

# Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*)

## Semen collection and evaluation in the jaguar (*Panthera onca*)

Ronaldo Gonçalves MORATO<sup>1</sup>; Marcelo Alcindo de Barros Vaz GUIMARÃES<sup>2</sup>;  
Adauto Luis Veloso NUNES<sup>3</sup>; Aulus Cavalieri CARCIOFI<sup>1</sup>; Fernando FERREIRA<sup>1</sup>;  
Valquíria Hypollito BARNABE<sup>1</sup>; Renato Campanarut BARNABE<sup>1</sup>

CORRESPONDÊNCIA PARA:  
Renato Campanarut Barnabe  
Departamento de Reprodução Animal  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP  
Cidade Universitária Armando de  
Salles Oliveira  
Av. Orlando Marques de Paiva, 87  
05508-000 – São Paulo – SP  
e-mail: rbarnabe@usp.br

1 - Departamento de Produção Animal  
da Faculdade de Medicina Veterinária  
e Zootecnia da USP – SP  
2 - Fundação Parque Zoológico de São  
Paulo – SP  
3 - Parque Zoológico Municipal “Quinzinho  
de Barros” – SP

### RESUMO

Foram submetidas à eletroejaculação 10 onças pintadas, de origem desconhecida, mantidas na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (n = 7) e Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” - Sorocaba (n = 3), recebendo alimentação de acordo com a dieta de rotina de cada instituição. Nos 54 procedimentos realizados, foram obtidos ejaculados, ocorrendo contaminação por urina em 3,7% (n = 2) e em 11 (20,4%) ocasiões em que não foram observados espermatozoides. O volume médio obtido foi 7,42 ± 3,69 ml, com motilidade média de 62,6 ± 11,0% e vigor de 2,71 ± 0,52. A concentração espermática foi 6,20 ± 3,03x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml, sendo que a porcentagem média de espermatozoides morfológicamente normais foi 46,7 ± 5,8%. A técnica de colheita de sêmen por eletroejaculação é eficiente na espécie *Panthera onca*.

**UNITERMOS:** Eletroejaculação; Espermatozoides; Jaguar.

### INTRODUÇÃO

A onça pintada (*Panthera onca*), o maior felino das Américas, encontra-se na lista de animais ameaçados de extinção da União Internacional para a Conservação da Natureza<sup>20</sup>. A principal ameaça a este grande felino é a perda constante de hábitat, associada à fragmentação destes<sup>5</sup>. Como conseqüência, temos o isolamento de populações e o isolamento de material genético que podem levar à diminuição da variabilidade genética. Vários autores citam que a diminuição da variabilidade genética pode afetar a espermatogênese e a ovulação, aumentar a susceptibilidade a doenças e a morbidade e mortalidade perinatal<sup>11,12,15</sup>. Há um consenso de que a manutenção da diversidade genética na espécie é dependente da reprodução<sup>22</sup>. Neste contexto, a aplicação de técnicas de reprodução assistida surge como importante ferramenta na conservação de espécies silvestres ameaçadas de extinção, na medida em que pode minimizar a perda da variabilidade genética através de programas de manejo reprodutivo.

Para que possamos aplicar técnicas artificiais de reprodução em espécies de interesse, informações básicas de fisiologia reprodutiva devem ser obtidas, como as características normais do ejaculado. Para tanto, métodos seguros de colheita de amostras devem ser desenvolvidos de forma a garantir o bem-estar do animal, assim como tranqüilidade para a equipe que o assiste.

A eletroejaculação é o método de eleição para obtenção de sêmen em felinos<sup>13</sup>. Apesar disso, a primeira eletroejaculação em onça pintada não obteve bons resultados<sup>4</sup>. Posteriormente, um estu-

do com 6 indivíduos obteve melhores resultados, ainda que sem anestesiá-los os animais<sup>11</sup>, expondo técnicos e animais a riscos de acidentes. Desde a padronização da técnica de eletroejaculação em felinos<sup>13,24</sup>, 28 espécies de felinos selvagens foram avaliadas, incluindo a onça pintada. No entanto, estudos sistemáticos para a espécie não foram conduzidos. Os resultados obtidos até o momento retratam a aplicação da técnica uma única vez por indivíduo.

