

THIAGO CAVALHERI LUCZINSKI

**Comparação de crioprotetores na criopreservação de sêmen de
onça-pintada (*Panthera onca*)**

São Paulo
2022

THIAGO CAVALHERI LUCZINSKI

**Comparação de crioprotetores na criopreservação de sêmen de
onça-pintada (*Panthera onca*)**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Cristiane Schilbach Pizzutto

Co-orientador:

Prof^a. Dr^a. Thyara de Deco Souza e Araújo

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4203 FMVZ	Luczinski, Thiago Cavalheri Comparação de crioprotetores na criopreservação de sêmen de onça-pintada (<i>Panthera onca</i>) / Thiago Cavalheri Luczinski. – 2022. 47 f. : il.
	Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.
	Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal. Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Schilbach Pizzutto. Coorientadora: Profa. Dra. Thyara de Deco Souza e Araujo.
	1. Reprodução. 2. Conservação. 3. <i>Panthera onca</i> . 4. Criopreservação. 5. Sêmen. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB-8/7070, da FMVZ/USP.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Comparação de crioprotetores na criopreservação de sêmen de onça-pintada (*Panthera onca*)", protocolada sob o CEUA nº 1883210222 (ID 009226), sob a responsabilidade de **Cristiane Schilbach Pizzutto e equipe; Thiago Cavalheri Luczinski** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/02/2022.

We certify that the proposal "Comparison of cryoprotectants in the cryopreservation of jaguar (*Panthera onca*) semen", utilizing 6 Brazilian wild species (6 males), protocol number CEUA 1883210222 (ID 009226), under the responsibility of **Cristiane Schilbach Pizzutto and team; Thiago Cavalheri Luczinski** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/23/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2022** a **02/2023** Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Espécies silvestres brasileiras**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 11 anos**

N: **6**

Linhagem: **Panthera onca**

Peso: **50 a 80 kg**

Registro IBAMA/Sisbio/Etc: **SISBIO número 57293-12 (em anexo) Autorização Nex para execução do projeto (em anexo)**

Método de Captura: **Os animais serão capturados com o uso de dardo em zarabatana.**

Local do experimento: **NEX No Extinction**

São Paulo, 25 de maio de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LUCZINSKI, Thiago C.

Título: **Comparação de crioprotetores na criopreservação de sêmen de onça-pintada (*Panthera onca*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha esposa Pollyanna Motinha e aos meus filhos, Henrique F. Luczinski, Theo F. Luczinski e Bento M. Luczinski.

AGRADECIMENTOS

Trabalhar com a espécie trabalhada neste projeto é um privilégio, ainda mais dividindo momentos, bons e ruins, com pessoas tão capacitadas, tão apaixonadas e aguerridas a conservação da onça-pintada em nosso país. Não consigo ordenar esse agradecimento em ordem de importância pois todos que participaram direta e indiretamente tiveram sua parcela de “culpa” na realização deste trabalho. Como devo começar por algum lugar começarei agradecendo as instituições envolvidas e depois as pessoas, torcendo para minha memória não me boicotar.

Agradeço ao Instituto Nex por ter permitido a realização dos procedimentos nos animais lá abrigados, por confiarem suas “pérolas” em nossas mãos para que fossem avaliadas e cuidadas. Agradeço ao Silvano, a Cris e a Danda, mantenedores da instituição, que dão literalmente o sangue para manter esta espécie protegida e que já deixaram a muito tempo de serem colegas ou patrões, transformando-se em parte da minha família.

Ao Instituto Reprocon, não sei nem o que escrever, se não fosse por esse grupo, o qual faço parte, tudo isso não teria acontecido. Pessoas extremamente capacitadas e humanas, verdadeiros “brothers”, parafraseando o Gê, nosso querido mestre dos magos. Não tenho nem como agradecer a Thyara por ela ter percorrido mais de 1000 km para ajudar na realização das colheitas e análises do sêmen, deixando os filhos com o Gê, olha o perigo.

Gostaria de agradecer também minha querida orientadora, por mesmo de longe, ter me ajudado nos momentos de “perrengue”, com toda sua calma, doçura, inteligência, tranquilidade e autocontrole mesmo quando dei meus tropeços, pessoas assim me dão medo.

Quero fazer um agradecimento especial para o Sr. Pedro Nacib, pois se não fosse pela sua inquietude, por ter me perturbado em relação a isso, ter me apresentado a nossa orientadora e por todo o apoio (que não foi pouco) durante essa caminhada, esse título não teria saído do campo das ideias. Valeu mesmo!

Logicamente quero agradecer também a minha esposa e aos meus filhos por terem entendido meus momentos de ausência e nunca terem se queixado pois sabiam o motivo.

A “Rafa” que foi minha fiel escudeira, organizando e facilitando as ações a campo. Pronto já agradeço, agora volte ao trabalho porque está cheio de estagiário querendo o seu lugar.

À Larissa Schneider por auxiliar nas análises do CASA e ao Prof. Ricardo Zanella pelo auxílio nas estatísticas.

À IMV Technologies Brasil e Reprodex Laboratórios.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi financiado em parte pelo Instituto Reprocon.

“Todo mundo tem um plano até tomar o primeiro soco na cara”

- Mike Tyson

RESUMO

LUCZINSKI, T.C. **Comparação de crioprotetores na criopreservação de sêmen de onça-pintada (*Panthera onca*)**. 2022. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Muitas espécies de felinos silvestres estão ameaçadas de extinção, entre eles, a onça-pintada, um símbolo nacional da biodiversidade, que vem sendo dizimada devido, principalmente, a perda do seu habitat e à caça. Para que as biotecnologias reprodutivas sejam uma ferramenta importante na conservação, faz-se necessário o estabelecimento de protocolos da reprodução assistida, específicos para a espécie em questão. O objetivo deste estudo foi comparar três diferentes crioprotetores de sêmen - dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol (GLY) e metanol (MET) - na criopreservação de sêmen de onça-pintada, assim como o impacto da temperatura de descongelação na qualidade da dose. Para tanto, utilizamos sêmen obtido de cinco machos de onça-pintada (*Panthera onca*) com idades entre dois e 11 anos, mantidos sob cuidados humanos na Instituição NEX – Corumbá de Goiás/GO. Os animais foram contidos quimicamente e foi realizada a colheita farmacológica de sêmen. Após a colheita do sêmen, as amostras foram avaliadas, fracionadas e a estas frações foram adicionados diluente e os crioprotetores. O sêmen foi congelado, sendo posteriormente descongelado e novamente avaliado, com o intuito de comparar qual crioprotetor é mais efetivo em manter a qualidade do sêmen após descongelação. Os resultados encontrados pela análise do CASA mostraram que as motilidades total e progressiva após a descongelação não apresentaram diferença entre os crioprotetores DMSO e o glicerol, porém se mostraram superiores quando comparadas ao Metanol. Além disto, os três crioprotetores avaliados não mostraram diferenças nas análises espermáticas quando avaliadas duas temperaturas distintas (37°C e 50°C) para o mesmo diluente. A qualidade espermática mostrou-se ruim visto as elevadas taxas de alterações morfológicas dos espermatozoides encontradas em todos os animais estudados. As

alterações morfológicas encontradas com maior incidência foram as pseudogotas, seguida de cauda dobrada e gota citoplasmática proximal. Acreditamos que mais estudos precisam ser realizados com a espécie no que tange os protocolos de reprodução assistida, porém a baixa qualidade espermática pode ser um dos gargalos importantes nos programas de conservação para a espécie.

Palavras-chave: Reprodução; conservação; *Panthera onca*; criopreservação; sêmen.

ABSTRACT

LUCZINSKI, T.C. **Comparison of cryoprotectants in the cryopreservation of jaguar (*Panthera onca*) semen.** 2022. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Many wild feline species are threatened with extinction, including the jaguar, a Brazilian national symbol of biodiversity, decimated mainly due to the loss of its habitat and hunting. For reproductive biotechnologies to be an essential tool in conservation, it is necessary to establish specific protocols for assisted reproduction to the species. This study aimed to compare three different semen cryoprotectants - dimethylsulfoxide (DMSO), glycerol (GLY), and methanol (MET) - in the cryopreservation of jaguar semen, as well as the impact of thawing temperature on dose quality. Semen was obtained from 5 male jaguars (*Panthera onca*) aged between two and 11 years, kept under human care at the NEX Institution – Corumbá de Goiás/GO. The animals were chemically restrained, and pharmacological semen collection was performed. After collection, the semen samples were evaluated and fractionated, and to these fractions, diluent and cryoprotectants were added. The semen was frozen, then thawed, and evaluated again to compare which cryoprotectant is more effective in maintaining semen quality after thawing. The results found by the CASA analysis showed that the total and progressive motility after thawing showed no difference between the cryoprotectants DMSO and glycerol. However, they were superior when compared to methanol. In addition, the three cryoprotectants evaluated did not show differences in sperm analysis when evaluated at two different temperatures (37°C and 50°C) for the same extender. Sperm quality was poor given the high rates of morphological alterations of sperm found in all animals studied. The morphological alterations found with the highest incidence were pseudodrops, followed by bent tails and proximal cytoplasmic droplets. We believe that more studies need to be carried out with the species regarding assisted reproduction protocols. However, the low sperm

quality may be one of the critical bottlenecks barriers in conservation programs for the species.

