

AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA DE FELÍDEOS CATIVOS DE UM ZOOLOGICO SUL-AMERICANO

SAROLLI, Vania Maria Muffato¹
ERDMANN, Renato Herdina²

RESUMO

Há uma necessidade na ampliação de conhecimentos sobre os felinos neotropicais visto que a maioria das 38 espécies de felídeos está classificada como ameaçada, vulnerável ou em extinção devido a diversos fatores como a fragmentação de habitat e baixo índice de reprodução em cativeiro. Instituições que abrigam e reproduzem estes animais devem assumir o papel de banco de reserva genômica para a conservação dessa diversidade biológica, atuando como um mediador entre programas de conservação *ex situ* e *in situ*. Estudos andrológicos têm como objetivo melhorar a compreensão da fisiologia reprodutiva de animais em cativeiro. A eletroejaculação é o método de escolha mais apropriado para coleta de sêmen de felídeos, por ser simples, rápido, prático e seguro. Este trabalho teve como objetivo realizar a análise andrológica e avaliar a viabilidade do sêmen coletado dos felídeos silvestres de um zoológico sul-americano através dos parâmetros de consistência e volume testiculares, morfologia do pênis e concentração, motilidade, vigor, índice de motilidade espermática, morfologia e patologias dos espermatozoides, a fim de validar as amostras para utilização posterior em programas de reprodução assistida e na oportunidade de criação de um banco de reserva genética, contribuindo para a conservação de espécies em extinção. O protocolo anestésico e de eletroejaculação e a metodologia de confecção de lâminas utilizados mostraram-se eficazes para a coleta de sêmen viável e não contaminado para as espécies estudadas neste trabalho, e análise morfométrica dos seus espermatozoides.

PALAVRAS-CHAVE: Exame andrológico, Eletroejaculação, Reprodução Animal, *Leopardus spp.*, *Panthera onca*.

1. INTRODUÇÃO

Existe uma importante lacuna de conhecimentos sobre os felinos neotropicais (MORAES et al., 2015), o que fomenta a necessidade de pesquisa, já que a maioria das 38 espécies de felídeos está classificada como ameaçadas, vulneráveis ou em extinção devido a diversos fatores como a fragmentação de habitat, caça ilegal e baixa densidade populacional (POPE, 2000; DECO-SOUZA et al., 2010; TRIGO et al., 2013; BAGGIO JR & CAVALCANTI, 2014; MORAES et al., 2015).

A fragmentação de habitat acontece devido à construção de barreiras físicas como estradas e cultivos agrícolas, diminuindo os limites de ocupação dos animais e sua habilidade em achar parceiros para reprodução, aumentando as chances de consangüinidade e causando perda da diversidade genética nas populações (HOLT & PICKARD, 1999; POPE, 2000). Além dos fatores citados acima, a poluição ambiental, a baixa disponibilidade de alimentos, o alto grau de parentesco entre as populações e o baixo índice reprodutivo são obstáculos para a sobrevivência de felídeos (HOLT & PICKARD, 1999; POPE, 2000; PAZ et al., 2003; DECO-SOUZA et al., 2010).

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Assis Gurgacz – PR. E-mail? vaniamuffato@gmail.com.

² Médico Veterinário. Doutor em Ciências - Zootecnia (UFPR). Professor do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Assis Gurgacz – PR. E-mail: renato.erdmann@pucpr.br.

A consanguinidade aumenta o risco de doenças genéticas hereditárias, defeitos congênitos e susceptibilidade a infecções, diminuindo a sobrevivência dos animais, e resultando em prejuízo nas funções fisiológicas como a produção de espermatozóides viáveis e a habilidade de manter uma gestação (HOLT & PICKARD, 1999). Os animais em cativeiro estão envelhecendo, e com isso ficando mais suscetíveis a doenças e comprometendo a qualidade dos seus gametas (MOREIRA, 2017).

A conservação das espécies está ligada diretamente à manutenção da variabilidade genética, ou seja, quando uma população fica isolada, apresenta uniformidade genética e está mais propensa a doenças e redução da fertilidade, acelerando sua extinção (DECO-SOUZA et al., 2010).

A manutenção da diversidade genética depende da reprodução, fazendo com que a aplicação de técnicas de reprodução assistida associada à biotecnologia em felídeos em cativeiro ganhe aceitação e se torne ferramenta importante para a conservação de animais ameaçados de extinção, diminuindo a perda de variabilidade genética e auxiliando no equilíbrio natural do planeta (POPE, 2000; MICHELETTI et al., 2011; SILVA, ACKERMANN & SILVA, 2012).

Uma grande preocupação nos últimos anos é a possibilidade de extinção de algumas espécies por causas não naturais, ou seja, por efeitos antrópicos deletérios (HOLT & PICKARD, 1999). Por isso, a urgência na preservação de espécies ameaçadas estimulou estudos na reprodução de felídeos (ERDMANN, 2013), e devido à perda de habitat ser a causa principal de extinção, instituições que reproduzem animais *ex situ* devem assumir o papel de banco de reserva genômica para a conservação dessa biodiversidade (ERDMANN et al., 2005; MICHELETTI et al., 2011). Programas *in situ* e *ex situ* para a conservação de felídeos ameaçados permite a obtenção de filhotes selecionados, visando à variabilidade genética e diminuindo o tempo entre duas gerações (DECO-SOUZA et al., 2010; ERDMANN, 2013).

O termo banco de reserva genética é usado para repositórios utilizados em procedimentos como inseminação artificial ou transferência de embrião quando necessário, como um mediador entre programas de conservação *ex situ* e *in situ* (HOLD & PICKARD, 1999). O objetivo de um banco genômico é armazenar a longo prazo materiais biológicos de cunho genético através da criopreservação, tentando conservar espécies e manter a variabilidade genética (MARTINS & JUSTINO, 2015). Cada país deve identificar suas prioridades de pesquisa e focar em espécies de interesse local. Existe um benefício intelectual e prático em ter um banco de reserva genética local, diminuindo a necessidade de transporte internacional e o risco de introdução de doenças exóticas (HOLD & PICKARD, 1999; SILVA, ACKERMANN & SILVA, 2012).