Sob estes aspectos, os objetivos deste trabalho foram:

- avaliar sistematicamente a técnica de colheita de sêmen em felinos aplicada à onça pintada;
- avaliar e caracterizar o ejaculado de onça pintada.

### MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas 10 onças pintadas, machos, adultos (7 a 10 anos), de origem desconhecida, mantidas em recintos individuais, que obedeciam às instruções normativas do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (7) (FPZSP) e Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” - Sorocaba (3) (PZMS).

Para a eletroejaculação, os animais eram contidos quimicamente com a associação tiletamina-zolazepam (Zoletil 50-Virbac do Brasil), na proporção de 10 mg/kg. O aparelho utilizado para a geração dos eletrochoques era o modelo Torjet 65A (Eletrovet), alimentado por corrente elétrica de 110/220V. O eletrodo retal era bipolar, com três tiras longitudinais em cobre com 9 cm de comprimento, o diâmetro do eletrodo era de 2,3 cm com comprimento

de 29 cm. O eletrodo era devidamente lubrificado com carboximetil-celulose e introduzido no reto por, aproximadamente, 15 cm, com as tiras longitudinais posicionadas ventralmente sob leve pressão. O pênis era exposto, devidamente lavado, e um copo coletor plástico, aquecido na palma da mão, era acoplado. A série de eletrochoques seguiu o protocolo de 80 estímulos divididos em 3 séries (série 1 com 10 estímulos em 2, 3, 4V; série 2 com 10 estímulos em 3, 4, 5V; série 3 com 10 estímulos em 5 e 6V)<sup>13,24</sup>. O material obtido era imediatamente examinado quanto ao aspecto e coloração e, em seguida, era transferido para um tubo graduado onde se verificava o volume. Para a obtenção de pH, utilizou-se tira reagente (Merck). Uma pequena fração do ejaculado, sobre lâmina de vidro para microscopia previamente aquecida a 37°C em mesa aquecedora (Eletrovet), era coberta com lamínula e levada ao microscópio ótico binocular (Olimpus BHK), onde era avaliado quanto à motilidade (0-100%) e vigor (0-5). A concentração espermática era avaliada com sêmen diluído 1:3 em câmara hematimétrica de Neubauer. Outra fração do ejaculado era fixada em formol salino a 10%, convenientemente preparada para exame em microscópio de contraste de fase (Zeiss), que permitiu realizar a avaliação de morfologia espermática. Para avaliação e caracterização dos ejaculados, eram utilizadas medidas de tendência central (x) e medidas de dispersão (d).

## RESULTADOS

A eletroejaculação foi realizada 54 vezes, obtendo-se ejaculado em 100% dos procedimentos. Houve contaminação por urina em duas colheitas (3,7%), confirmada por diminuição do pH e coloração amarelada da amostra, que à microscopia apresentava espermatozoides. Em 11 (20,4%) ocasiões, os ejaculados não continham espermatozoides. A coloração do ejaculado variou entre transparente a esbranquiçado. O pH médio normal observado foi 7. Em ocasiões em que ocorreu contaminação por urina, o pH variou de 5 a 6. O volume médio obtido foi de  $7,42 \pm 3,69$  ml, com motilidade média de  $62,6 \pm 11,0\%$  e vigor de  $2,71 \pm 0,52$ . A concentração espermática foi  $6,20 \pm 3,03 \times 10^6$  espermatozoides/ml, sendo que a porcentagem média de espermatozoides morfológicamente normais foi  $46,7 \pm 5,8\%$  (Tab. 1 e 2 e Fig. 1).

**Tabela 2**

Valores médios das características seminais de onça pintada (n = 43 amostras). São Paulo/Sorocaba, 1996 a 1997.

