



Técnicas reprodutivas para a conservação de felídeos silvestres

Reproductive techniques for the conservation of wild felids

Nei Moreira¹

Departamento de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Palotina, PR, Brasil.

¹Correspondência: neimoreira@ufpr.br

Resumo

Os felídeos, principalmente os grandes, muitas vezes são vistos como ícones ou, na terminologia acadêmica, como espécie bandeira simbolizando o ecossistema. Para que as técnicas de reprodução assistida (TRAs) possam desempenhar um papel significativo na conservação de felídeos, é essencial que as técnicas mais fundamentais de IA, FIV e TE, além da criopreservação de espermatozoides e embriões, primeiro sejam completamente desenvolvidas via estudos sistemáticos. Para a coleta de sêmen em felídeos, geralmente tem sido usada a eletroejaculação ou a coleta farmacológica, com fármaco que induz a ejaculação. Uma abordagem para superar a baixa qualidade do sêmen após a criopreservação, tem sido utilizar a inseminação laparoscópica, que possibilita depositar o sêmen no ápice do corno uterino ou mesmo no oviduto, para alcançar uma fertilidade mais satisfatória. Considerando que os felídeos geralmente têm uma expectativa de vida curta, baixa produção de filhotes (1-4 filhotes/ninhada) e início precoce da senescência reprodutiva (~7-10 anos de idade), a atual manutenção de populações geneticamente viáveis em cativeiro é muito difícil. As TRAs oferecem uma ferramenta potencial para enfrentar esses desafios de manejo e auxiliar na conservação de felídeos silvestres.

Palavras-chave: reprodução, manejo reprodutivo, felinos, inseminação artificial, banco de reserva genômica.

Abstract

Felids, especially the large species, are often seen as icons or, in academic terminology, as flag species symbolizing the ecosystem. For assisted reproductive techniques (ARTs) to play a significant role in the conservation of felids, it is essential that the most fundamental techniques of AI, IVF and ET, in addition to cryopreservation of sperm and embryos, be first fully developed through systematic studies. For the semen collection in felids, electroejaculation or pharmacological collection has usually been used, with a drug that induces ejaculation. One approach to overcome the poor quality of semen after cryopreservation has been to use laparoscopic insemination, which makes it possible to deposit the semen at the apex of the uterine horn or even in the oviduct, to achieve a more satisfactory fertility. Considering that felids generally have a short life expectancy, low pups production (1-4 pups/litter) and early onset of reproductive senescence (~ 7-10 years of age), the current maintenance of genetically viable populations in captivity is very difficult. ARTs offer a potential tool to address these management challenges and assist in the conservation of wild felids.

Keywords: reproduction, reproductive management, feline, artificial insemination, genomic resource bank.

Introdução

Os felídeos, principalmente os grandes, muitas vezes são vistos como ícones ou, na terminologia acadêmica, como espécie bandeira simbolizando o ecossistema. Isso, no entanto, tem pouca relevância para os caçadores de troféus, e para as famílias locais que dependem da pecuária e da agricultura para subsistência, quando há casos de predação de animais domésticos.

Um desafio básico é como aplicar a informação científica para alcançar objetivos conservacionistas, atender às demandas conflitantes de proteger o meio ambiente e suas espécies, ao mesmo tempo promovendo o bem-estar das comunidades. Isso é especialmente verdadeiro quando se enfrenta uma questão econômica.

Entendendo a importância do papel dos felídeos dentro de seu ecossistema e se nós aceitarmos a responsabilidade moral de salva-los, temos que usar todo nosso conhecimento, empatia, paixão, persistência e colaboração para estimular governos e comunidades para resolver as questões ecológicas. Isso inclui valores espirituais para ajudar-nos a proteger um ambiente saudável e harmonioso (Schaller, 2016).

Basicamente como técnicas reprodutivas para a conservação de felídeos silvestres temos o manejo reprodutivo, envolvendo monta natural e algumas orientações para o acasalamento e produção de filhotes; e técnicas de reprodução assistida (TRAs), como a inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV), transferência de embriões (TE), e a criopreservação de espermatozoides e embriões. Apesar de muito conhecimento ter sido gerado, as técnicas de reprodução assistida ainda não são usadas de forma rotineira e ainda não têm uma importância significativa sob o ponto de vista conservacionista.