Como o número de espécies que necessitam de programas de conservação é grande, e o conhecimento da fisiologia reprodutiva é limitado, escolher os animais e realizar a reprodução

assistida com sucesso para esses programas é um desafio a ser superado (HOLT & PICKARD, 1999; MICHELETTI et al., 2011).

Estudos andrológicos têm como objetivo melhorar a compreensão da fisiologia reprodutiva, sendo necessários para o bom desempenho reprodutivo desses animais, aumentando assim o número de indivíduos que se reproduzem em cativeiro (ERDMANN et al., 2005).

Dentro desse contexto, estudar a morfologia testicular em animais selvagens é essencial para determinar padrões fisiológicos, estabelecendo então protocolos para a reprodução assistida, pois a composição do parênquima testicular e o seu tamanho são reflexos da fisiologia reprodutiva do animal (BARROS et al., 2006). São características da maioria dos felídeos a presença de espículas andrógeno-dependentes no pênis, podendo ser usadas como indicadores da capacidade androgênica de cada indivíduo (DECO-SOUZA et al., 2010).

Deve-se avaliar ainda microscopicamente a motilidade, o vigor, a concentração e a morfologia espermática das amostras após suas coletas (MARTINS & JUSTINO, 2015). A avaliação morfológica dos espermatozóides permite mensurar a porcentagem de células com defeitos e células viáveis (MARTINS & JUSTINO, 2015).

A eletroejaculação é o método de escolha mais apropriado para coleta de sêmen de felídeos, por ser simples, rápido e prático. É feito em segurança através de contenção química, porque estes animais são agressivos ou não condicionados para a utilização de vagina artificial, permitindo a análise andrológica de animais com alto valor genético (DECO-SOUZA et al., 2010; SILVA et al., 2011; ERDMANN et al., 2013; MARTINS & JUSTINO, 2015; MOREIRA, 2017). A anestesia evita riscos à equipe, mas expõe o animal aos riscos do procedimento (SILVA et al., 2011). A contenção química é fundamental para coleta de sêmen nesses animais, e apresenta riscos maiores em animais idosos devido a doenças crônicas ou degenerativas ainda não diagnosticadas (MOREIRA, 2017). Porém, em cativeiro, é possível selecionar os animais que apresentam menores riscos para os procedimentos.

O primeiro uso de eletroejaculação em felídeos foi em gatos domésticos na década de 70 (SILVA et al., 2011). Protocolos de eletroejaculação já foram desenvolvidos para pelo menos 28 espécies de felídeos (SILVA et al., 2011). O protocolo de ejaculação descrito por Howard (1993) é amplamente utilizado em várias espécies de felídeos selvagens como tigre, onça parda, jaguatirica e onça pintada (DECO-SOUZA et al., 2010; ÁVILA et al., 2012; ERDMANN, 2013). A eletroejaculação causa frequentemente contaminação por urina nas amostras de sêmen, contudo um estudo realizado por Ávila et al. (2012) demonstrou que este protocolo não apresentou essa condição. Voltagens mais elevadas e posicionamento muito cranial do transdutor retal aumentam a chance de contaminação por urina no procedimento (MOREIRA, 2017).

Erdmann (2013) concorda com Moreira (2017) e diz que os estímulos elétricos da eletroejaculação podem gerar desconforto e sensibilidade muscular nos animais, e o relaxamento muscular vesical causado pela anestesia necessária pode ocasionar a contaminação por urina do sêmen e perda da motilidade espermática, contrário ao que disse Ávila et al. (2012).

Este trabalho tem como objetivo realizar a análise andrológica e avaliar a viabilidade do sêmen coletado dos felídeos silvestres de um zoológico sul-americano através de parâmetros testiculares e seminais, a fim de validar as amostras para serem utilizadas posteriormente em programas de reprodução assistida, contribuindo para a conservação de espécies em extinção e sua variabilidade genética.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Assis Gurgacz através do protocolo nº 042/2017 de 05 de setembro de 2017.

As coletas do presente estudo foram realizadas entre os dias 29 e 31 de março de 2017, num zoológico conservacionista na América do Sul. Foram utilizados oito animais machos: duas jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758), dois gatos-do-mato pequenos (*Leopardus guttulus*, Hensel, 1872), dois gatos-do-mato grandes (*Leopardus geoffroyi*, d'Orbigny & Gervais, 1844) e duas onças-pintadas (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758), sendo uma destas melânica.

Os animais da espécie *L. pardalis*, *L. guttulus* e *L. geoffroyi* eram capturados utilizando-se puçás e a aplicação de medicação para contenção química (CQ) via intramuscular (IM) ainda no recinto e então colocados em caixas de transporte. Para *P. onca* a CQ via IM era aplicada através de dardos, e somente após o efeito confirmado elas eram capturadas. Após contenção, os animais eram levados para outro local, adaptado para os procedimentos de coletas e exames.

Os pesos estimados de cada animal estão na Tabela 1, e os protocolos anestésicos, que eram realizados conforme estes pesos, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 1 – Pesos estimados dos animais em kg.

Indivíduo	Peso estimado (kg)	
<i>Leopardus guttulus</i>	147	3,5
<i>Leopardus guttulus</i>	664	3,5
<i>Leopardus geoffroyi</i>	343	3,5
<i>Leopardus geoffroyi</i>	451	3,5
<i>Leopardus pardalis</i>	686	8,0

<i>Leopardus pardalis</i>	537	15,0
<i>Panthera onca</i>	202	60,0
<i>Panthera onca</i>	303	75,0

Tabela 2 – Medicamentos e suas respectivas doses estimadas utilizados na contenção química dos animais.

Indivíduo		Dexmedetomidina (µg/kg)	Midazolam (mg/kg)	Metadona (mg/kg)	Dextroacetamina (mg/kg)
<i>Leopardus guttulus</i>	147	10,0	0,3	0,2	-
<i>Leopardus guttulus</i>	664	10,0	0,3	0,2	-
<i>Leopardus guttulus</i>	343	10,0	0,3	0,2	-
<i>Leopardus guttulus</i>	451	10,0	0,3	0,2	-
<i>Leopardus pardalis</i>	686	20,0	-	-	-
<i>Leopardus pardalis</i>	537	10,0	0,3	0,0	-
<i>Panthera onca</i>	202	10,0	0,3	-	3,0
<i>Panthera onca</i>	303	10,0	0,3	-	3,0

Os medicamentos usados como contenção química eram dexmedetomidina, midazolam, metadona e dextroacetamina. Era feito acesso venoso em todos os animais para manutenção anestésica *in bolus* com propofol dose-efeito (2,0 a 8,0mg/kg), dependendo da resposta do indivíduo. A reversão da anestesia era realizada com atipamezole (35µg/kg).