Parâmetro	Média e desvio padrão
Volume (ml)	$7,42 \pm 3,69$
Concentração espermática ( $10^6$ /ml)	$6,20 \pm 3,03$
Motilidade (%)	$62,60 \pm 11,00$
Vigor (0-5)	$2,71 \pm 0,52$
Normal (%)	$46,70 \pm 5,80$
Anormal Primário	
Macrocefálico (%)	$0,50 \pm 0,89$
Microcefálico (%)	$1,30 \pm 1,25$
Bicefálico (%)	$1,00 \pm 1,58$
Cabeça estreita (%)	$18,40 \pm 6,49$
Cabeça redonda (%)	$1,60 \pm 1,23$
Acrossomo anormal (%)	$3,60 \pm 2,00$
Acrossomo protuberante (%)	$1,80 \pm 1,40$
Peça intermediária anormal (%)	$1,50 \pm 1,36$
Sem peça intermediária (%)	$0,20 \pm 0,42$
Cauda fortemente enrolada (%)	$4,70 \pm 3,20$
Biflagelado (%)	$0,50 \pm 0,97$
Anormal Secundário	
<i>Bent midpiece</i> sem gota (%)	$2,95 \pm 1,90$
<i>Bent midpiece</i> com gota (%)	$2,90 \pm 2,40$
<i>Bent tail</i> sem gota (%)	$4,30 \pm 2,42$
<i>Bent tail</i> com gota (%)	$1,95 \pm 1,80$
Gota proximal (%)	$2,95 \pm 2,32$
Gota distal (%)	$2,40 \pm 2,47$
<i>Bent neck</i> (%)	$0,75 \pm 1,00$

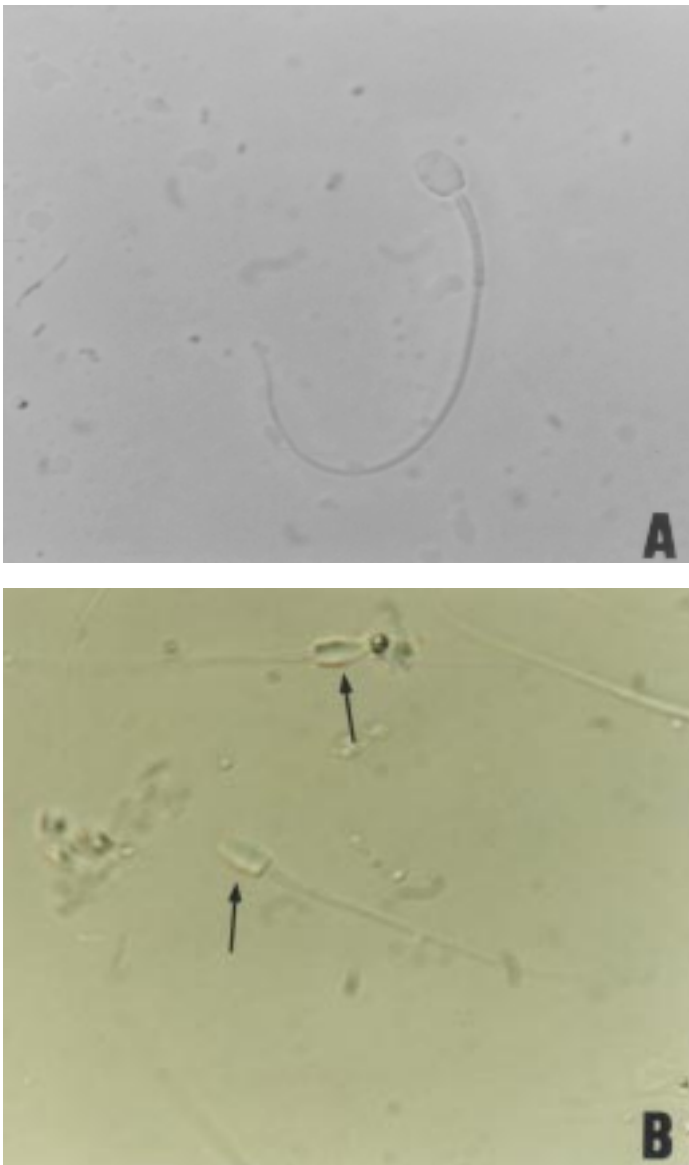
## DISCUSSÃO

A técnica de colheita de sêmen por eletroejaculação revelou-se eficiente, uma vez que 100% dos procedimentos produziram ejaculado. Platz Jr.; Seager<sup>14</sup>, trabalhando com gatos domésticos, utilizaram protocolo com 180 estímulos, que variavam de 2V a 7V, e obteve 60,6% de sucesso. Wildt *et al.*<sup>24</sup> não avalia a técnica em si,

**Tabela 1**

Valores médios das características seminais de onça pintada, por indivíduo. São Paulo/Sorocaba, 1996 a 1997.

