R. C.; Fellipe, P. A. N. Capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo-SP, 2000; v. 37, n.6.

Da Paz, R. C. R.; Leme, D. P.; Zuge, R. M.; Pessuti, C.; Santos, E. F.; Barnabe, R. C. Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), em testículos de onça pintada (*Panthera onca*), utilizada como ferramenta no diagnóstico de infertilidade. *Brazilian*

Journal Veterinary Research and Animal Science. São Paulo, 2003; v. 40, p. 100-107,

Deco, T. S.; Paula, T.A. R.; Costa, D. S.; Araújo, G. R.; Garay, R. M.; Vasconcelo, G.S. C.; Csermak Junior, A. C.; Carretta-Júnior, M.; Silva, L.C. & Barros, J.B.G. Coleta e avaliação de sêmen de puma (*Puma concolor*, Linnaeus, 1771) adultos mantidos em cativeiro. *Revta Bras. Reprod. Anim*, 2010; 34: 252-259.

Deco-Souza, T.; Paula, T. A. R.; Costa, D. S.; Costa, E. P.; Barros, J. B. G.; Araujo, G. R.; Carreta-Jr, M. Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). *Pesq. Vet. Bras.* 2013; 33(4):512-516.

Filliers, M.; Rijsselaere, T.; Bossaert, P.; Zambelli, D.; Anastasi, P.; Hoogewijs, M.; et al. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two collection techniques. *Theriogenology*, 2010;74:31-9.

Gelman, A.; Rubin, D. B. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Stat. Sci.* 1992.doi:10.1214/ss/1177011136

Howard, J. G.; Bush, M.; Wildt, D. E. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow D (Ed.). *Current therapy in theriogenology II*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.1047-1053.

Howard, J. G. Assisted reproductive techniques in non-domestic carnivores. In: Fowler ME, Miller RE (Ed.), *Zoo and wild animal medicine*. Toronto: Saunders, 1999. p.449-457.

Jayaprakash, D.; Patil, S. B.; Kumar, M. N.; Majumdar, K. C.; Shivaji, S.; Semen characteristics of the captive Indian leopard, *Panthera pardus*. *J Androl*, 2001 21:25-33.

Kery, M. (Ed.), 2010. *Introduction-to-WinBUGS-for-Ecologists-Bayesian-approach-to-regression-ANOVA-mixed-models-and-related-analyses*, 1st ed. Elsevier Inc., Amsterdam.

KUMI-DIAKA J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 1993; 39:1279-1 289.

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 (*Pantheraleo*). *Theriogenology*, 2012; 78, 696–701.

Luvoni, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, 2006; v. 66, n. 1, p. 101-11.

Luvoni, G.C.; Kalchschmidt, E.; Leoni, S.; Ruggiero, C. Conservation of feline semen. Part I: cooling and freezing protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2003; p. 1-6.

Macente, B. I.; Mansano, C. F. M.; Pereira, M. M.; Martins, M. I. M.; Gioso, M. M.; Savi, P. A. P.; Gutierrez, R. R. Congelação de espermatozoides epididimários de gatos utilizando o diluidor Botu-Crio® após refrigeração por 24h em container de transporte de sêmen Botu-Tainer®. *Acta Vet Bras*, 2012; v.6, p.112-117.

McCarthy, M., 2007. Bayesian methods for ecology, 1st ed, Chemistry & biodiversity. Cambridge University Press, New York. doi:10.1017/CBO9780511802454

Miller, A. M.; Roelke, M. E.; Goodrowe, K. L.; Howard, J. G.; Wildt, D. E. Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (*Felisconcolor*). *J Reprod Fertil*, 1990; v.88, p.249-258.

Morato, R. G.; Conforti, V. A.; Azevedo, F. C. C.; Jacomo, A. T. A.; Silveira, L.; Sana, D.; Nunes, A. L. V.; Guimarães, M. A. B. V.; Barnabe, R. C. Comparative endocrine-ejaculate characteristics of captive versus free living jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction (Cambridge)*, 2001; v. 122, n.5, p. 745-751.

Morato, R. G.; Guimarães, M. A. B. V.; Ferreira, F.; Verreschi, I. T. N.; Barnabe, R. C. Reproductive characteristics of captive male jaguar. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, Brasil. 1999; v. 36, n.5.

Morato, R. G.; Guimarães, M. A. B. V.; Nunes, A. L. V.; Teixeira, R. H.; Carciofi, A.; Barnabe, V. H.; Barnabe, R. C. Colheita e avaliação espermática em onça pintada. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, Brasil, 1998; v. 35, n.4, p. 198-201.