Assim que o animal chegava ao local, era entubado e mantido em fluxo contínuo de oxigênio (10mL/kg) utilizando-se o aparelho de anestesia inalatória portátil Vetcase Brasmed® durante todos os procedimentos.

O animal era então posicionado em decúbito lateral esquerdo, posicionavam-se os transdutores, sensores e manguito para monitoramento dos sinais vitais frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão sistólica, pressão diastólica, pressão média, temperatura, saturação de oxigênio e pressão arterial, através do monitor multiparamétrico MMED 6000DP Med Choice®.

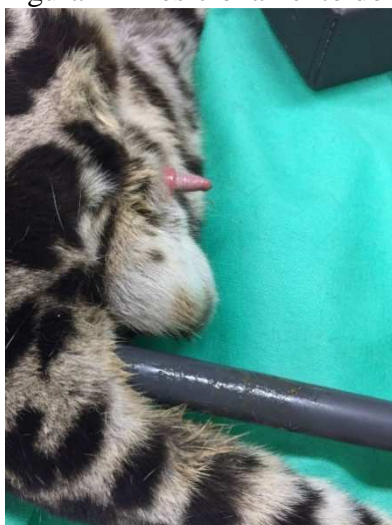
Os testículos eram palpados para avaliação da consistência e formato, e mensurados utilizando-se paquímetro em comprimento e largura (Figura 1), para cálculo de volume total através da fórmula $\text{Volume} = \text{Comprimento} \times \text{Largura}^2 \times 0,524$. O pênis era exposto suavemente pressionando sua base, e avaliava-se sua morfologia, bem como a presença, formato e quantidade de espículas, presença ou não de secreções e integridade.

Figura 1 – Mensuração testicular com auxílio de paquímetro.



Após essa análise, prosseguia-se para o procedimento de eletroejaculação de acordo com protocolo proposto por Howard (1993). Os comprimentos dos transdutores retais utilizados para *L. guttulus*, *L. geoffroyi*, *L. pardalis* e *P. onca* foram de 12, 12, 24 e 35cm respectivamente. Era utilizado gel lubrificante para introdução no ânus do animal, até os eletrodos estarem na direção da próstata. Realizava-se três séries de estímulos elétricos que variavam entre 2 e 5V, totalizando 80 estímulos divididos em 30, 30 e 20 estímulos por série, com o aparelho PT Eletronics® 303. Um frasco plástico transparente com capacidade de 1,5mL era posicionado no pênis para coleta do sêmen ejaculado. Verificava-se também se havia ou não ereção nos estímulos. A Figura 2 mostra o posicionamento do transdutor retal e exposição do pênis.

Figura 2 – Posicionamento do transdutor retal e exposição do pênis de *Leopardus geoffroyi*.



Diluía-se então o sêmen coletado na fração 1:4 e uma gota dessa diluição era colocada em lâmina de vidro para avaliação de motilidade e vigor em microscópio óptico em aumento de 40X. A

motilidade era avaliada em porcentagem (0-100%) e o vigor numa escala de 0 a 5. Com esses parâmetros calculava-se o índice de motilidade espermática (IME) através da fórmula $IME = [motilidade + (vigor \times 2)] / 2$. Uma gota era diluída em formol salino (1:100) para posterior contagem, e colocava-se outra em uma lâmina de vidro e era corada com eosina e hematoxilina na proporção 1:1:1, para análise morfológica e morfometria das células. Também se media o pH da amostra utilizando fita reagente, a fim de verificar a contaminação ou não por urina. As amostras contaminadas eram descartadas e as viáveis de um mesmo animal eram misturadas e encaminhadas para criopreservação.

Utilizava-se o equipamento de ultrassom Domed® Sonoscape A5V com transdutor linear multifrequencial para realizar exame de ultrassonografia nos testículos a fim de verificar possíveis alterações em túnicas e parênquima.

Aplicava-se então o reversor anestésico nos *L. guttulus*, *L. geoffroyi* e *L. pardalis*, e os animais eram acondicionados em caixas de transporte para retorno ao recinto. O reversor só era aplicado nas *P. onca* quando já estavam no recinto. Os animais eram acompanhados pelos tratadores até a recuperação total da anestesia.

Para a contagem do número de espermatozóides, colocava-se uma lamínula sobre uma câmara de Neubauer, e com auxílio de uma pipeta, preenchia-se cuidadosamente a área de contagem com a solução diluída em formol salino. Após a sedimentação das células, os espermatozóides eram contados em microscópio óptico Nikon® Eclipse em aumento de 1000X. A quantidade de quadrantes lidos variava entre os animais. O número total de espermatozóides em 1mL era obtido através da fórmula $N^\circ \text{ de células/ml} = n^\circ \text{ de células contadas} / n^\circ \text{ de quadrantes contados} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$. Este valor era então multiplicado pelo volume do ejaculado para obter a quantidade total de espermatozóides coletados por animal, e ainda pela motilidade média para o cálculo do número de espermatozóides viáveis total da amostra.

A análise morfológica era feita a partir de lâminas coradas, em microscópio óptico Nikon® Eclipse, em aumento 1000X, com o auxílio do contador de células espermáticas Santa Lydia®. Eram analisados 200 espermatozóides por animal.

As mesmas lâminas eram utilizadas para a morfometria. Eram tiradas fotos destas no Laboratório Mercolab, localizado em Cascavel, Paraná, em microscópio Olympus®, em aumento 1000X, no *software* Toup View® 3.7. As medições eram realizadas utilizando-se o *software* Motic® 2.0, no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, Campus Umuarama, assim como a contagem e a patologia dos espermatozóides. Eram utilizados para a mensuração somente espermatozóides considerados com morfologia normal.