Animal	Eletroejaculação (n)	Volume (ml)	Concentração ( $10^6$ /ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Normais (%)
1	2	$0,8 \pm 0,7$	0	0	0	0
2	1	4,7	12,0	45,0	1,8	34,0
3	7	$8,0 \pm 4,5$	$5,0 \pm 7,5$	$60,5 \pm 11,6$	$2,5 \pm 0,5$	$47,7 \pm 5,4$
4	7	$14,8 \pm 7,4$	$6,9 \pm 5,9$	$71,4 \pm 7,1$	$3,0 \pm 0,5$	$45,1 \pm 3,5$
5	7	$4,2 \pm 2,0$	$3,7 \pm 3,7$	$42,4 \pm 34,2$	$1,9 \pm 1,6$	$50,0 \pm 2,0$
6	7	$10,8 \pm 8,1$	$2,2 \pm 2,3$	$45,0 \pm 42,2$	$1,9 \pm 1,8$	$53,5 \pm 10,3$
7	7	$4,7 \pm 3,6$	$4,5 \pm 5,2$	$43,9 \pm 26,4$	$1,9 \pm 1,1$	$50,9 \pm 8,3$
8	7	$6,5 \pm 3,6$	$5,0 \pm 4,3$	$56,8 \pm 28,7$	$2,5 \pm 1,4$	$46,3 \pm 6,1$
9	6	$7,1 \pm 2,2$	$9,1 \pm 8,9$	$68,9 \pm 10,1$	$3,1 \pm 0,6$	$46,4 \pm 6,1$
10	3	$3,5 \pm 3,7$	0	0	0	0



**Figura 1**

Morfologia do espermatozóide de *Panthera onca*. a- normal (1.250x); b- cabeça estreita (principal anormalidade encontrada, 1.000x).

mas relata que entre 22 cheetahs (*Acinonyx jubatus*) 18 produziram ejaculado, porém a não-obtenção de sêmen nos outros 4 animais parece estar mais relacionada à aspermia - propriamente dita - que à não-resposta ao protocolo, uma vez que repetidos procedimentos produziram ejaculado nos outros animais. Desde então, vários autores adotaram a metodologia, sendo que se observa regularidade na obtenção de sêmen nas várias espécies de felinos estudadas<sup>1,3,7,8,16,19,25</sup>.

A contaminação do ejaculado por urina ocorreu em apenas 3,7% dos procedimentos, resultado bastante satisfatório se considerarmos ser este o principal problema na eletroejaculação de felinos<sup>10,14,18,21</sup>. Possivelmente, a contaminação do ejaculado por urina esteja relacionada ao posicionamento mais cranial do eletrodo no momento da eletroejaculação<sup>6,10,17</sup>, uma vez que parece haver maior proximidade entre a inervação controladora da micção e a inervação controladora da ejaculação, na família Felidae<sup>10</sup>.

A variação da coloração pode ser explicada pelas diferenças dos ejaculados. Aqueles que não apresentavam espermatozóides mostravam-se transparentes, ao passo que aqueles mais concentrados apresentavam coloração esbranquiçada.

A literatura apresenta poucos trabalhos avaliando sêmen de *Panthera onca*<sup>4,7,11</sup>. Os resultados obtidos estão próximos aos encontrados por outros autores<sup>7,11</sup>, exceto quando comparado às anormalidades espermáticas que apresentaram índices superiores em nosso trabalho.