Para que as TRAs possam desempenhar um papel significativo na conservação de felídeos, é essencial que as técnicas mais fundamentais de IA, FIV e TE, além da criopreservação de espermatozoides e embriões, primeiro sejam completamente desenvolvidas via estudos sistemáticos, principalmente em gatos domésticos como modelos de pesquisa. Segundo, essas técnicas devem ser provadas para que tenham eficiência adequada para o uso aplicado, uma vez que sua utilidade conservacionista será diretamente proporcional à eficácia do procedimento. Por último, as TRAs devem ser aplicadas dentro de programas estabelecidos de manejo populacional para que tenham um real impacto na conservação. O valor imediato das TRAs consiste em auxiliar Planos de Manejo na manutenção de populações viáveis de felídeos em cativeiro. Sua aplicação mais ampla exigirá o estabelecimento de uma rede global de cientistas e veterinários treinados e dispostos a conduzir esses procedimentos como um serviço para a conservação de felídeos (Swanson, 2006).

A missão geral dos Planos de Sobrevivência de Espécies (*Species Survival Plans - SSPs*) é manter populações cativas geneticamente viáveis, retendo $\geq 90\%$ da diversidade genética existente ao longo de um período de 50 a 100 anos, enquanto se esforça também para proteger cada uma das espécies em vida livre. Para alcançar esses objetivos, curadores, tratadores, veterinários, biólogos, zootecnistas e pesquisadores em zoológicos e criadouros devem trabalhar de forma colaborativa para manejar as populações dos Planos de Manejo e conduzir pesquisa que identifique e aborde fatores críticos que afetam a sobrevivência *ex situ* ou *in situ* das espécies.

A maioria das populações de felídeos em cativeiro tem poucos animais que reproduzem, o que resulta em baixa variabilidade genética e uma tendência para a endogamia (*inbreeding*), com consequências negativas tanto reprodutivas como patológicas (Ralls et al., 1979; Wildt et al., 1987).

Monitoramento não invasivo

As análises de esteroides fecais em felídeos são úteis para:

Em fêmeas: 1) caracterizar a atividade ovariana durante um determinado período, possibilitando a investigação de sazonalidade, ciclicidade da fêmea, puberdade, senescência ou senilidade reprodutiva; 2) determinar a prevalência do tipo de ovulação (induzida ou espontânea); e 3) comparar o perfil endócrino das técnicas de reprodução assistida com a reprodução natural, verificando quais as alterações necessárias para o maior sucesso reprodutivo. Como o período da pseudogestação dura de 1/3 a 2/3 do período normal de gestação para a espécie, também é possível distinguir entre esses dois estados reprodutivos durante o terço final de uma possível gestação (adaptado de Brown et al., 1993).

Em machos: 1) correlacionar a dosagem sérica ou fecal de testosterona com a qualidade do sêmen, incluindo a possível investigação de sazonalidade; 2) realizar estudos de puberdade, senescência ou senilidade reprodutiva; e 3) investigações diagnósticas nos casos de sub ou infertilidade.

Coleta de sêmen

Geralmente realizada por eletroejaculação transretal, vários tipos de transdutores (*probes*) têm sido descritos. O protocolo de eletroejaculação mais usual para felídeos tem sido o descrito pela Dra. JoGayle Howard (1993), que permite comparações da qualidade de sêmen entre indivíduos da mesma espécie e entre espécies distintas. Este protocolo consiste em um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 5 V aplicados em três séries (sendo 30 de 2 a 4 V, 30 de 3 a 5 V; e 20 estímulos de 4 e 5 V). Em estudo realizado por Tajima et al. (2016), comparando vários modelos de transdutores, a estimulação elétrica aplicada apenas no lado ventral foi suficiente para induzir ejaculação. Um transdutor com apenas um eletrodo paralelo e aço inoxidável na parte de trás foi escolhido como o mais apropriado para coleta de sêmen em gato-leopardo-de-Amur (*Prionailurus bengalensis euptilurus*).

O protocolo anestésico também pode influenciar a coleta de sêmen e sua qualidade quando empregada a eletroejaculação. Por exemplo, quando um fármaco α -adrenérgico, como a medetomidina, é usado para induzir a anestesia em felídeos, ocorre ejaculação espontânea após o início da anestesia geral (Zambelli et al., 2008).