Os dados obtidos foram tabulados e analisados estatisticamente no *software* Excel®, através da verificação da normalidade dos dados através de histograma de frequência, teste-F de Fisher-Snedecor de comparação de variâncias para decisão do teste de comparação de médias com graus de liberdade horizontal e vertical iguais a 99, e teste-t de Student de comparação de médias para amostras pareadas com $\alpha=0,05$, expressos em gráficos e tabelas, e comparados com a literatura disponível sobre as espécies. Os testes estatísticos escolhidos foram baseados na comparação de variáveis quantitativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a contenção física, os animais foram pesados (Tabela 3) e as doses dos medicamentos usados na contenção química corrigidas para o peso real (Tabela4).

Tabela 3 – Pesos reais dos animais em kg.

Indivíduo		Peso real (kg)
<i>Leopardus guttulus</i>	147	2,9
<i>Leopardus guttulus</i>	664	3,5
<i>Leopardus geoffroyi</i>	343	3,3
<i>Leopardus geoffroyi</i>	451	3,3
<i>Leopardus pardalis</i>	686	9,0
<i>Leopardus pardalis</i>	537	11,6
<i>Panthera onca</i>	202	62,0
<i>Panthera onca</i>	303	86,6

Tabela 4 – Medicamentos e suas respectivas doses reais utilizados na contenção química dos animais.

		Dexmedetomidina ($\mu\text{g/kg}$)	Midazolam (mg/kg)	Metadona (mg/kg)	Dextrocetamina (mg/kg)
<i>Leopardus guttulus</i>	147	12,07	0,36	0,24	-
<i>Leopardus guttulus</i>	664	10	0,3	0,2	-
<i>Leopardus geoffroyi</i>	343	10,61	0,32	0,21	-
<i>Leopardus geoffroyi</i>	451	10,61	0,32	0,21	-
<i>Leopardus pardalis</i>	686	17,78	-	-	-
<i>Leopardus pardalis</i>	537	12,93	0,39	0,26	-
<i>Panthera onca</i>	202	9,68	0,29	-	2,9
<i>Panthera onca</i>	303	8,66	0,26	-	2,6

Somente um animal, o *L. guttulus* 664, teve seu peso estimado exatamente igual ao real, resultando em doses estimadas e reais iguais. O restante dos animais teve as doses corrigidas para maior ou menor, dependendo da diferença nos pesos estimados e reais.

Este protocolo se mostrou eficaz na contenção química dos animais e segurança da equipe, bem como na qualidade do sêmen, não apresentando contaminação por urina. Baudi (2005) utilizou a mesma metodologia para a coleta do sêmen, porém o protocolo anestésico era realizado utilizando-se xilazina e cetamina, e obteve cem por cento das suas amostras contaminadas.

Os parâmetros testiculares dos *L. guttulus*, *L. geoffroyi*, *P. onca* e *L. pardalis* estão apresentados na Tabela 5, 6 e 7, respectivamente.

Tabela 5 – Parâmetros testiculares dos exemplares de *Leopardus guttulus* e *Leopardus geoffroyi*.

Parâmetros testiculares	<i>Leopardus guttulus</i>		<i>Leopardus geoffroyi</i>	
	147	664	343	451
Firmeza testicular (D)	Normal	-	Normal	Normal
Firmeza testicular (E)	Normal	-	Normal	Normal
Comprimento testicular (D) (mm)	19	-	21	19
Comprimento testicular (E) (mm)	17	-	22	18
Largura testicular (D) (mm)	11	-	12	11
Largura testicular (E) (mm)	11	-	13	11
Volume testicular (D) (mL)	1,20	-	1,58	1,20
Volume testicular (E) (mL)	1,08	-	1,95	1,14
Volume testicular total (mL)	2,28	-	3,53	2,35
Espículas penianas	Bem desenvolvidas	Pouco desenvolvidas	Pouco desenvolvidas	Pouco desenvolvidas
Ejaculação	Presente	Presente	Presente	Presente
Ereção	Presente	Presente	Presente	Presente

Tabela 6 – Parâmetros testiculares dos exemplares de *Panthera onca*.

Parâmetros testiculares	<i>Panthera onca</i>	
	202	303
Firmeza testicular (D)	Normal	Normal
Firmeza testicular (E)	Normal	Normal
Comprimento testicular (D) (mm)	46	50
Comprimento testicular (E) (mm)	46	47
Largura testicular (D) (mm)	32	35
Largura testicular (E) (mm)	35	32
Volume testicular (D) (mL)	24,68	32,09
Volume testicular (E) (mL)	29,53	25,22
Volume testicular total (mL)	54,21	57,31
Espículas penianas	Arredondadas e pouco desenvolvidas	Arredondadas e pouco desenvolvidas
Ejaculação	Presente	Presente
Ereção	Presente	Presente

Tabela 7 – Parâmetros testiculares dos exemplares de *Leopardus pardalis*.

Parâmetros testiculares	<i>Leopardus pardalis</i>	
	686	537
Firmeza testicular (D)	Normal	Normal
Firmeza testicular (E)	Normal	Normal
Comprimento testicular (D) (mm)	37	39
Comprimento testicular (E) (mm)	39	36
Largura testicular (D) (mm)	21	25
Largura testicular (E) (mm)	20	24
Volume testicular (D) (mL)	8,55	12,77
Volume testicular (E) (mL)	8,17	10,87
Volume testicular total (mL)	16,72	23,64
Espículas penianas	Bem desenvolvidas	Bem desenvolvidas
Ejaculação	Presente	Presente
Ereção	Presente	Presente

A firmeza testicular de todos os indivíduos estava normal bilateralmente.

O comprimento testicular variou de 17 a 22mm em *L. guttulus* e *L. geoffroyi*, 46 a 50mm em *P. onca* e 36 a 39mm em *L. pardalis*. A largura testicular esteve entre 11 e 13mm em *L. guttulus* e *L. geoffroyi*, 32 e 35mm em *P. onca* e 20 e 25mm em *L. pardalis*.