As causas do elevado índice de espermatozóides morfologicamente anormais dos animais estudados são de difícil interpretação. Howard<sup>6</sup> relata que elevados índices de anormalidade espermática são comuns na família Felidae. Geralmente as alterações de qualidade espermática estão diretamente relacionadas a três grandes fatores: genéticos, nutricionais e ambientais<sup>9</sup>.

Considerando-se o fator genético, elevado índice de espermatozóides morfologicamente anormais (75%) tem sido associada a baixa variabilidade genética em cheetahs (*Acinonyx jubatus*)<sup>23</sup>. Em pantera da Flórida (*Felis concolor coryi*), subespécie de puma que apresenta elevado grau de consanguinidade e concomitante perda de variabilidade genética, a incidência de espermatozóides anormais está em torno de 95%<sup>15</sup>. Sendo os animais estudados de origem desconhecida, o estudo de paternidade pode contribuir substancialmente para a elucidação da causa do elevado índice de espermatozóides morfologicamente anormais.

Quanto ao aspecto nutricional, deve-se considerar que as dietas fornecidas pelos zoológicos sul-americanos são baseadas em carne (equina ou bovina) ou frango e pescoço de frango sem suplementação mineral e vitamínica, diminuindo a concentração espermática e aumentando a porcentagem de espermatozóides morfologicamente anormais, quando comparadas às dietas suplementadas.

Condições ambientais desfavoráveis podem conduzir ao estresse, afetando o ciclo espermato gênico<sup>2</sup>. No presente estudo, é difícil avaliar o impacto da condição de cativeiro, uma vez que não há informações quanto às características do sêmen de onça pintada em vida livre, que permita comparação.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

a) a técnica utilizada é bastante eficiente para a obtenção de ejaculados em onça pintada, devendo ser adotada rotineiramente nesta espécie, tanto para obtenção de ejaculados em animais em cativeiro como para animais em vida livre;

b) observou-se elevado índice de anormalidade espermática, quando comparado a outros autores;

c) estudos devem ser conduzidos no sentido de elucidarmos as possíveis causas do elevado índice de anormalidades espermáticas, dando-se ênfase aos fatores genéticos e nutricionais.

## AGRADECIMENTOS

Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros".

Apoio financeiro: CAPES, CNPq.

## SUMMARY

Electroejaculation was performed in 10 jaguars (*Panthera onca*) of unknown breed, granted by the Fundação Parque Zoológico de São Paulo and Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros", with routine feeding for each institution. The electroejaculation was successful in 100% of the cases (n = 54), urine contamination occurred in 3.7% (n = 2), and in 11 (20.4%) were obtained ejaculates without spermatozoa. The mean obtained volume was  $7.42 \pm 3.69$  ml, with motility  $62.6 \pm 11.0\%$  and status  $2.71 \pm 0.52$ . The sperm concentration was  $6.20 \pm 3.03 \times 10^6$  sperm/ml, with normal morphology spermatozoa  $46.7 \pm 5.8\%$ . The electroejaculation technique was efficient for semen collection on jaguars.