Keywords: Reproduction; conservation; *Panthera onca*;
cryopreservation; semen.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3. CRIOPRESERVAÇÃO.....	19
4. CRIOPROTETORES.....	19
4.1 Tipos de crioprotetores.....	22
4.1.1 Agentes intracelulares.....	23
4.1.2 Agentes extracelulares.....	24
5. CONGELAÇÃO SE SÊMEN DE ONÇA-PINTADA.....	25
6. OBJETIVO.....	26
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
7.1 Animais e desenho experimental.....	27
7.2 Meios.....	29
7.3 Contenção Química.....	29
7.4 Colheita, avaliação e processamento do sêmen.....	30
7.5 Avaliação do sêmen fresco.....	31
7.6 Avaliação do sêmen descongelado.....	32
8. RESULTADOS.....	32
9. DISCUSSÃO.....	37
10. CONCLUSÃO.....	41
11. BIBLIOGRAFIA.....	42

1. INTRODUÇÃO

A onça-pintada é o maior felino das américas e o terceiro maior felino do mundo, símbolo da biodiversidade brasileira, reverenciada, respeitada e adorada em muitas culturas, temida, abominada e odiada por outras. Muitas histórias e lendas permeiam o imaginário popular em relação a esta espécie, algumas fazendo com que o animal seja respeitado e outras transformando-o em alvo de perseguições e abate sumário. A espécie é distribuída desde o norte da Argentina, por todo o Paraguai e Brasil, leste do Peru e Bolívia, noroeste da América do Sul (Colômbia e Equador), até o norte do México (ICMBio, 2013), porém, apesar de possuir uma ampla distribuição vem sofrendo com a diminuição de seu território.

O aumento da perda de habitat pela ação antrópica promove a fragmentação de ecossistemas fazendo com que populações fiquem isoladas, podendo potencializar a endogamia (Sigrist, 2012), levando ao desaparecimento da espécie no local ou a diminuição da troca de informações genéticas entre os indivíduos, reduzindo assim a variabilidade genética desta população, colocando-a em risco. Esta espécie encontra-se na lista dos animais ameaçados de extinção do Ministério do Meio Ambiente, categorizada como vulnerável (VU) (ICMBio, 2018). Devido a este fato animais sob cuidados humanos alocados em instituições capacitadas necessitam serem sustentados como um meio de manutenção *in vivo* do material genético da espécie, porém é necessário que mais ações sejam realizadas, além da preservação dos seus habitats e da manutenção destes animais *ex situ*, como por exemplo, a criopreservação de seu material genético.

Apesar de estudos estarem sendo desenvolvidos sobre esta espécie ainda há uma vasta área a ser estudada sobre sua fisiologia reprodutiva para que biotecnologias possam ser desenvolvidas com o intuito de auxiliar em sua preservação. Segundo Jorge-Neto et al. (2018), a espécie é um dos mais importantes predadores topo de cadeia da fauna brasileira. Sua preservação é de fundamental importância para a

preservação da diversidade ecológica e da integridade dos ecossistemas em que habitam.

A utilização de estratégias de preservação da fertilidade usando a criopreservação possui um enorme potencial para auxiliar a sustentar e proteger espécies raras e ameaçadas de extinção. Apesar disso, Morato et al. (2004) afirmam existir falta de informações sobre a fisiologia reprodutiva da onça-pintada, o que tem dificultado os esforços para melhorar a reprodução e estabelecer trocas genéticas entre populações de cativeiro e de vida livre usando técnicas de reprodução assistida.

A ausência de informações também foi relatada por Jorge-Neto et al. (2018) a respeito da escassez de informações básicas sobre o comportamento reprodutivo da espécie, mesmo sendo este conhecimento de fundamental importância para se desenvolver ações de reprodução assistida e conservação.

Uma população sob cuidados humanos pode fornecer uma proteção contra a extinção, desde que o potencial reprodutivo dos indivíduos nesta condição seja maximizado por meio de reprodução natural e implementação de técnicas de reprodução assistida (Barnes et al., 2016). Para tanto é essencial formular estratégias de conservação e o desenvolvimento de protocolos eficazes de criopreservação de sêmen para a formação de bancos de germoplasma de onça-pintada (Silva et al., 2020a).

A criopreservação de sêmen há muito tempo é vista como um meio de beneficiar a criação de animais de produção, porém também tem sido reconhecida por contribuir para a conservação de espécies ameaçadas (Watson, 2000). O mesmo autor ainda afirma que a criopreservação pode induzir alterações nos espermatozoides que podem ser letais ou prejudiciais a sua função subsequente. Devido a isto é necessário a utilização de crioprotetores com a capacidade de proteção reconhecida para a espécie. Apesar de estudos estarem sendo desenvolvidos sobre esta espécie ainda há uma vasta área a ser estudada sobre sua fisiologia reprodutiva para que biotecnologias possam ser desenvolvidas com o intuito de auxiliar em sua preservação

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O aumento da perda de habitat pela ação antrópica promove a fragmentação de ecossistemas fazendo com que populações fiquem isoladas, podendo potencializar a endogamia (SIGRIST, 2012), o que diminui a variabilidade genética desta população.

Muitas espécies de felídeos estão ameaçadas por causa de atividades humanas destrutivas. Como resultado, os zoológicos estão sendo incumbidos de sustentar populações geneticamente saudáveis em caso de extinções catastróficas (Brown, 2011).

A onça-pintada (*Panthera onca*) é o maior felino das américas, o terceiro maior do mundo e o único representante do gênero *Panthera* no continente americano. A perda e a extensa fragmentação dos habitats, somada à caça têm causado grandes prejuízos às populações de onça-pintada em todos os biomas brasileiros onde a espécie ocorre, especialmente na Mata Atlântica e na Caatinga, onde as populações sofreram drásticas reduções (ICMBio, 2013).

Desenvolvem um importante papel para o equilíbrio do ecossistema no qual estão inseridas e, apesar de existirem vários estudos com esta espécie, sua fisiologia reprodutiva necessita ser melhor estudada e compreendida para que a utilização de biotecnologias reprodutivas se torne mais efetiva e corriqueira com a finalidade de sua preservação.

A maior parte da população desta espécie encontra-se no Brasil, mas também é encontrada em áreas fragmentadas no México, América Central e do Sul (até o norte da Argentina). Porém seu habitat original compreendia desde os Estados Unidos até o sul da Argentina (Silva, 2019).

Em alguns biomas do nosso país a espécie apresenta-se em maior riscos do que em outros, como afirmaram Morato et al. (2013) ao relatarem que a espécie é classificada como ameaçada de extinção no bioma Cerrado e já nos biomas Caatinga e Mata Atlântica a classificação muda para criticamente ameaçada.

A população de onças-pintadas diminuiu significativamente devido a destruição de habitats, caça predatória e falta de interesse em preservar a espécie (Silva et al., 2020a). Para Wells et al. (1998) as baixas densidades populacionais promovem menores taxas de crescimento populacional em relação as taxas de mortalidade, produzindo assim uma condição que leva a extinção de espécies. Sigrist (2012) ainda afirmou que a fragmentação do habitat e a diminuição das populações de felídeos potencializam a endogamia.

O manejo de populações mantidas sob cuidados humanos (*ex situ*) são importantes para a sobrevivência de várias espécies de animais silvestres (Pizzutto et al., 2021a).

A conservação da onça-pintada, segundo Araújo et al. (2021), depende da redução de sua vulnerabilidade por meio de ações de conservação *in situ* (promovendo a proteção de seus habitats e diminuindo a remoção de indivíduos da natureza) e *ex situ* (promovendo programas de educação ambiental e reprodução assistida). Mesmo em recintos relativamente naturalistas, a reprodução de felinos em cativeiro permanece baixa, com exceção de algumas das espécies do gênero *Panthera* (Brown, 2011).

Dentro do conceito de conservação única, Pizzutto et al. (2021b), apontaram como sendo um ponto crítico para a conservação de felinos silvestres, o desenvolvimento de programas de reprodução assistida, corroborando com Araújo et al., (2018), que ressaltam que tais programas visam ajudar a aumentar a variabilidade genética da espécie. A consolidação desses programas possuem um papel fundamental na conservação, ajudando na manutenção de uma população geneticamente viável (Araújo et al., 2021).

As biotecnologias reprodutivas tornaram-se uma grande ferramenta para a troca de material genético entre populações *in situ* e *ex situ*, possibilitando a restauração de espécies em seus ambientes naturais (Pizzutto et al., 2021a).