O volume testicular individual variou entre 1,08 e 1,95mL para *L. guttulus* e *L. geoffroyi*, 24,68 e 32,09mL para *P. onca* e 8,17 e 12,77mL para *L. pardalis*. O volume testicular total de *L. guttulus* e *L. geoffroyi* foi de $2,72 \pm 0,70$ mL, dentro das médias encontradas para as espécies na literatura que variou entre 2,30 (ERDMANN et al., 2005), 2,80 (SWANSON et al., 2003) e 2,90mL

(TEBET, 2004). Para *P. onca*, os valores encontrados que se aproximam de $55,76 \pm 2,19$ mL encontrados neste estudo foram de 44,40 por Morato et al. (2004), 46,20 por Swanson et al. (2003) e 51,40 mL por Paz et al. (2006). Em *L. pardalis*, o volume testicular foi de $20,18 \pm 4,89$ mL, sendo encontrados valores semelhantes na literatura por Ávila (2009), Queiroz (2003) e Swanson et al. (2003), 17,84, 19,30 e 22,00 mL, respectivamente.

Somente um *Leopardus guttulus* apresentou espículas penianas bem desenvolvidas (Figura 3). Os demais *L. guttulus* e *L. geoffroyi* tinham as mesmas pouco desenvolvidas, sendo que as dos *L. geoffroyi* eram menores que as dos *L. guttulus*. Em contrapartida, Swanson et al. (2003) relatam espículas proeminentes para ambas as espécies em seu estudo. As espículas penianas de *P. onca* eram arredondadas e pouco desenvolvidas. Os mesmos autores encontraram espículas pequenas e em pouca quantidade para *P. onca* e para *L. pardalis* espículas penianas bem desenvolvidas, assim como encontrado nesta pesquisa.

Figura 3 – Espículas penianas de *Leopardus guttulus*.



Todos os animais apresentaram ereção e ejacularam com este protocolo anestésico e de eletroejaculação. A *P. onca* 202 teve uma ejaculação anterior ao início do protocolo, somente com a introdução do transdutor retal, e a mesma foi incluída na amostra total do animal.

O exame de ultrassonografia testicular apresentou ecogenicidade normal do parênquima e do epidídimo em todos os animais.

As tabelas 8, 9 e 10 mostram os parâmetros seminais de *L. guttulus* e *L. geoffroyi*, de *P. onca* e de *L. pardalis*, respectivamente.

Tabela 8 – Parâmetros seminais dos exemplares de *Leopardus guttulus* e *Leopardus geoffroyi*.

Parâmetros do sêmen	<i>Leopardus guttulus</i>		<i>Leopardus geoffroyi</i>	
	147	664	343	451
Volume total ejaculado (mL)	0,34	0,30	0,047	0,078
Motilidade (%)	82,0±8,4	0*	71,0±21,3	53,3±23,1
Vigor	3,6±0,5	0*	3,2±1,3	3,3±1,2
Índice de motilidade espermática	44,6±4,6	0*	38,7±11,9	30,0±12,2
Coloração	Esbranquiçada	Translúcida	Esbranquiçada	Esbranquiçada
pH	6	7,5	**	**

*animal azoospermico; **não foi medido o pH da amostra.

Tabela 9 – Parâmetros seminais dos exemplares de *Panthera onca*.

Parâmetros do sêmen	<i>Panthera onca</i>	
	202	303
Volume total ejaculado (mL)	0,35	3,16
Motilidade (%)	40,0±14,1	67,1±12,5
Vigor	2,8±0,5	3,1±0,4
Índice de motilidade espermática	22,8±7,3	36,7±6,6
Coloração	Esbranquiçada	Translúcida
pH	*	7,5

*não foi medido o pH da amostra.

Tabela 10 – Parâmetros seminais dos exemplares de *Leopardus pardalis*.

Parâmetros do sêmen	<i>Leopardus pardalis</i>	
	686	537
Volume total ejaculado (mL)	2,09	1,71
Motilidade (%)	33,3±15,3	80*
Vigor	2,3±1,2	4*
Índice de motilidade espermática	19,0±8,5	44*
Coloração	Translúcida	Translúcida
pH	7	7

*somente um ejaculado apresentou espermatozoides.

Os indivíduos da espécie *L. guttulus* tiveram um volume total ejaculado próximos dos encontrados por Baudi (2005) e Moraes et al. (2002) de 0,35 e 0,30mL, todos acima dos valores encontrados para outros estudos que obtiveram volumes entre 0,11 e 0,16mL (SWANSON et al., 2003; TEBET, 2004; ERDMANN et al., 2005). Os dois exemplares de *L. geoffroyi* ejacularam um volume total pequeno, bem abaixo da média encontrada por Swanson et al. (2003) para a espécie (0,21mL). O volume total ejaculado pelas *P. onca* deste estudo foi somente próximo do valor encontrado por Araújo et al. (2017). Outros estudos mostraram valores bem maiores desse

parâmetro, variando entre 5,3 e 8,6mL para a espécie (MORATO et al., 1998; MORATO et al., 1999; MORATO et al., 2001; PAZ et al., 2003; SWANSON et al., 2003; MORATO et al., 2004; PAZ et al., 2006; PAZ et al., 2007), que pode ser explicado pela idade avançada dos animais em questão nesta pesquisa, em média 10 anos. A média de longevidade da espécie é de 11,5 anos (IUCN, 2017). Os *L. pardalis* deste estudo apresentaram valores maiores de volume total ejaculado que os estudos encontrados na literatura, que variou em torno de 0,64 (QUEIROZ, 2003; SWANSON et al., 2003; TEBET, 2004) e 1,4mL (MORAIS et al., 2002).

A motilidade média encontrada para a espécie *Leopardus guttulus* no presente estudo foi maior que os valores encontrados por Erdmann et al. (2005) de 73,44 e Moraes et al. (2002) de 71,40, e próximos aos encontrados por Tebet (2004) de 76,27 e Bondi (2005) de 78,9%. Os indivíduos da espécie *L. geoffroyi* apresentaram um desvio padrão alto, fazendo com que seus valores estivessem próximos ao relatado por Leite (2009) de 80%. Os valores para motilidade encontrados neste estudo para *P. onca* está dentro dos valores mostrados pela literatura, que variaram entre 50,6 e 70% (MORATO et al., 1998; MORATO et al., 1999; MORATO et al., 2001; PAZ et al., 2003; MORATO et al., 2004; PAZ et al., 2006; PAZ et al., 2007; ARAÚJO et al., 2017). Os valores encontrados por Moraes et al. (2002) de 81,4 e por Tebet (2004) de 85,6% para *L. pardalis* estão acima dos relatados neste estudo.