Morato, R. G.; Verreschi, I. T. N.; Guimaraes, M. A. B. V.; Cassaro K.; Pessutti, C.; Barnabe, R. C. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). *Theriogenology*, Estados Unidos, 2004; v. 61, n.7-8, p. 1273-1281.

Mortimer, S. T. Casa- Practical aspects. *J Androl*, 2000; p.515-524.

Patil, S. B.; Jayaprakash, D.; Shivaji, S. Cryopreservation of semen of tigers and lions: computerized analysis of the motility parameters of the spermatozoa. *CurrSci*. 1998;7:930–935.

Plummer, M., Best, N., Cowles, K., Vines, K., 2010. Coda: Output analysis and diagnostics for MCMC.

Portaria MMA no 132, de 14 de dezembro de 2010. Plano de ação nacional para a conservação da onça pintada. PAN Onça pintada.

Portaria MMA nº 76, de 27 de junho de 2014. Plano de ação nacional para a conservação da onça preta. PAN Onça preta.

Powell, R.A. & Proulx, G. Trapping and marking terrestrial mammals for research: integrating ethics, standards, techniques, and common sense. – *Institute of Laboratory Animal Research Journal*, 2003; 44: 259-276.

Pukazhenti, B.; Pelican, K.; Wildt, D. E.; Howard, J. G. Sensitivity of domestic cat (*FelisCatus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold induced crossosomal damage. *Biology of Reproduction*, 1999; p. 135-141.

Pukazhenti, B.; Wildt, D. E.; Howard, J. G.; The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J Reprod Fertil*, 2001; v.57, p.423-433.

R Development Core Team, R., 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput., R Foundation for Statistical Computing. Doi:10.1007/978-3-540-74686-7

Royston, P., The W test for normality. Appl. Stat. 1982; 176–180.

SAEG 1999. Central de Processamento de Dados. Sistema de Análise Estatística e Genética, Viçosa, MG.

Silva, A. R.; Morato, R. G.; Silva, L. D. M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. Animal Reproduction Science, 2004; v. 81, p. 159-175.

Swanson, F.W. 1998. Curso de extensão – Felinos Selvagens, Biotécnicas reprodutivas e Conservação. Curitiba, Brasil: Setor de ciências biológicas – UFPR.

Swanson, W. F.; Johnson, W. E.; Cambre, R. C.; S. B. Citino; K. B. Quigley; D. M. Brousset; R. N. Morais; N. Moreira; S. J. O'Brien; and D. E. Wildt. Reproductive Status of Endemic Felid Species in American Zoos and Implications for Ex Situ Conservation. Zoo Biology. 2003; 22:421- 441.

Tsutsui, T.; Tanaka, A.; Takagi, Y.; Nakagawa, K.; Fujimoto, Y.; Murai, M. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. Journal of Veterinary Medicine Science, 2000; v. 62, n.12, p.1247-1251.

Tsutsui, T.; Wada, M.; Anzai, M.; Hori, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. Journal of Veterinary Medicine Science, 2003; v. 65, n.3, p. 397- 399.

Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, 2002; v.57, p.149-179.

Villaverde, A.I.S.B. & Lopes, M.D. Inseminação artificial em gatos domésticos utilizando sêmen criopreservado. Revta Bras. Reprod. Anim. 2007; 31:77-83.

Wildt, D. E.; Phillips, L. G.; Simmons, L. G.; Chakraborty, P. K.; Brown, J.L.; Howard, J.G.; Teare, A.; Bush, M. A comparative analysis of ejaculate and hormonal

characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard, and puma. *Biol Reprod.* 1988; v.38, p.245- 255.

Wildt, D. E. Potencial applicantiions of IVF technology for species conservation. IN: Bavisester B.D. Cummins J., Roldan E.R.S (eds). *Fertilization in mammals*, 1990; p. 349-364. Serono Symposium, Norwell.

Wood, T. C.; Swanson, W. F.; Davis, R. M.; Anderson, J. E.; Wildt, D. E. Functionality of sperm from normo- versus teratospermic domestic cats cryopreserved in pellets or straw containers. *Theriogenology*,1993; 39, 342.

Zambelli, D.; Cunto, M.; Prati, F.; Merlo, B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology*, 2007;68:796–803.

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*, 2008; 69:485–90.

Zambelli, D.; Caneppele, B.; Castagnetti, C.; Belluzi, S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reproduction in DomesticAnimals*, 2002; v. 37, p.310-313.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Por meio do presente trabalho foi possível desenvolver metodologias que viabilizaram a criopreservação de sêmen de onças pintadas e onças pardas de vida livre. Portanto, o uso de armadilhas de laço associada à coleta farmacológica de sêmen por cateterização uretral, com medetomidina, e resfriamento usando gelo reciclável congelado em nitrogênio líquido mostrou-se eficiente e seguro nas atividades propostas.