O desenvolvimento de estratégias de conservação e o desenvolvimento de eficazes protocolos de criopreservação de sêmen para a formação de bancos de germoplasma são essenciais (Silva et al.,

2020b), sendo que com a criopreservação é possível manter espermatozoides viáveis por um período indeterminado (Silva et al. 2004). Estas estratégias permitem o transporte e introdução de material genético entre populações, dispensando a translocação de indivíduos, reduzindo assim o estresse causado pelo manejo e o risco de transmissão de doenças infectocontagiosas (Wildt 1990). Porém, Paz (2012) afirmou que a aplicação de métodos de reprodução artificial em animais selvagens não tem sido bem-sucedida e uma das várias razões é a má qualidade espermática.

Apesar de alguns resultados promissores Araújo et al.(2021) afirmaram a necessidade de mais esforços na linha de pesquisa com criopreservação de sêmen de grandes felinos neotropicais devido aos poucos trabalhos existentes. O mesmo autor afirmou ainda que a colheita farmacológica de sêmen foi um grande avanço na andrologia de grandes felinos neotropicais. A colheita farmacológica de sêmen utilizando um agonista do receptor adrenérgico α_2 (α_2A) e cateterização uretral mudou o conceito para a obtenção de sêmen de felinos, resultando em uma amostra com menor volume, porém com maior concentração (Silva et al., 2021), porém pouco se avançou em relação ao meio de criopreservação deste material (Araújo et al., 2021), o que se soma à afirmação de Martins (Martins, 2020) quanto à grande necessidade em se testar e estabelecer protocolos adequados de criopreservação para cada tipo celular garantindo o sucesso técnico a longo prazo. Sendo assim, é essencial o aprimoramento da reprodução assistida em felinos neotropicais, em especial a onça-pintada, visto que em alguns biomas a espécie está criticamente em perigo (Araújo et al., 2021).

Uma grande dificuldade encontrada é manter a qualidade do sêmen após a descongelação, muitas vezes tornando inviável a sua utilização. Devido a esse fato faz-se necessário a testagem de diferentes crioprotetores com o intuito de verificar o mais eficiente, garantindo assim uma melhor qualidade do sêmen descongelado, melhorando a porcentagem de sucesso na sua utilização.

3. CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma importante biotécnica reprodutiva, pois possibilita a conservação do germoplasma masculino por tempo indeterminado (Castelo et al., 2008), sendo um dos principais pontos da biotecnologia reprodutiva, pois propicia a criação de um banco genético e também permite maximizar a utilização dos gametas masculinos (Silva, 2019). É um processo complexo, sendo importante observar diversos fatores com a finalidade de obter um resultado satisfatório, sendo estes a diluição, criopreservação, descongelamento e a fisiologia do sêmen de cada espécie (Castelo et al., 2008).

A criopreservação é a utilização de temperaturas muito baixas com o intuito de preservar células e tecidos vivos estruturalmente intactos (Pegg, 2007). Para Castro et al. (2011) a utilização da criopreservação tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária estimula variados estudos em relação aos efeitos de baixas temperaturas e dos processos de congelamento em células e tecidos com a finalidade de desenvolver protocolos eficientes para a preservação de embriões e gametas.

Apesar de ser utilizada com sucesso em algumas espécies, para outras, a criopreservação pode ser problemática (Holt, 2000), visto que não existe um protocolo universal a ser utilizado (Mocé e Vicente, 2009). Mesmo assim, é uma ferramenta de fundamental importância para a instituição de bancos de germoplasma, o que permite manutenção de material genético de variadas espécies (Castro et al., 2011), principalmente das ameaçadas de extinção.

O mesmo autor afirma que o processo de criopreservação é baseado em cinco etapas, sendo elas:

- exposição ao agente crioprotetor, permitindo a difusão destes agentes nos compartimentos das células;
- resfriamento;
- armazenamento, realizado em temperatura ultrabaixa, permitindo a preservação do material por indefinidos períodos;

- descongelamento, onde ocorre o resgate do material criopreservado e a retomada do metabolismo celular;
- diluição ou remoção do agente crioprotetor, que tem como finalidade evitar que quando em temperatura fisiológica haja a produção de metabólitos secundários, o que aumentaria a ação tóxica destes agentes.

O processo de criopreservação pode ser realizado por dois métodos, que seriam a congelamento lento e a vitrificação (Pereira e Marques, 2008; Castro et al., 2011), sendo no primeiro a congelamento realizada de forma gradual e no segundo, a congelamento ocorreria de forma súbita, onde a amostra passa da temperatura ambiente para a temperatura criogênica (Castro et al., 2011).

Para Sanches (2009) a congelamento lento o estresse térmico na fase de transição das soluções do estado líquido para o estado sólido é reduzido devido a diminuição gradual da temperatura. Este método tem como vantagem a utilização de baixas concentrações de crioprotetores, pois estes estão associados a choque osmótico e a toxicidade química, porém estas baixas concentrações limitam sua capacidade de prevenir a formação de cristais de gelo (Pereira e Marques, 2008).

Se comparado ao sêmen fresco, o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em uma diminuição da fertilidade (Gonzalez, 2004). Durante este processo os espermatozoides sofrem estresse devido a mudanças no equilíbrio osmótico e na temperatura durante as fases de resfriamento, congelamento e reaquecimento (Rosato e Laffaldano, 2013). Essas mudanças promovem a formação de cristais de gelo, sendo este um dos principais fatores biofísicos que levam os espermatozoides a morte (Holt, 2000). Segundo Watson (2000), além da temperatura e da formação de cristais de gelo existem outros fatores que também influenciam na perda da fertilidade, como por exemplo, a composição do diluente e a estabilidade da membrana.

Para Gonzalez (2004), a estrutura dos espermatozoides e a sua motilidade são afetadas de diferentes formas, pois ocorrem injúrias simultâneas ou nas etapas de congelação e descongelação.

Mocé e Vicente (2009) afirmam que os espermatozoides apresentam peculiaridades de acordo com a espécie, obrigando os pesquisadores a otimizar e desenvolver protocolos individuais para cada uma delas. Isto faz com que seja necessário o desenvolvimento de técnicas e protocolos específicos para a onça-pintada, bem como a “experimentação” de crioprotetores com a finalidade de se padronizar o que apresenta melhor resultado para as células espermáticas da espécie em questão.

4 CRIOPROTETORES

A utilização de crioprotetores se faz necessária para a preservação da integridade dos tecidos e células submetidos a processos de criopreservação e de acordo com Saeki et al.(2015) estes agentes são utilizados com o objetivo de proteger as células durante o processo de congelação e descongelação e são substâncias adicionadas na suspensão celular

Mocé e Vicente (2009) ainda afirmam que apesar da semelhança dos componentes dos diluentes para a criopreservação de espermatozoides, as diferentes espécies apresentam peculiaridades em seus espermatozoides, obrigando pesquisadores a individualizar os protocolos e diluentes. As informações a respeito do comportamento, da fisiologia e do estabelecimento de tecnologias reprodutivas em felinos neotropicais são escassas (Araújo et al., 2021) o que torna o estabelecimento de protocolos um grande desafio.

Os crioprotetores reduzem a quantidade de gelo formado em qualquer temperatura, simplesmente aumentando a concentração de solutos no sistema, porém para serem biologicamente aceitáveis devem

possuir a capacidade de penetrar nas células e ter baixa toxicidade (Pegg, 2007).

A criopreservação de espermatozóides é um grande desafio, pois muitos apresentam funcionalidade alterada ou são danificados irreversivelmente após o processo (Mocé e Vicente, 2009). O desafio da criopreservação de sêmen de felinos neotropicais se refere em aprimorar os meios, pois a baixa qualidade e congelabilidade do sêmen destas espécies faz com que seja necessário o refinamento dos crioprotetores com a finalidade de descongelar amostrar mais viáveis (Araújo et al., 2021).

Com a finalidade de reduzir ou até mesmo evitar as alterações causadas pela congelação do sêmen faz-se necessário a utilização de agentes crioprotetores, sendo que estes podem ser classificados em dois tipos, os intracelulares e os extracelulares.

4.1 Tipos de crioprotetores

Os agentes de crioproteção podem ser classificados como intracelulares ou extracelulares, dependendo do seu local de ação (Castro et al., 2011). A diminuição do metabolismo na desidratação da célula pelo uso de crioprotetores de baixo peso molecular (intracelulares) e de alto peso molecular (extracelulares) é o princípio da técnica de congelação celular (Bianchi, 2007) sendo o resultado da congelação do sêmen diretamente influenciado pelo tipo do crioprotetor (Gonzalez, 2004).