O vigor espermático deste estudo para *L. guttulus* e *L. geoffroyi* teve variação compatível com os valores encontrados por Moraes et al. (2002), Tebet (2004), Baudi (2005), Erdmann et al. (2005) e Leite (2009), que variou entre 3 e 5. Da mesma forma, as *P. onca* tiveram valores deste parâmetro próximos aos encontrados na literatura, entre 2,2 e 4,5 (MORATO et al., 1998; MORATO et al., 1999; MORATO et al., 2001; PAZ et al., 2003; MORATO et al., 2004; PAZ et al., 2006; PAZ et al., 2007; ARAÚJO et al., 2017). Os valores de vigor espermático de *L. pardalis* no estudo de Moraes et al. (2002) foi 3,7 e no de Tebet (2004) foi 4,6, semelhantes aos deste estudo.

O índice de motilidade espermática (IME) é um parâmetro mais fidedigno da qualidade seminal que os demais, pois leva em consideração dois parâmetros importantes: motilidade e vigor espermáticos. Os valores de IME deste estudo para todos os animais foi abaixo de todos os valores encontrados na literatura, onde o mínimo foi de 56,5% para *P. onca* (MORATO et al., 2004) e o máximo de 89,1% para *L. pardalis* (TEBET, 2004). Faz-se necessário um aprofundamento no estudo de outras variáveis como alimentação, manejo e ambientação destes animais para possível justificativa dos valores encontrados neste parâmetro.

A coloração esbranquiçada do sêmen sugere uma melhor qualidade que a translúcida, pois indica uma maior concentração de células espermáticas na amostra, porém a qualidade real só pode ser determinada a partir da visualização, quantificação e determinação de parâmetros como o IME.

Colorações diferentes destas não são desejadas, pois podem indicar a presença de sangue ou contaminação por urina no sêmen.

Apesar de ser encontrado pH igual a 6 em um exemplar de *L. guttulus*, esta amostra não foi considerada contaminada por urina devido à coloração e à viabilidade dos espermatozóides. Os valores deste parâmetro para esta espécie encontrados em outros estudos estão entre 7,58 e 7,83 (MORAIS et al., 2002; TEBET, 2004; ERDMANN et al., 2005; LEITE, 2009). O pH seminal de *P. onca* variou entre 7 e 8,3 em estudos realizados por Paz et al. (2003, 2006, 2007) e Morato et al. (1998, 1999), portanto, o valor encontrado neste estudo é normal. Em *L. pardalis* o pH neutro encontrado neste estudo está próximo dos valores encontrados por Moraes et al. (2002) de 7,5 e Tebet (2004) de 7,2.

As quantidades de espermatozóides por mL de sêmen de *L. guttulus* e *L. geoffroyi* estão na Tabela 11, e de *P. onca* na Tabela 12. Não foram realizadas contagens dos espermatozóides das amostras de *L. pardalis*.

Tabela 11 – Quantidade de espermatozóides por mL de sêmen dos exemplares de *Leopardus guttulus* e *Leopardus geoffroyi*.

Indivíduo		Nº de espermatozóides x 10 ⁶		
		por mL	total da amostra	viáveis na amostra
<i>Leopardus guttulus</i>	147	1,73	0,59	0,48
<i>Leopardus guttulus</i>	664	*	*	*
<i>Leopardus geoffroyi</i>	343	10,40	0,49	0,35
<i>Leopardus geoffroyi</i>	451	3,20	0,25	0,13

*animal azoospermico.

Tabela 12 – Quantidade de espermatozóides por mL de sêmen dos exemplares de *Panthera onca*.

Indivíduo		Nº de espermatozóides x 10 ⁶		
		por mL	total da amostra	viáveis na amostra
<i>Panthera onca</i>	202	13,12	4,53	1,81
	303	3,62	11,43	7,66

Para *L. guttulus* e *L. geoffroyi*, todos os valores de quantidade de espermatozóides foi muito abaixo dos encontrados na literatura para as espécies. O número de espermatozóides viáveis é o parâmetro mais importante, visto que mostra a quantidade destes que podem verdadeira e potencialmente vir a fertilizar um óvulo. Moraes et al. (2002) e Erdmann et al. (2005) encontraram os valores respectivos de 40,85 e 74,2x10⁶ espermatozóides viáveis por amostra para esta espécie.

Apesar do parâmetro concentração espermática (número de espermatozóides/mL de amostra) não indicar qualidade seminal, os valores encontrados para *P. onca* neste estudo encontram-se

dentro da variação mostrada pela literatura, entre 1,6 (PAZ et al., 2007) e $13,8 \times 10^6/\text{mL}$ (PAZ et al., 2006). Porém, apenas um estudo relata a quantidade de espermatozoides viáveis de *P. onca*, sendo esta $56,5 \times 10^6$ (MORATO et al., 2004). O presente trabalho encontrou valores consideravelmente menores para este parâmetro na mesma espécie.

As tabelas 13 e 14 detalham a morfologia espermática e suas respectivas porcentagens encontradas em *L. guttulus* e *L. geoffroyi* e em *P. onca*, nesta ordem.

Tabela 13 – Morfologia espermática em porcentagem encontrada nos exemplares de *Leopardus guttulus* e *Leopardus geoffroyi*.

Morfologia espermática	<i>Leopardus guttulus</i>	<i>Leopardus geoffroyi</i>
	147	343
Cabeça isolada	1	2
Cauda dobrada	13	0
Cauda enrolada	0	7,5
Contorno anormal	0	0,5
Defeito em acrossoma	0	0,5
Defeito em peça intermediária	6	5
Normal	80	84,5
Total	100	100

Tabela 14 – Morfologia espermática em porcentagem encontrada nos exemplares de *Panthera onca*.