Em 2016, Araujo descreveu a coleta farmacológica de sêmen em onça-parda e onça-pintada usando o protocolo anestésico com a associação, via intramuscular, de medetomidina (0,08-0,1 mg/kg) e cetamina (5 mg/Kg). Passados entre 20 e 40 minutos da indução anestésica, a uretra dos animais foi sondada com uma sonda uretral estéril para gatos, por onde foi possível coletar ejaculado em todos os animais. Por meio desta técnica coletou-se em média 106,7 μL de sêmen nas onças-pardas contendo 524,1 $\times 10^6$ espermatozoides/mL e 347,2 μL nas onças pintadas contendo 2635,2 $\times 10^6$ espermatozoides/mL.

Criopreservação de sêmen

As técnicas de reprodução assistida (TRAs), tais como IA e FIV, dependem fortemente da criopreservação de sêmen bem-sucedida. Essas técnicas foram aplicadas usando sêmen congelado para produzir filhotes em felídeos domésticos e selvagens (Howard e Wildt, 2009). Entretanto, o sucesso dessas técnicas em



felídeos ainda é relativamente baixo (Swanson, 2006). Uma alta porcentagem de espermatozoides perde motilidade e outras funções após o descongelamento devido ao dano durante o processo de congelamento, e a taxa de recuperação de motilidade após o descongelamento é <50% na maioria dos mamíferos (Watson, 2000). Assim, preservar a qualidade do sêmen após criopreservação pode ter efeitos dramáticos no sucesso da reprodução assistida.

Geralmente o sêmen criopreservado de mamíferos tem sua fertilidade prejudicada quando comparado com o sêmen fresco. A redução origina-se de ambos os fatores: uma menor viabilidade após o descongelamento e uma disfunção subletal em uma proporção da subpopulação sobrevivente. As razões para a perda de fertilidade são várias (Watson, 2000). Existem fatores que afetam a proporção de espermatozoides sobreviventes (ex. suscetibilidade ao choque pelo frio, taxa de resfriamento, composição do diluente e estresse osmótico) e fatores que influenciam o estado funcional dos sobreviventes (ex. estabilidade da membrana, dano oxidativo, integridade do receptor de membrana, estrutura nuclear).

Uma abordagem para superar esse problema em felídeos tem sido utilizar a inseminação laparoscópica, que possibilita depositar o sêmen no ápice do corno uterino ou mesmo no oviduto, para alcançar uma fertilidade mais satisfatória, porém com necessidade de equipamento caro e pessoal treinado. Nosso grupo de pesquisa relatou o sucesso da inseminação artificial por laparoscopia em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*) (Moraes et al., 1997).

Esse fenômeno pode ser explicado pela necessidade de ter um número suficiente de espermatozoides completamente competentes capazes de fertilizar durante o período em que a ovulação provavelmente ocorrerá. O istmo da tuba uterina age como um reservatório de espermatozoides funcionais. Apenas uma proporção mínima de espermatozoides introduzidos pela cópula alcança o trato genital feminino e entra no reservatório ovidutal, a maioria é expelida através da vulva ou fagocitada no trato genital.

Quando o sêmen é depositado mais cranialmente no trato genital feminino (i.e. mais próximo do ovário), um número menor de espermatozoides é requerido para alcançar a mesma probabilidade de fertilidade, uma vez que uma maior proporção irá sobreviver. Dessa forma, assim como em ovelhas e também em felídeos, a inseminação intrauterina é muito mais efetiva do que a inseminação vaginal ou cervical. Conforti et al (2013) relataram que a inseminação na tuba uterina melhora o sucesso de prenhez na gata doméstica. Os espermatozoides que sofreram criopreservação não sobrevivem tanto no trato genital quando comparados com sêmen fresco. Em resumo, o processo de criopreservação resulta em fertilidade reduzida comparada com o sêmen fresco. Os protocolos de criopreservação devem, portanto, não só otimizar o número de sobreviventes preservando a motilidade, mas também a competência de fertilização desses espermatozoides.

Os protocolos de criopreservação apresentam vários fatores de estresse para os espermatozoides: primeiro, a alteração de temperatura; segundo, o choque osmótico e tóxico pela exposição aos crioprotetores; e terceiro, a formação e dissolução do gelo no ambiente extracelular.

A criopreservação estende a disponibilidade do sêmen para fertilização, entretanto, o potencial fertilizante do sêmen congelado é comprometido devido a alterações na estrutura e fisiologia da célula espermática. Essas alterações estão presentes na população móvel e decrescem o tempo de vida dos espermatozoides, a habilidade para interagir com o trato genital feminino e a capacidade de fertilização. A etiologia de tais alterações pode ser uma combinação de fatores, tais como a fragilidade herdada da célula espermática para suportar o processo de criopreservação e a diluição do sêmen (Medeiros et al., 2002).