Segundo Castelo et al.(2008) os crioprotetores são classificados em não penetrantes, que agem aumentando a osmolaridade do meio extracelular fazendo com que a água saia do interior da célula para este meio (o que impede a formação de cristais de gelo em seu interior durante a congelação) e agentes penetrantes, que são substâncias com capacidade de diminuir as lesões químicas ou mecânicas que podem ser causadas durante o processo de criopreservação.

4.1.1 Agentes intracelulares

Os crioprotetores intracelulares são solutos orgânicos responsáveis pela proteção das organelas celulares durante o processo de resfriamento; devido ao fato de possuírem baixo peso molecular são capazes de atravessar as membranas celulares com facilidade (Neves, 2008; Pereira e Marques, 2008), formando pontes de hidrogênio com as moléculas no interior da célula, o que reduz o ponto de congelação da água prevenindo a formação de cristais de gelo (Pereira e Marques, 2008), sendo os crioprotetores intracelulares mais comumente utilizados o etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol (Pegg, 2007; Neves, 2008; Castro et al., 2011) metanol e etanol (Neves, 2008). Castro et al.(2011) ainda afirmam que o etilenoglicol, o DMSO e o propilenoglicol destacam-se por possuírem uma maior capacidade de penetração em relação ao glicerol e também baixa toxicidade. A toxicidade destes agentes é atribuída a produção de metabólitos secundários produzidos quando a atividade celular é retomada e o agente crioprotetor é metabolizado (Castro et al., 2011)

Segundo Kasai (1996) a capacidade de permeabilidade de um crioprotetor é uma característica importante para sua avaliação. Os de permeação rápida são favorecidos pois o tempo de exposição antes do resfriamento rápido pode ser encurtado e também por serem mais propensos a se difundir a célula, evitando lesão osmótica. Porém algumas questões relacionadas a estes agentes devem ser examinadas, como seu metabolismo e seu potencial de toxicidade que devem ser examinados com cuidado a fim de escolher o mais adequado para uma estrutura específica (Castro et al., 2011).

A eficácia dos crioprotetores intracelulares depende de alguns fatores, como por exemplo, ser altamente solúvel em água (devendo permanecer assim em baixas temperaturas), ter a capacidade de penetração nas células e possuir uma baixa toxicidade (podendo ser utilizado em altas concentrações) (Pegg, 2007).

Segundo Castro et al. (2011) é essencial a adição de um crioprotetor intracelular à solução de congelação, porém isto não garante

que o protocolo de criopreservação seja exitoso, sendo necessário um ajuste perfeito da tríade concentração do crioprotetor, temperatura e tempo de exposição à estrutura que será criopreservada, minimizando assim o efeito tóxico do crioprotetor, corroborando com Gonzalez (2004), que relata que a toxicidade de um agente crioprotetor é influenciada pela concentração, momento de adição e temperatura quando a célula é exposta ao agente de crioproteção. Estes agentes são importantes com o objetivo de aumentar a fluidez da membrana, desidratando parcialmente a célula e diminuindo assim seu ponto de congelação e, conseqüentemente, diminuindo o tamanho e o número de cristais de gelo formados em seu interior (Rosato e Laffaldano, 2013).

Embora a utilização de crioprotetores seja indispensável para se obter sucesso no processo de criopreservação, nenhum dos agentes utilizados está isento de oferecer riscos às células (Castro et al., 2011).

4.1.2 Agentes extracelulares

De acordo com Neves (2008), crioprotetores extracelulares são macromoléculas e açúcares que, por terem alto peso molecular, não podem permear as células e tem como funções proteger a membrana celular, facilitar a desidratação celular e reduzir a formação de gelo. Estes agentes são responsáveis por um aumento da osmolaridade do meio extracelular promovendo assim o deslocamento da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo, com isso, a formação de cristais de gelo no interior desta durante o processo de congelação (Gonzalez, 2004).

Com a utilização de crioprotetores extracelulares é possível a redução da concentração de crioprotetores intracelulares, diminuindo assim a toxicidade celular (Neves, 2008).

5. CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE ONÇA-PINTADA

A maioria das pesquisas de preservação de germoplasma tem se concentrado na criopreservação de espermatozoides em diversas espécies selvagens (Comizzoli & Holt, 2014).

A pesquisa envolvendo a criopreservação de sêmen de onças ainda se encontra nos seus primeiros passos se comparada às espécies domésticas (SILVA, 2019), tornando-se cada vez mais necessário realizar novos trabalhos para determinar um protocolo ideal a ser utilizado em onças-pintadas, apesar dos resultados publicados sobre a espécie já serem bastante satisfatórios.

Segundo Araújo et al. (2021) o meio mais utilizado na criopreservação de sêmen de grandes felinos é o TRIS-gema-glicerol, sendo que a única alternativa testada até o momento foi um meio a base de água de coco em pó, no entanto o primeiro se mostrou superior. Alguns tipos de lipoproteínas de baixa densidade tem se mostrado superior a gema de ovo na congelabilidade espermática (Silva et al., 2020b). É conhecido que pode variar entre as espécies a toxicidade do crioprotetor, mesmo sendo o glicerol o de escolha para diversas espécies de felinos, é necessário uma melhor investigação se em onças-pintadas ele realmente é a melhor escolha (Araújo et al., 2021).

Durante o processo de descongelação uma alta porcentagem de espermatozoides perde motilidade e outras funções, sendo a taxa de motilidade após a descongelação menor que 50% na maioria dos mamíferos (Watson, 2000). Além da baixa taxa de motilidade mencionada Da Paz et al.(2007) relataram em seu estudo com onça-pintada um alto percentual de anormalidades na análise pré-congelação, chegando a 72,3%. Os mesmos autores também relataram altas taxas de anormalidade espermática e baixa qualidade do sêmen após a criopreservação, mas que pode vir a ser utilizado em biotecnologias reprodutivas, como por exemplo a inseminação artificial.

Para Mocé e Vicente, (2009) os espermatozoides apresentam peculiaridades de acordo com a espécie, obrigando os pesquisadores a otimizar e desenvolver protocolos individuais para as espécies. Devido

a este fato faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas e protocolos específicos para esta espécie, bem como a “experimentação” de crioprotetores com a finalidade de se padronizar o que apresenta melhor resultado para as células espermáticas da espécie.

6. OBJETIVO

O objetivo deste estudo, foi comparar a eficiência dos crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol (GLY) e metanol (MET) na criopreservação de sêmen de onça-pintada, assim como o impacto da temperatura de descongelação na qualidade da dose.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo teve autorização para uso de animais expedida pelo SISBIO / ICMBio / MMA sob o nº. 57293-12 e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA / FMVZ) para o protocolo nº. 1883210222.

7.1 Animais e desenho experimental

Os animais incluídos utilizados neste estudo são mantidos *ex situ* em um criadouro científico para fins de conservação localizado no município de Corumbá de Goiás – GO, Brasil (15°51'32.6"S 48°28'31.3"W), denominado NEX – No Extinction. Os cinco animais participantes deste estudo estão em idade reprodutiva e são sexualmente maduros e apresentam pesos entre 53 e 83 kg. Da totalidade dos animais apenas um nasceu sob cuidados humanos, sendo os demais nascidos em vida livre e se encontram na instituição há pelo menos dois anos. Os animais apresentam idades que variam de dois a onze anos de vida. Todos eles

recebem a mesma dieta alimentar baseada em carne suína, com ossos, podendo variar para carne bovina e de frango. A água é fornecida sempre limpa e fresca *ad libitum*, proveniente de mina d'água. São mantidos em recintos externos, os quais possuem ambientação natural (tanto o substrato quanto a vegetação), exposição ao sol, piscina para banho, toca, área de cambiamento e corredor de segurança. Os animais recebem também enriquecimento ambiental, com a finalidade de promover o bem-estar e reduzir o estresse de cativeiro. São expostos naturalmente a luz solar, bem como as mudanças de temperatura e a chuva, mantendo assim um ciclo circadiano natural. O manejo alimentar dos animais, a manutenção e a limpeza dos recintos são realizadas de forma similar, pelas mesmas pessoas (as quais os animais já estão habituados), em todos os recintos dos indivíduos participantes do projeto.

A seleção dos animais foi realizada através do histórico clínico e reprodutivo, avaliação visual, idade, higidez e score corporal, sendo que para o score corporal foi utilizado uma classificação que variou entre um e cinco, sendo a classificação um animal bastante magro e a classificação cinco um animal com acentuado excesso de peso. Todos os animais encontravam-se em torno do score de número três.

Todos eles são identificados por microchip e recebem um nome com a finalidade de facilitar o manejo e a identificação no dia a dia. São eles:

- Oxóssi: o único animal melânico e também o único nascido sob cuidados humanos, nasceu em março de 2020 e estava com 24 meses de idade no momento deste estudo. Oxóssi é do bioma cerrado e nunca reproduziu.