Morfologia espermática	<i>Panthera onca</i>	
	202	303
Cabeça gigante	0	1
Cabeça isolada	2	6
Cabeça isolada patológica	0	0
Cabeça piriforme	13,5	0
Cauda dobrada	0,5	0
Cauda enrolada	1	0
Cauda fortemente dobrada	2	0
Contorno anormal de cabeça	9	0
Defeito em acrossoma	0,5	0
Defeito em peça intermediária	0	4
Implantação retro-axial de colo	0	3
Normal	71,5	86
Total	100	100

A porcentagem de espermatozoides com morfologia normal neste trabalho, tanto para *L. guttulus* e *L. geoffroyi*, quanto para *P. onca*, foi superior aos encontrados em outros estudos, com o máximo encontrado por Baudi (2005) de 76,8%. Os exemplares de *L. guttulus* e *L. geoffroyi*

apresentaram maior quantidade de defeitos espermáticos em cauda (Figuras 4 e 5), assim como mostrado por Queiroz (2003), Swanson (2003), Tebet (2004), Erdmann et al. (2005) e Leite (2009).

Figura 4 – Espermatozóide apresentando cauda enrolada.

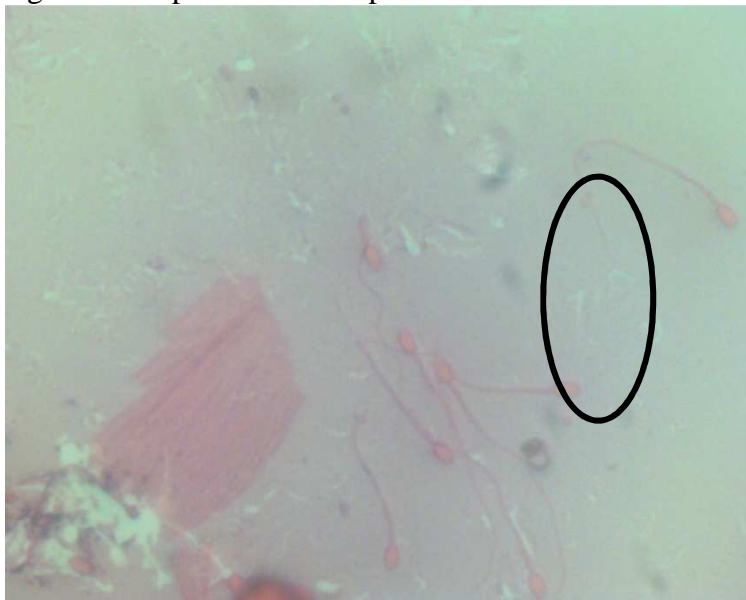


Figura 5 – Espermatozóide apresentando cauda dobrada.



A porcentagem maior de defeitos em espermatozóides em *P. onca* deste trabalho encontrou-se na cabeça dos mesmos (Figuras 6 e 7), condizente com os trabalhos de Morato et al. (1998, 1999, 2001).

Figura 6 – Espermatozóide apresentando cabeça piriforme.



Figura 7 – Cabeça isolada de espermatozóide.



As medidas espermáticas de *L. guttulus* e *L. geoffroyi* encontram-se na Tabela 15 e de *P. onca* na Tabela 16.

Tabela 15 – Valores médios \pm desvio padrão das medidas espermáticas dos exemplares de *Leopardus guttulus* e *Leopardus geoffroyi*.

Parâmetros espermáticos	<i>Leopardus guttulus</i>	<i>Leopardus geoffroyi</i>
	147	343
Largura da cabeça (μm)	$7,23 \pm 0,91^a$	$7,07 \pm 0,67^a$
Comprimento da cabeça (μm)	$12,98 \pm 0,96^a$	$13,28 \pm 0,95^b$
Perímetro da cabeça (μm)	$34,81 \pm 2,07^a$	$35,22 \pm 1,86^a$
Área da cabeça (μm^2)	$79,11 \pm 10,42^a$	$79,86 \pm 8,42^a$
Comprimento da peça intermediária (μm)	$41,40 \pm 15,00^a$	$27,69 \pm 3,46^b$
Comprimento da cauda (μm)	$131,02 \pm 17,95^a$	$130,81 \pm 19,01^a$

Tabela 16 – Valores médios \pm desvio padrão das medidas espermáticas dos exemplares de *Panthera onca*.

Parâmetros espermáticos	<i>Panthera onca</i>	
	202	303
Largura da cabeça (μm)	$8,63 \pm 0,85^a$	$8,60 \pm 0,73^a$
Comprimento da cabeça (μm)	$13,35 \pm 0,97^a$	$13,56 \pm 1,07^a$
Perímetro da cabeça (μm)	$37,23 \pm 2,31^a$	$38,16 \pm 2,28^b$
Área da cabeça (μm^2)	$95,92 \pm 12,49^a$	$106,67 \pm 86,45^a$
Comprimento da peça intermediária (μm)	$36,17 \pm 5,33^a$	$35,81 \pm 6,35^a$
Comprimento da cauda (μm)	$121,79 \pm 14,16^a$	$122,56 \pm 16,05^a$

Dentre os indivíduos de *L. guttulus* e *L. geoffroyi*, as medidas dos parâmetros espermáticos comprimento da cabeça e comprimento da peça intermediária são estatisticamente diferentes, enquanto que os demais podem ser considerados iguais. Nas *P. onca*, somente o perímetro da cabeça difere estatisticamente entre os dois exemplares. Todos os demais parâmetros para esta espécie são iguais.

Não foram encontrados estudos na literatura que detalhassem as medidas espermáticas de nenhuma espécie relatada neste trabalho. Contudo, estes valores não devem ser considerados padrões para as espécies, visto que o número amostral deste estudo é muito pequeno (um exemplar de *L. guttulus*, um exemplar de *L. geoffroyi* e dois exemplares de *P. onca*).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os protocolos anestésicos e de eletroejaculação utilizados neste trabalho mostraram-se eficazes para a coleta de sêmen viável e não contaminado para felídeos selvagens. É possível realizar morfometria espermática com os métodos adotados para confecção e leitura das lâminas,

porém são necessários mais estudos sobre o assunto para estes animais, o que contribuirá para a padronização destas medidas nestas espécies.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, G. R.; PAULA, T. A. R.; DECO-SOUZA, T.; FERREIRA, L. B. C.; SILVA, L. C.; JORGE NETO, P. N. Coleta farmacológica de sêmen de onças-pardas (*Puma concolor*). In: **Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal**, 2017, Uberlândia. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2017.