Alguns danos causados pela criopreservação de gametas podem ser evitados ou pelo menos minimizados pela diluição da amostra em meio adequado para criopreservação. O crioprotetor usado rotineiramente (glicerol) para felídeos silvestres promove proteção às células das consequências da cristalização ao aumentar a fração de água não congelada no meio extracelular (Deco-Souza et al., 2013). Comparadas duas concentrações de glicerol 5,0 e 7,5% para criopreservação de sêmen de onça-parda (também conhecida como suçuarana ou leão-baio), ambas foram eficientes (Deco-Souza et al., 2013).

Aplicação das técnicas de reprodução assistida (TRAs) em felídeos silvestres

Estudos de fisiologia reprodutiva básica, usando hormônios fecais e análise de sêmen, têm sido realizados em diversas espécies de felídeos, como jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá, fornecendo dados essenciais para o manejo reprodutivo e como pré-requisito para a aplicação das TRAs (Moreira et al, 2001).

Tendo em mente a realidade genética e prática do manejo de pequenas populações em cativeiro, a aplicação das TRAs pode ser considerada uma necessidade absoluta para a manutenção de populações geneticamente saudáveis para além dos próximos 100 anos em cativeiro.

O germoplasma criopreservado permitirá a preservação por tempo indefinido da atual diversidade genética disponível, representada nas populações em cativeiro e na natureza.

Em 2017 foi descrito o sucesso na obtenção de um filhote de gato-leopardo-de-Amur (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) utilizando inseminação artificial cirúrgica (laparotomia) com sêmen fresco, fora da estação reprodutiva. A dose utilizada de eCG para induzir o desenvolvimento folicular foi de 200 UI, a dose de



hCG para induzir a ovulação 5 dias após foi de 200 UI, e o número de espermatozoides utilizados para inseminação 20-22 h após a administração de hCG foi de aproximadamente 10×10^6 , em um dos cornos uterinos (Tajima, 2017).

A aplicação prévia de progestinas nos protocolos de inseminação artificial impede a ovulação espontânea, aumenta a sensibilidade ovariana às gonadotropinas e assegura um ambiente endócrino normal, além de beneficiar o desenvolvimento embrionário e a normalização da função lútea precoce (Stewart et al., 2015).

Novas abordagens vão além dos métodos "clássicos" associados ao congelamento de espermatozoides, incluindo a preservação de tecido testicular combinada com xenoenxertia (*xenografting*) ou cultura *in vitro*, todas com potencial para resgatar grandes quantidades de germoplasma. Há também outras opções em desenvolvimento que provavelmente terão um grande impacto na próxima década, como tecnologia de células tronco, estabilização de espermatozoides à temperatura ambiente (liofilização) e uso de ferramentas genômicas (Comizzoli, 2015).

Considerações finais

A coleta e a formação de bancos de sêmen de todos os machos fundadores (com origem conhecida e geneticamente valiosos) poderia ajudar contra a perda genética, especialmente considerando o risco de morte desses machos antes de reproduzirem. Como o material genético das fêmeas não é preservado neste cenário, a primeira geração de machos produzidos deve também ser incluída no banco de reserva genômica (Johnston e Lacy, 1995).

Considerando que os felídeos geralmente têm uma expectativa de vida curta, baixa produção de filhotes (1-4 filhotes/ninhada) e início precoce da senescência reprodutiva (~7-10 anos de idade), a atual manutenção de populações geneticamente viáveis em cativeiro é muito difícil. As TRAs oferecem uma ferramenta potencial para enfrentar esses desafios de manejo e auxiliar na conservação de felídeos silvestres.

Os felídeos em cativeiro podem ajudar os seus congêneres na natureza, fornecendo informações precisas de sua fisiologia, protocolos anestésicos seguros, funcionando como embaixadores para financiar a conservação *in situ* e como banco de reserva genética, tanto na forma de animais vivos, como de seu material criopreservado.

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que participaram no desenvolvimento das atividades de pesquisa relacionadas à reprodução de animais silvestres, especialmente a toda a equipe da Itaipu Binacional, pelo suporte essencial para a execução desses projetos.