- Guarani: procedente do Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) do Mato Grosso do Sul – MS, foi encontrado recém-nascido em uma fazenda no Pantanal, bastante fraco e desidratado junto com um irmão, o qual não sobreviveu. Após passar por tratamento intensivo na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e em parceria com o Instituto Reprocon foi encaminhado para o NEX em 09 de julho de 2019. Possuía aproximadamente 39 meses de idade na data do

experimento. É o único macho do bioma Pantanal em ambiente *ex situ* no Brasil e já foi pai de dois filhotes antes desta avaliação.

- Aymar: o animal foi resgatado em um petshop no estado do Mato Grosso, com alguns meses de idade. Foi encaminhado ao Nex em 01 de julho de 2019, na data do experimento estava com 41 meses de idade. Aymar  do bioma Pantanal e já teve quatro filhotes sob cuidados humanos.

- Ferinha: o animal foi resgatado, pois segundo informaes se perdeu da mãe durante um incêndio próximo a Belém - PA. Chegou ao Nex com aproximadamente três meses de idade no dia 25 de outubro de 2010 e na data do experimento estava com aproximadamente 140 meses de idade. Ferinha  do bioma amazônico e nunca reproduziu.

- Merlin: ficou totalmente cego em 2016, após ser atingido por tiros de arma de fogo. O animal habitava uma reserva ambiental em Pinheiro, no Maranhão, após o ocorrido foi resgatado pelo Corpo de Bombeiros da região e levado de barco ao Centro de Triagem de Animais Silvestres - Cetas, de São Luís. Chegou ao Nex no dia 16 de janeiro de 2019 com 8 anos ,  do bioma cerrado (transio), possuía aproximadamente 110 meses de vida na data do estudo e nunca reproduziu sob cuidados humanos.

7.2 Meios de congelao

Os meios utilizados foram previamente preparados pela empresa Reprodux Laboratórios Ltda. (Itapira, SP, Brasil; 2228'46.6"S 4645'28.6"W). Foi produzido a Soluo A (SolA), composta por 10,68% de Freezelip (Ref 026413; IMV Technologies) e 89,32% de Easy Buffer B (Ref 023862; IMV Technologies). Os crioprotetores foram adicionados previamente  congelao no sêmen diluído com SolA, sendo utilizados o dimetilsulfóxido (Ref 023862; IMV Technologies), o glicerol (Reprodux Laboratórios) e o metanol (Ref 026996; IMV Technologies).

7.3 Contenção química

O protocolo utilizado para a contenção química foi uma associação de um anestésico dissociativo, do grupo das ciclohexaminas, a cetamina, utilizada na dose de 5 mg/kg, associada a um sedativo, do grupo dos α -2 agonistas, a medetomidina, utilizada na dose de 0,1 mg/kg. Os pesos dos animais foram estimados através de inspeção visual e as doses individuais foram calculadas com base na estimativa destes pesos. Para a administração destes fármacos os animais foram contidos nos cambiamentos dos seus respectivos recintos, evitando assim riscos de acidentes após a administração da medicação para a contenção química. Em adição foram mantidos em jejum alimentar e hídrico de oito horas com o intuito de evitar vômito e possível aspiração do conteúdo gástrico devido ao início da ação das drogas. A associação anestésica foi administrada por via intramuscular, na face lateral dos membros posteriores com a utilização de zarabatana e dardos pressurizados, o que permite a aplicação das drogas a distância e com eficiência. Para que a manipulação pudesse ser realizada com segurança, aguardou-se 10 minutos desde a inoculação do anestésico, quando então os animais já haviam perdido os reflexos posturais de endireitamento e não respondiam mais a estímulos sonoros e táteis, tiveram seus olhos e ouvidos ocluídos com a finalidade de bloquear estímulos sonoros e visuais e foram transportados até a sala de procedimentos, onde foram conectados a um monitor multiparamétrico e posicionados para a realização da colheita de sêmen.

Após quarenta minutos da aplicação da medicação para a contenção química, tempo de ação aproximado da cetamina, e com o sêmen já colhido, os animais foram retornados aos seus respectivos cambiamentos onde foi administrado um reversor do fármaco α -2 agonista, a ioimbina. Esta medicação foi utilizada na dose de 0,2 mg/kg, por via intramuscular, utilizando-se seringas comuns para esta aplicação, o que fez com que os animais participantes do projeto retornassem da contenção química em um menor período. Após estarem completamente acordados e com deambulação normal foram soltos nos

seus recintos para que tivessem acesso à água e foram alimentados como de costume.

7.4 Colheita, avaliação e processamento do sêmen

O volume testicular foi calculado com paquímetro e aplicando a fórmula $V=1/6 \times \pi \times W^2 \times L$, onde V é o volume em mL, W é o diâmetro do testículo em cm e L é o comprimento em cm. O volume testicular final de cada animal foi considerado com base no valor do volume médio dos testículos direito e esquerdo, sendo que o único animal que não foi mensurado foi o de nome Oxossi.

A colheita de sêmen foi realizada conforme descrito por Araujo et al., (2018), que consiste na recuperação do sêmen por sondagem após 20 min da indução anestésica.

Com o animal monitorado e posicionado, o pênis foi exposto e limpo utilizando-se solução fisiológica e gaze. Após a limpeza a uretra foi sondada utilizando-se um cateter de oxigênio nasal tipo sonda 4FR, a qual foi introduzida aproximadamente 13 cm, sendo sua extremidade posicionada próxima a próstata (Foto 01). Em seguida uma seringa de um mL foi acoplada à sonda e foi realizada uma suave pressão negativa com a finalidade de aspirar o sêmen para o interior da sonda e da seringa (Foto 02), em apenas um dos animais (Aymará) este procedimento foi repetido gerando duas colheitas. Sequencialmente, o sêmen foi colocado em microtubo pré-aquecido a 28 °C e uma amostra de 3 µL foi diluída em SoIA para avaliação em sistema de análise computadorizado de sêmen (CASA) visando uma concentração de $\sim 20 \times 10^6$ /mL. O volume (µL) foi então avaliado usando uma pipeta de volume variável (Gilson Pipetman 10-100 µL) e em seguida o ejaculado foi diluído com SoIA (1:5).



Foto 01 – sondagem uretral para colheita de sêmen de onça pintada.



Foto 02 – seringa contendo sêmen de onça pintada obtido por colheita farmacológica.

A avaliação em sistema CASA conforme descrito em onças-pintadas por Jorge-Neto et al., (2020) foi realizada utilizando o equipamento CEROS II, com o software Animal Breeders II (Hamilton Thorne, USA). O setup utilizado é específico para onças-pintadas (Araújo et al., 2021; Jorge-Neto et al., 2020). Para isso, 3 µL da amostra de sêmen diluída previamente for carregada em uma cavidade da Câmera Leja 4-poços (Ref. 025107; IMV Technologies) e seis campos sequenciais foram avaliados. A diluição final foi calculada pelo software e visou uma concentração de 50×10^6 de células por mL.

O ejaculado pré-diluído foi então completado com o diluente no volume total e fracionado em três microtubos com igual volume e resfriados a 4°C por 2 horas. Após o resfriamento, os crioprotetores foram adicionados na concentração de 6,4% nos respectivos microtubos e as doses foram envasadas em palhetas finas (IMV Technologies) e congeladas em vapor de nitrogênio conforme descrito por Araujo et al., (2020)

7.5 Avaliação do sêmen fresco

A morfologia espermática foi analisada sob microscopia de contraste de fase (1000x), em preparado úmido de sêmen fresco fixado em solução formaldeído 4% em DMPBS. Foram contabilizadas de 78 (nos casos em que a quantidade de espermatozoides era bastante baixa) a 111 células, das quais foram registradas todas as anormalidades encontradas, sendo que a morfologia foi caracterizada de acordo com o manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA

7.6 Avaliação do sêmen descongelado

Foram comparadas duas temperaturas de descongelações: 37 °C durante 30 segundos e 50 °C durante 12 segundos. As doses foram descongeladas uma a uma utilizando descongelador de sêmen (Ref 450001; IMV Technologies Brasil). Após descongelada, a palheta foi completamente esvaziada com mandril, diluída 1:1 com Easy Buffer B e avaliada no equipamento IVOS II, utilizando o software Animal Breeders II (Hamilton Thorne, USA). O setup e procedimento de análise seguiu conforme previamente descrito.

8. RESULTADOS

A técnica de colheita de sêmen por sondagem uretral foi eficiente em todos os machos. Em média 25 min após a aplicação da medetomidina a primeira sondagem foi realizada.