ÁVILA, E. C. **Avaliação andrológica e criopreservação do sêmen de jaguatirica (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa.

ÁVILA, E. C.; PAULA, T. A. R.; DECO-SOUZA, T.; TRINDADE, T. F. S. L.; MASCARENHAS, R. M.; ARAÚJO, G. R.; POLLI, G. O.; CSERMAK JR, A. C. Protocolos de coleta de sêmen por eletroejaculação em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v. 36, n. 4, p. 260-263, 2012.

BAGGIO JR, R.; CAVALCANTI, P. V. Análise de organelas espermáticas de gato doméstico (*Felix catus*) como modelo biológico para conservação de gametas de felídeos em extinção. **Revista Educação**, v. 9, n. 2, p. 55, 2014.

BARROS, J. B. G.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; FONSECA, C. C.; MELO, F. R.; BENJAMIM, L. A. Morfometria testicular e dos túbulos seminíferos de leões-africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos, em cativeiro. **Revista Ceres**, v. 53, p. 523-530, 2006.

BAUDI, D. L. K. **Efeito de dois métodos de resfriamento sobre a função espermática *in vitro* de sêmen criopreservado de felinos (*Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis* e *Felis catus*), avaliada através de ensaio competitivo de ligação em ovócitos de gata doméstica (*Felis catus*)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

DECO-SOUZA, T.; PAULA, T. A. R.; COSTA, D. S.; ARAÚJO, G. R.; GARAY, R. M.; VASCONCELOS, G. S. C.; CSERMAK JR, A. C.; SILVA, L. C.; BARROS, J. B. G. Coleta e avaliação de sêmen de pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos mantidos em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 4, p. 252-259, 2010.

ERDMANN, R. H. **Exame reprodutivo, contenção farmacológica e criopreservação de sêmen em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

ERDMANN, R. H.; JUVENAL, J. C.; MORAES, W.; CUBAS, P.; CARVALHO, A. L.; MOREIRA, N. Exame reprodutivo em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775). **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 75-79, 2005.

ERDMANN, R. H.; MOREIRA, N.; CUBAS, Z. S.; MORAIS, W.; OLIVEIRA, M. J.; ZIMMERMANN, M. L.; RIBEIRO, R. N.; BLANK, M. H.; PARCHEN, H. D. Contenção farmacológica da jaguatirica, *Leopardus pardalis*, para coleta de sêmen, pela associação de tiletamina-zolazepam e xilazina. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 1731-1737, 2013.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 143-150, 1999.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores, In: FOWLER, M. E. (Org.). **Estados Unidos: Zoo and Wild Animal Medicine**. 3 ed. Philadelphia: 1993. p. 390-399.

LEITE, D. K. V. H. **Avaliações das características histológicas, citológicas, clínicas e seminais de felinos domésticos (*Felis catus*, Linnaeus, 1758) e selvagens (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775, *Leopardus geoffroyi*, d'Orbign & Gervais, 1843 e *Puma yagouaroundi*, E. Geoffroyi, 1803) *Felidae Carnivora***. 2009. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal Fluminense. Niterói.

MARTINS, M. I. M.; JUSTINO, R. C. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 136-140, 2015.

MICHELETTI, T.; CUBAS, Z. S.; MORAES, W.; OLIVEIRA, M. J.; KOZICKI, L. E.; WEISS, R. R.; MOREIRA, N. Reprodução assistida em felídeos selvagens – uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 408-417, 2011.

MORAES, M. F. D.; SILVE, M. X.; ALBUQUERQUE, A. C. A.; SILVA, A. C.; TEBALDI, J. H.; LUX-HOPPE, E. G. Helminths de pequenos felinos selvagens no Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 57, 2015.

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. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, p. 2027-2041, 2002.

MORATO, R. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; NUNES, A. L. V.; CARCIOFI, A. C.; FERREIRA, F.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C. Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 178-181, 1998.

MORATO, R. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FERREIRA, F.; VERRESCHI, I. T. N.; BARNABE, R. C. Reproductive characteristics of captive male jaguars (*Panthera onca*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 262-266, 1999.

MORATO, R. G.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C.; JACOMO, A. T. A.; SILVEIRA, L.; SANA, D.; NUNES, A. L. V.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; BARNABE, R. C. Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). **Reproduction**, v. 122, p. 745-751, 2001.

MORATO, R. G.; VERRESCHI, I. T. N.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; CASSARO, K.; PESSUTI, C.; BARNABE, R. C. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 61, p. 1273-1281, 2004.

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

PAZ, R. C. R.; LEME, D. P.; ZÜGE, R. M.; PESSUTI, C.; SANTOS, E. F.; BARNABE, R. C. Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), em testículo de onça pintada (*Panthera onca*), utilizada como ferramenta no diagnóstico de infertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 100-107, 2003.

PAZ, R. C. R.; GONÇALVES, R. M.; CARCIOFI, A. C.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; PESSUTI, C.; SANTOS, E. F.; FERREIRA, F.; BARNABE, R. C. Influence of nutrition on the quality of semen in Jaguars (*Panthera onca*) in Brazilian zoos. **International Zoo Yearbook**, v. 40, p. 351-359, 2006.

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

POPE, C. E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology** 53: 163-174, 2000.

QUEIROZ, V. S. **Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides**. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo.

SILVA, T. F. P.; DIAS, C. G. A.; ACKERMANN, C. L.; PINHEIRO, F. T. S.; BRAGA, A. C. P.; SILVA, L. D. M. Avaliação de segurança e analgesia de protocolos anestésicos para eletroejaculação em gatos domésticos (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, n. 3, p. 497-505, 2011.

SILVA, T. F. P.; ACKERMANN, C. L.; SILVA, L. D. M. Desafios para o desenvolvimento da tecnologia da criopreservação de sêmen felino. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 143-160, 2012.

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.; WILDT, D. E. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for *ex situ* conservation. **Zoo Biology**, n. 22, p. 421-441, 2003.

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

TRIGO, T. C.; SCHNEIDER, A.; OLIVEIRA, T. G.; LEHUGEUR, L. M.; SILVEIRA, L.; FREITAS, T. R. O.; EIZIRIK, E. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of neotropical wild cat. **Current Biology**, v. 23, n. 4, p. 2528-2533, 2013.