Referências

- Araujo GR.** Coleta farmacológica e criopreservação de sêmen de grandes felinos mantidos em cativeiro e capturados em vida livre com o uso de armadilhas de laço. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 91pp, 2016.
- Brown JL, Wasser SK, Howard J, Wells S, Lang K, Collins L, Raphael B, Schwartz R, Evans M, Hoyt R, Volk T, Wildt DE, Graham LH.** Development and utility of fecal progesterone analysis to assess reproductive status in felids. In Proceedings of the Congress of American Association of Zoo Veterinarians, St. Louis, (Ed. Junge RE). Omni Press: Lawrence, KS, p.273-276, 1993.
- Comizzoli P.** Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. Asian J Androl, v.17, p.640-645, 2015.
- Conforti VA, Bateman HL, Schook MW, Newsom J, Lyons LA, Grahn RA, Deddens JA, Swanson WF.** Laparoscopic oviductal artificial insemination improves pregnancy success in exogenous gonadotropin-treated domestic cats as a model for endangered felids. Biol Reprod, 2013; 89:1-9.
- Deco-Souza T, Paula TAR, Costa DS, Costa EP, Barros JBG, Araujo GR, Carreta-Jr M.** Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). Pesq Vet Bras, v.33, p.512-516, 2013.
- Howard JG.** Semen collection and analysis in nondomestic carnivores, In: Fowler ME, Zoo and Wild Animal Medicine. 3rd ed. W.B. Saunders: Philadelphia, 1993. p.390-399.
- Howard JG, Wildt DE.** Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. Theriogenology, v.71, p.130-148, 2009.
- Johnston LA, Lacy RC.** Genome resource banks for species conservation: selection of sperm donors. Cryobiology, v.32, p.68-77, 1995.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology, v.57, p.327-344, 2002.
- Moraes W, Morais RN, Moreira N, Lacerda O, Gomes MLF, Mucciolo RG, Swanson WF.** Successful



artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). In: American Association of Zoo Veterinarians Annual Meeting, 1997, Houston, TX. *Proceedings...* Houston, TX: AAZV, 1997. p.334-336. Abstract.

Moreira N, Monteiro-Filho ELA, Moraes W, Swanson WF, Graham LH, Pasquali OL, Gomes MLF, Morais RN, Wildt DE, Brown JL. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. *Zoo Biol*, v.20, p.103-116, 2001.

Ralls K, Brugger K, Ballou JD. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science*, v.206, p.1101-1103, 1979.

Schaller, GB. Foreword. In: McCarthy T, Mallon D, Nyhus PJ. (Eds.). *Snow Leopards - Biodiversity of the World: Conservation from Genes to Landscapes*. London: Academic Press, 2016. p.xxiii-xxvii.

Stewart RA, Crosier AE, Pelican KM, Pukazhenthi BS, Sitzmann BD, Porter TE, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. Progestin priming before gonadotrophin stimulation and AI improves embryo development and normalizes luteal function in the cat. *Reprod Fertil Develop*, v.27, n.2, p.360-371, 2015.

Swanson WF. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, v.66, p.49-58, 2006.

Tajima H, Yoshizawa M, Sasaki S, Yamamoto F, Narushima E, Ogawa Y, Orima H, Tsutsui T, Toyonaga M, Kobayashi M, Kawakami E, Hori T. A trial of semen collection by transrectal electroejaculation method from Amur leopard cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). *J Vet Med Sci*, v.78, p.1067-1073, 2016.

Tajima H, Yoshizawa M, Sasaki S, Yamamoto F, Narushima E, Tsutsui T, Funahashi T, Kusuda S, Doi O, Tateyama Y, Kobayashi M, Hori T, Kawakami E. Intrauterine insemination with fresh semen in Amur leopard cat (*Prionailurus bengalensis eutilura*) during non-breeding season. *J Vet Med Sci*, v.79, p.92-99, 2017.

Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo, B. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.69, p.485-490, 2008.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.481-492, 2000.

Wildt DE, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AE, Brown JL, Joslin P, O'Brien SJ. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature*, v.329, p.328-331, 1987.

Tajima H, Yoshizawa M, Sasaki S, Yamamoto F, Narushima E, Tsutsui T, Funahashi T, Kusuda S, DOI O, Tateyama Y, Kobayashi M, Hori T, Kawakami E. Intrauterine insemination with fresh semen in Amur leopard cat (*Prionailurus bengalensis eutilura*) during non-breeding season. *J Vet Med Sci*, v.79, p.92-99, 2017.