O volume de sêmen médio obtido foi $117.8 \pm 54.7 \mu\text{L}$, com motilidade total média de $55,3 \pm 22,6\%$ e progressiva média de $36,3 \pm 18\%$. A concentração de espermatozoides foi de $2.344 \pm 1.613 \times 10^6$ espermatozoides/mL (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados dos parâmetros seminais de onça-pintada (*Panthera onca*)

Animal ID	Volume (μL)	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Spz/mL ($\times 10^6$)	Total Spz ($\times 10^6$)
Merlin	54	21.4%	10.3%	2893	156
Ferinha	180	27.1%	17.2%	51	9
Guarani	196	63.9%	39.0%	1521	298
Aimará EJ1	122	75.3%	57.1%	1951	238
Aimará EJ2	60	65.3%	35.6%	5380	323
Oxossi	95	78.9%	58.0%	2270	216
MÉDIA	117.8	55.3%	36.2%	2344	207
DES PAD	54.7	22.6%	18.0%	1613	104

O volume dos testículos direito e esquerdo foram respectivamente $8,8 \pm 3,1$ e $9,6 \pm 1,8$ cm³, o volume total dos testículos de $18,4 \pm 4,8$ cm³ e o peso relativo dos testículos em relação ao peso corporal foi de $0,27 \pm 0,05$ cm³/kg (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados da biometria testicular de onça-pintada (*Panthera onca*)

Animal ID	Peso (kg)	VTD (cm ³)	VTE (cm ³)	MVT (cm ³)	VTT (cm ³)	PRT (cm ³ /kg)
Merlin	70	13.25	11.23	12.240	24.480	0.35
Ferinha	49	5.40	7.62	6.511	13.022	0.27
Guarani	82	8.93	10.64	9.786	19.573	0.24
Aimará	63	5.52	7.23	6.375	12.749	0.20
Oxossi	70	0.00	0.00	0.000	0.000	0.00
MÉDIA	68,8	6.6	7.3	7.0	14.0	0.21
DES PAD	10,8	4.4	4.0	4.1	8.2	0.12

VTD = volume testículo direito; VTE = volume testículo esquerdo; MVT = média do volume dos testículos; VTT = volume total dos testículos; PRT = peso relativo dos testículos.

Quando comparando o tipo de crioprotetor (Tabela 3), não houve significância estatística entre DMSO e GLY (Glicerol) na análise pelo CASA, porém houve considerável diferença para o MET (Metanol), que apresentou resultado inferior. Em uma análise subjetiva, é possível verificar um melhor vigor dos espermatozoides no tratamento DMSO

Tabela 3. Motilidade total e progressiva pós-descongelação por influência do crioprotetor.

Crioprotetor	n	Motilidade Total %	Motilidade Progressiva %
DMSO	13	$5,28 \pm 2,51^a$	$1,22 \pm 0,89^c$
GLY	12	$4,29 \pm 2,49^a$	$1,26 \pm 1,14^c$
MET	12	$0,51 \pm 0,62^b$	$0,02 \pm 0,06^d$

Não houve diferença estatística entre as temperaturas de 37 °C por 30 segundos e 50 °C por 12 segundos, quando comparadas entre o mesmo diluente (Tabela 4).

Tabela 4. Motilidade total e progressiva pós-descongelamento por temperatura de descongelamento.

Crioprotetor	Temperatura °C	n	Motilidade Total %	Motilidade Progressiva %
DMSO	37	5	5,1 ± 3,14 ^a	1,42 ± 1,28 ^c
DMSO	50	8	5,4 ± 2,27 ^a	1,1 ± 0,62 ^c
GLY	37	4	3,92 ± 3,39 ^a	0,8 ± 1,23 ^c
GLY	50	8	4,47 ± 2,17 ^a	1,49 ± 1,1 ^c
MET	37	5	0,56 ± 0,56 ^b	0,04 ± 0,09 ^d
MET	50	7	0,47 ± 0,7 ^b	0 ± 0 ^d

Observou-se uma elevada proporção de espermatozoides com alterações morfológicas em todos os animais estudados (Tabela 5), com percentual de espermatozoides normais variando de oito a 45%.

Tabela 5. Avaliação morfológica de sêmen de onças-pintadas (*Panthera onca*).

Porcentagem (%)	Merlin	Ferinha	Guarani	Aymarã EJ1	Aymarã EJ2	Oxossi
Total de alterações morfológicas	97	59	111	101	92	84
Espermatozoides com alterações	92	55	89	88	83	84
Espermatozoides normais	8	45	11	12	17	16

Dentre as alterações morfológicas encontradas a de maior incidência foi a pseudogota, seguida de cauda dobrada e gota citoplasmática proximal (Tabela 6).

Tabela 6. Valores brutos das alterações morfológicas em sêmen fresco de onças-pintadas (*Panthera onca*)

	Merlin	Ferinha	Guarani	Aymará EJ1	Aymará EJ2	Oxossi
Ausente	1	1		1		
Knobbed Acrosome	4		3	2	5	
Coloração anormal		1	1	7		
Contorno anormal	1	8	10		2	
Estreito na base		2				
Isolada normal		2				
Microcefalia (pequeno normal)		2				
Pequeno anormal	2			2	1	
Vesiculososo		1				1
Aplasia segmentar	1	2				
Corkscrew					1	1
Desnuda			3			
Edema	3	2	6	1		7
Espessamento		2				
Fratura de PI		6		1		
Pseudogota	56	6	37	55	47	44
Oblíquo		1				
Cauda dobrada	6	10	4	13	5	9
Cauda enrolada		3	1	1		
Cauda fortemente dobrada	1	1	2	3	2	3
Cauda fortemente enrolada	1	2	2	4	3	4
Cauda fortemente enrolada com gota (DAG)	1				1	
Subdesenvolvido	1				1	
GCP	19	9	7	4	4	3

9. DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas a primeira barreira a ser transposta é a colheita e análise de sêmen (Barnabe et al., 2002). Segundo Jorge Neto et al.(2019) a obtenção de volumes representativos de sêmen de felinos selvagens é uma dificuldade a ser vencida pois técnicas comumente utilizadas em animais domésticos não se aplicam a estas espécies.

A colheita farmacológica tem sido o método de escolha para colheita de sêmen em felinos, substituindo gradativamente a eletroejaculação (EE) (ARAUJO et al., 2018; LUEDERS et al., 2012; ZAMBELLI et al., 2008). Este método tem por vantagem a colheita de amostras mais concentradas, sem a necessidade de aplicar estímulos elétricos no animal, que influenciam na manutenção anestésica. Outra vantagem da colheita farmacológica é a redução (a praticamente zero) da contaminação por urina (ARAUJO et al., 2018; LUEDERS et al., 2012; ZAMBELLI et al., 2008), algo que acontece com frequência nas colheitas por EE.

O protocolo anestésico proposto para a colheita farmacológica foi primeiramente usado em gatos (ZAMBELLI et al., 2008) por meio da ação da medetomidina sobre a musculatura lisa do trato gênito urinário. Este mesmo protocolo foi usado com eficiência em onças-pintadas, associando a medetomidina com a cetamina, obtendo assim um protocolo anestésico eficaz e seguro e que permite a recuperação dos espermatozoides após sondagem uretral (ARAUJO et al., 2018). Este protocolo anestésico inclusive tem sido de escolha para procedimentos gerais na espécie, principalmente pela possibilidade de reversão da anestesia (por meio da ioimbina ou atipamezole) Luczinski et al. (2020) relataram a utilização deste protocolo também em fêmeas, antes da indução anestésica, para a realização de colheita de oócitos por videolaparoscopia, mostrando-se um protocolo bastante eficiente e seguro.

A colheita farmacológica de sêmen por cateterização uretral é o método padrão ouro atualmente utilizado para obtenção de sêmen em

felinos selvagens (Araujo et al., 2018; Jorge Neto et al., 2019; Lueders et al., 2012), e permitiu recuperar com eficiência sêmen dos cinco machos. Colher sêmen com eficiência é o primeiro passo no desenvolvimento de tecnologia de reprodução assistida para uma espécie (Pizzutto et al., 2021b), visando permitir no futuro o aumento da variabilidade genética entre populações *in situ* e *ex situ*, englobando o conceito Conservação Única (Pizzutto et al., 2021a, 2021b).

Os felídeos selvagens são predadores topo de cadeia e geralmente possuem menor qualidade espermática além de um menor volume de ejaculado. As onças-pintadas possuem o peso relativo dos testículos similar a outras espécies de felídeos (Gañán et al., 2010; Morais et al., 2002; Stoops et al., 2007), porém menor quando comparado espécies de reprodução cooperativa especializada (Johnston et al., 2007; Silvatti et al., 2020; van den Berghe et al., 2019). Em relação ao pênis, tanto em onças-pintadas *ex situ* e quanto *in situ* pode-se observar a ausência ou escassez de espículas penianas em animais adultos, mesmo havendo a produção de sêmen com boa qualidade (Araújo et al., 2021).

A utilização de um crioprotetor torna-se importante para a proteção contra a formação de cristais de gelo, geralmente utiliza-se o glicerol em concentrações que variam de 2 a 10%, porém outros crioprotetores já foram utilizados, como por exemplo o DMSO (Silva et al., 2019).