**UNITERMS:** Electroejaculation; Spermatozoa; Jaguar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BARONE, M.A.; ROELKE, M.E.; HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; ANDERSON, A.E.; WILDT, D.E. Reproductive characteristics of male florida panthers; comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American zoos. **Journal of Mammalogy**, v.1, n.75, p.150-62, 1994.
- 2- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames : Iowa State University Press, 1989. 285p.
- 3- BYERS, A.P.; HUNTER, A.G.; SEAL, U.S.; GRAHAM, E.F.; TILSON, R.L. Effect of season on seminal traits and serum hormone concentrations in captive male siberian tiger (*Panthera tigris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, n.1, p.119-25, 1990.
- 4- CARVALHO, C.T. Sêmen em grandes felinos. **Revista de Medicina Veterinária**, v.2, n.4, p.195-201, 1968.
- 5- CRAWSHAW Jr., P.G. Recommendations for study design on research projects on neotropical felids. In: MONDOLFI, E. **Felinos de Venezuela: biologia, ecologia y conservación**. Venezuela : Fudeci, 1991. p.187-222.
- 6- HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M.E. **Zoo and wildlife medicine**. 3.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1993. p.390-8.
- 7- HOWARD, J.G.; BUSH, M.; HALL, L.L.; WILDT, D.E. Morphological abnormalities in spermatozoa of 28 species of non-domestic felids. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., Urbana-Champaign, 1984. **Proceedings**. 1984. p.57.
- 8- JOHNSTON, L.A.; ARMSTRONG, D.L.; BROWN, J.L. Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (*Panthera uncia*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, n.1, p.229-36, 1994.
- 9- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. Berlin : Springer-Verlag, 1981. 495p.
- 10- MARTIN, I.C.A. The principles and practice of electroejaculation of mammals. **Symposium of Zoological Society of London**, n.43, p.127-52, 1978.
- 11- MIES-FILHO, A.; TELECHEA, N.L.; BOHRER, J.L.; WALLAWER, W.P. Produção espermática de *Panthera onca*. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.2, n.1, p.55-65, 1974.
- 12- O'BRIEN, S.J.; ROELKE, M.E.; MARKER, L.; NEWMAN, A.; WINKLER, C.A.; MELTZER, L.; COLLY, L.; EVERMANN, J.F.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. **Science**, v.227, p.1428-34, 1985.
- 13- PLATZ Jr., C.C.; FOLLIS, T.; DEMOREST, N.; SEAGER, S. Semen collection, freezing and insemination in the domestic cat. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., Kracow, 1976. **Proceedings**. p.1053-5.
- 14- PLATZ Jr., C.C.; SEAGER, W.J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.173, n.10, p.1353-5, 1978.
- 15- ROELKE, M.E.; MARTENSON, J.S.; O'BRIEN, S.J. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. **Current Biology**, v.3, n.6, p.340-50, 1993.
- 16- ROTH, T.L.; HOWARD, J.G.; DONOGHUE, A.M.; SWANSON, W.F.; WILDT, D.E. Function and culture requirements of snow leopard (*Panthera uncia*) spermatozoa *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, n.3, p.563-9, 1994.
- 17- SCOTT, J.V.; DZIUK, P.J. Evaluation of the electroejaculation technique and the spermatozoa thus obtained from rats, mice and guinea pigs. **Anatomical Record**, v.133, n.4, p.655-64, 1959.
- 18- SEAGER, S.W.J.; PLATZ Jr., C.C. Semen collection and freezing in captive wild mammals. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., Kracow, 1976. **Proceedings**. p.1075-7.
- 19- SWANSON, W.F.; ROTH, T.L.; BLUMER, E.; CITINO, S.B.; KENNY, D.; WILDT, D.E. Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Panthera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Theriogenology**, v.45, n.1, p.241, 1996.
- 20- THORNBACK, J.; JENKINS, M. **The IUCN mammal red data book**. UK : The Gresham Press, 1982. 516p.
- 21- WATSON, P.F. A review of techniques of semen collection in mammals. **Symposium of Zoological Society of London**, n.43, p.97-126, 1978.
- 22- WILDT, D.E. Reproductive research in conservation biology: priorities and avenues for support. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.4, n.20, p.391-5, 1989.
- 23- WILDT, D.E.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; BARONE, M.A.; COOPER, K.A.; GRISHAM, J.; HOWARD, J.G. Reproductive status of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in north american zoos: the benefits of physiological surveys for strategic planning. **Zoo Biology**, v.12, n.1, p.45-80, 1993.
- 24- WILDT, D.E.; BUSH, M.; HOWARD, J.G.; O'BRIEN, S.J.; MELTZER, D.; VAN DYK, A.; EBEDES, H.; BRAND, D.J. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v.29, n.4, p.1019-25, 1983.
- 25- WILDT, D.E.; MELTZER, D.; CHAKRABORTY, P.K.; BUSH, M. Adrenal-testicular-pituitary relationships in the cheetah subjected to anesthesia/electroejaculation. **Biology of Reproduction**, v.30, n.3, p.655-72, 1984.

Recebido para publicação: 03/02/1997

Aprovado para publicação: 23/09/1997