A aplicação de biotecnologias reprodutivas estão restritas a algumas espécies de carnívoros neotropicais com os protocolos de criopreservação ainda em desenvolvimento (Silva et al., 2019).

De acordo com Araújo et al. (2021), o meio mais utilizado na criopreservação de sêmen de grandes felinos é o TRIS-gema-glicerol onde a concentração de glicerol varia de 4 a 7,5%. Sendo os componentes desse meio o TRIS (que evita que o meio se torne ácido ou básico em excesso e também fornece açúcares para a célula), a gema de ovo (age protegendo a superfície dos espermatozoides) e o glicerol (protege as células contra rompimentos causados pela formação de partículas de gelo) (Silva et al., 2019).

A instabilidade da gema de ovo e sua limitação para exportação demonstram a necessidade de se investigar alternativas que vem sendo utilizadas em outras espécies, apesar de todos os trabalhos realizados em grandes felinos com esse meio (Araújo et al., 2021). Toda essa instabilidade nos motivou a realizar este estudo comparando outros três meios para a criopreservação espermática da onça-pintada.

Silva e Guerra (2011) consideram que a utilização de crioprotetores intracelulares como o DMSO pode ajudar a prevenir danos osmóticos causados pela adição de crioprotetores antes da colheita. Já Castelo (Castelo et al., 2015) relatou que em pacas o glicerol foi mais eficiente na preservação da resposta osmótica, comparado ao DMSO, em qualquer concentração, porém não houve diferença significativa entre eles em relação ao vigor espermático, espermatozoides morfologicamente normais e integridade acrossômica. Apesar de nossas análises terem sido restritivas ao CASA, ambos os crioprotetores também se mostraram superiores em relação ao metanol no que tange as motilidades total e progressiva. O mesmo autor (Castelo et al., 2015) também comentou que nesta espécie o DMSO a 6% provocou um significativo aumento nos danos da cromatina se comparado a mesma substância na concentração de 3%.

O glicerol é atualmente o crioprotetor de escolha para sêmen de mamíferos (Castelo et al., 2015), porém, Bianchi (Bianchi, 2007) relatou que em suínos a redução da motilidade nas avaliações pós-descongelamento, pode estar associada a um efeito citotóxico devido a presença de glicerol no diluidor de congelamento.

Mocé and Vicente (2009) comentaram que quando o sêmen de coelho está com um diluente com altos níveis de DMSO o choque frio não é um problema e que os protocolos para a criopreservação de sêmen desta espécie podem ser encurtados.

A motilidade espermática pós-descongelamento em lobos vermelhos foi menor nos tratamentos a base de DMSO versus glicerol, portanto, o DMSO deve ser considerado um crioprotetor inadequado para o sêmen desta espécie (Franklin et al., 2018). Porém Johnson (Johnson et al., 2014) afirmou que em canídeos os resultados obtidos com o DMSO,

superam o glicerol, quando testados na criopreservação de sêmen de lobo-guará (*C. brachyurus*). Já em felinos silvestres, segundo (Decosouza et al., 2013) o glicerol é utilizado rotineiramente, protegendo as células das consequências da cristalização, aumentando a fração de água não congelada no meio extracelular.

Em bovinos não houve vantagem em utilizar o metanol como substituto do glicerol no congelamento de sêmen e o glicerol forneceu as melhores características espermáticas após congelamento e descongelamento (Awad, 2011).

Já em gatos o metanol apresentou a menor eficácia crioprotetiva quando comparado ao DMSO e ao glicerol como crioprotetores de sêmen (Buranaamnuay, 2020).

Devido a uma extensa variação de resultados dos crioprotetores mencionados em diferentes espécies, aos poucos trabalhos existente com sêmen de onça-pintada e, segundo Araújo et al.(2021) a instabilidade e limitações dos meios atualmente utilizados em grandes felinos, se faz necessário investigar alternativas empregadas em outras espécies.

Nos animais estudados, a análise morfológica do sêmen demonstrou elevados índices de patologias espermáticas, mesmo em indivíduos com fertilidade comprovada em monta natural (Guarani e Aymar). Ferinha, apesar de ser o animal com menores propores de espermatozoides patológicos, não teve sucesso reprodutivo em nenhuma das tentativas de pareamento. Apresentou também baixa produção espermática o que pode ser justificado pelo fato de estar pareado e a fêmea estar no cio no dia da colheita de sêmen (Tabela 1).

A teratospermia é considerada quando há mais de 60% de espermatozoides anormais no ejaculado. Pukazhenthil et al.(2006) relatou que há uma grande incidência desta condição em felinos, podendo a redução de diversidade genética contribuir para este fenmeno. Porém, as classificações de defeitos utilizadas foram baseadas em trabalhos com bovinos, não necessariamente sendo aplicável aos felídeos. Neste trabalho, o animal com menor quantidade de espermatozoides anormais (Ferinha)  infértil, tendo copulado com

diferentes fêmeas por diversas vezes sem fecundá-las ou resultando em morte embrionária precoce, num momento em que ainda não é possível ser feito o diagnóstico de gestação. Em contrapartida, animais com alta incidência de espermatozoides anormais (Guarani, Aymar), ao copularem com as mesmas fêmeas que Ferinha, se tornaram gestantes e vieram a termo. Portanto,  questionável a aplicação de tais classificações de morfologia em felídeos, e uma classificação específica deveria ser desenvolvida.

10. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados possibilitaram concluir que as motilidades total e progressiva analisadas pelo CASA não apresentaram diferença entre os crioprotetores DMSO e o glicerol, porém se mostraram superiores quando comparadas ao Metanol. Além disto, os três crioprotetores avaliados não mostraram diferenças nas análises espermáticas quando avaliadas duas temperaturas de descongelação distintas (37C e 50C) para o mesmo diluente. A qualidade espermática mostrou-se ruim, se a classificação de Blum for considerada, sendo esta descrita para bovinos, visto as elevadas taxas de alterações morfológicas dos espermatozoides encontradas em todos os animais estudados. As alterações morfológicas encontradas com maior incidência foram as pseudogotas, seguida de cauda dobrada e gota citoplasmática proximal.

11. BIBLIOGRAFIA

- Araújo, G.R. de, Jorge-Neto, P.N., Csermak-Jr, A.C., Pizzutto, C.S., Luczinski, T.C., Deco-Souza, T. de, 2021. Avanços na andrologia de grandes felinos neotropicais. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 45, 219–228. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.028>
- Araujo, G.R., Deco-Souza, T., Bergo, L.C.F., Silva, L.C., Morato, R.G., Jorge-Neto, P.N., Silva, M.C.C. da, Macedo, G.G., Paula, T.A.R., 2020. Field friendly method for wild feline semen cryopreservation. *J. Threat. Taxa* 12, 15557–15564. <https://doi.org/10.11609/jott.5744.12.5.15557-15564>
- Araujo, G.R., Paula, T.A.R., Deco-Souza, T., Morato, R.G., Bergo, L.C.F., Silva, L.C. da, Costa, D.S., Braud, C., 2018. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. *Anim. Reprod. Sci.* 195, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.019>
- Awad, M.M., 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.01.003>
- Barnabe, R.C., Barros, M.A. de, Oliveira, C.A., Barnabe, A.H., 2002. Analysis of some normal parameters of the spermogram of captive capuchin monkeys (*Cebus apella* Linnaeus, 1758). *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, 39, 331–333.
- Barnes, S.A., Andrew Teare, J., Staaden, S., Metrione, L., Penfold, L.M., 2016. Characterization and manipulation of reproductive cycles in the jaguar (*Panthera onca*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 225, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.012>
- Bianchi, I., 2007. Congelamento de sêmen suíno: estudo de crioprotetores intra e extracelulares, metodologias de congelamento e marcador molecular de congelabilidade 95.
- Blom, E., 1973. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Vet. Med.* 25, 383–391.
- Brown, J.L., 2011. Female reproductive cycles of wild female felids. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.024>
- Buranaamnuay, K., 2020. Effect of different permeable cryoprotectants on the quality of cat epididymal spermatozoa. *Cryo Letters* 41, 237–244.

- Castelo, T., Rodríguez, T., Rodriguez, A., 2008. Considerations on goat semen cryopreservation. *Acta Vet. Bras.* 2, 67–75.
- Castelo, T.S., Silva, A.M., Bezerra, L.G.P., Costa, C.Y.M., Lago, A.E.A., Bezerra, J.A.B., Campos, L.B., Praxedes, E.C.G., Silva, A.R., 2015. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). *Cryobiology* 71, 442–447. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.09.005>
- Castro, S.V., Carvalho, A. de A., da Silva, C.M.G., Faustino, L.R., da Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., 2011. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Sci. Vet.* 39, 1–18.
- Comizzoli, P., Holt, W. V., 2014. Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species. *Adv. Exp. Med. Biol.* 753, 331–356. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-820-2_14
- da Paz, R.C.R., Züge, R.M., Barnabe, V.H., 2007. Frozen jaguar (*Panthera onca*) sperm capacitation and ability to penetrate zona free hamster oocytes. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 44, 337–344. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26616>
- Deco-souza, T. De, Paula, T.A.R. De, Costa, D.S., Costa, P., Bosco, J., Barros, G. De, Ribeiro, G., 2013. Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*) 1 33, 512–516.
- Franklin, A.D., Waddell, W.T., Goodrowe, K.L., 2018. Red wolf (*Canis rufus*) sperm quality and quantity is affected by semen collection method, extender components, and post-thaw holding temperature. *Theriogenology* 116, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.007>
- Gañán, N., Sestelo, A., Garde, J.J., Martínez, F., Vargas, A., Sánchez, I., Pérez-Aspa, M.J., López-Bao, J.V., Palomares, F., Gomendio, M., Roldan, E.R.S.S., 2010. Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction* 139, 275–285. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0259>
- Gonzalez, R.A.F., 2004. Congelação E Crioprotetores Sobre Parâmetros Espermáticos E a Integridade De Membranas Do. Univ. São Paulo.
- Holt, W. V., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47–58.

- [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- ICMBio, 2013. Plano de ação nacional para a conservação da onça-pintada, ICMBio: Brasília.
- Johnson, A.E.M., Freeman, E.W., Wildt, D.E., Songsasen, N., 2014. Spermatozoa from the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) display typical canid hypersensitivity to osmotic and freezing-induced injury, but respond favorably to dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 68, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.004>
- Johnston, S.D., Ward, D., Lemon, J., Gunn, I., MacCallum, C.A., Keeley, T., Blyde, D., 2007. Studies of male reproduction in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Anim. Reprod. Sci.* 100, 338–355. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.017>
- Jorge-Neto P. N. , Pizzutto C. S, Araujo G. R. , Deco-Souza T. , Silva L. C., Salomão Jr J. A., B.H. erna., 2018. Copulatory behavior of the Jaguar *Panthera onca* (Mammalia: Carnivora: Felidae). *J. Threat. Taxa* 10, 12933–12939.
- Jorge-Neto, P.N., Araújo, G.R., Silva, M.C.C., Salomão-Jr, J.A., Csermak-Jr, A.C., Pizutto, C.S., Deco-Souza, T., Camus, A.D., 2020. Description of the CASA system configuration setup for jaguar (*Panthera onca*). *Anim. Reprod. Sci.* 220, 40–41. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106436>
- Jorge Neto, P.N., Araujo, G.R., Deco-souza, T. de, Bittencourt, R.F., Csermak Jr, A.C., Pizzutto, C.S., Silva, M.C.C. da, Salomão Jr, J.A., Madrigal-Valverde, M., Curvelo, V.P., Gomes, M.C., Paula, T.A.R. de, 2019. Pharmacological semen collection of Brazilian wild felids, in: *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. p. 704.
- Kasai, M., 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 67–75. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01536-9](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01536-9)
- Luczinski, T.C., Araújo, G.R. de, Silveira, M.F., Kirnew, M.D., Navarrete, R.A., Salomão-Jr, J.A., Requena, L.A., Santos, J.A.M. dos, Koshiyama, M.H., Pizzutto, C.S., Jorge-Neto, P.N., 2020. Medetomidine may cause heart murmur in Cougars and Jaguars: case report. *J. Threat. Taxa* 12, 17000–17002. <https://doi.org/10.11609/jott.6098.12.14.17000-17002>
- Lueders, I., Luther, I., Scheepers, G., van der Horst, G., 2012. Improved semen collection method for wild felids: Urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). *Theriogenology* 78, 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.026>

- Martins, C.F., 2020. Cellular Characterization and Effects of Cryoprotectant Solutions on the Viability of Fibroblasts from Three Brazilian Wild Cats 00, 1–8. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0059>
- Mocé, E., Vicente, J.S., 2009. Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Anim. Reprod. Sci.* 110, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.015>
- Morais, R.N., Mucciolo, R.G., Gomes, M.L.F., Lacerda, O., Moraes, W., Moreira, N., Graham, L.H., Swanson, W.F., Brown, J.L., 2002. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 57, 2027–2041. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00707-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00707-0)
- Morato, R.G., Verreschi, I.T.N., Guimarães, M.A.B.V., Cassaro, K., Pessuti, C., Barnabe, R.C., 2004. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). *Theriogenology* 61, 1273–1281. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.011>
- Morato RG, Beisiegel BM, Ramalho EE, Campos CB, B.R., 2013. Avaliação do risco de extinção da onça-pintada *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). *Biodiversidade Bras.* 0, 122–132.
- Neves, P.R., 2008. UTILIZAÇÃO DE CRIOPROTETORES INTRA E EXTRACELULARES EM EMBRIÕES DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*). Diss. doutorado 80.
- Pegg, D.E., 2007. Principles of Cryopreservation, in: *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press, pp. 39–57. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_3
- Pereira, R.M., Marques, C.C., 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank.* 9, 267–277. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9075-2>
- Pizzutto, C.S., Araújo, G.R. de, Csermak-Jr, A.C., Jorge-Neto, P.N., Luczinski, T.C., Deco-Souza, T. de, 2021a. Uma visão integrada das biotecnologias reprodutivas com o conceito de One Conservation. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 45, 241–245. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.031>
- Pizzutto, C.S., Colbachini, H., Jorge-Neto, P.N., 2021b. One Conservation: the integrated view of biodiversity conservation. *Anim. Reprod.* 18, e20210024. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0024>
- Pukazhenthii, B.S., Neubauer, K., Jewgenow, K., Howard, J., Wildt, D.E., 2006. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild

- relatives. *Theriogenology* 66, 112–121.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.020>
- Rosato, M.P., Iaffaldano, N., 2013. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* 79, 508–516.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.008>
- Saeki, E.K., Farhat, L.P., Pontes, É.A., 2015. Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos. *Acta Vet. Bras.* 9, 195–198.
- Sanches, B.V., 2009. Uso De Propanediol Ou DmsO Na Vitrificação De Embriões Bovinos Produzidos In Vitro , Cultivados Ou Embriões Bovinos Produzidos In Vitro , Cultivados Ou.
- SIGRIST, T., 2012. Mamíferos do Brasil: uma visão artística. Avisbrasilis Editora.
- Silva, H.V.R., 2019. Caracterização e criopreservação de sêmen de onça-pintada (*Panthera onca*). Universidade Estadual do Ceará.
- Silva, H.V.R., Nunes, T.G.P., Brito, B.F., Campos, L.B., Silva, A.M. da, Silva, A.R., Comizzoli, P., Silva, L.D.M. da, 2020a. Influence of different extenders on morphological and functional parameters of frozen-thawed spermatozoa of jaguar (*Panthera onca*). *Cryobiology* 92, 53–61.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.195>
- Silva, H.V.R., Nunes, T.G.P., Brito, B.F., Campos, L.B., Silva, A.M. da, Silva, A.R., Comizzoli, P., Silva, L.D.M. da, 2020b. Influence of different extenders on morphological and functional parameters of frozen-thawed spermatozoa of jaguar (*Panthera onca*). *Cryobiology* 92, 53–61.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.195>
- Silva, H.V.R., Silva, A.R., da Silvada, L.D.M., Comizzoli, P., 2019. Semen cryopreservation and banking for the conservation of neotropical carnivores. *Biopreserv. Biobank.* 17, 183–188. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0104>
- Silva, S. V, Guerra, M.M.P., 2011. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias Cryopreservation effects on sperm cells and alternatives for crioinjury reduction. *Rev. Bras. Reprod. Anim* 4, 370–384.
- Silvatti, B., Granato, T.M., Jorge-Neto, P.N., Luppi, M.M.C.P., Reisfeld, L.C., Henrique,

- P.C., Padilha, F.L.A., Leite, R.F., Losano, J.D. de A., Kawai, G.K.V., Nichi, M., Pizzutto, C.S., 2020. Sperm evaluation and morphological description of male genitalia of meerkats (*Suricata suricatta*). *Anim. Reprod. Sci.* 221, 106585. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106585>
- Stoops, M.A., Bond, J.B., Bateman, H.L., Campbell, M.K., Levens, G.P., Bowsher, T.R., Ferrell, S.T., Swanson, W.F., 2007. Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous in vitro fertilisation success in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 685. <https://doi.org/10.1071/RD06078>
- van den Berghe, F., Paris, M.C.J., Sarnyai, Z., Briggs, M.B., Millar, R.P., Ganswindt, A., Paris, D.B.B.P., 2019. Social rank does not affect sperm quality in male African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 31, 875. <https://doi.org/10.1071/RD18205>
- Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 481–492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
- Wells, H., Strauss, E.G., Rutter, M.A., Wells, P.H., 1998. Mate location, population growth and species extinction. *Biol. Conserv.* 86, 317–324. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(98\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(98)00032-9)