



Colheita farmacológica de sêmen de onças-pardas (*Puma concolor*: Mammalia: Carnivora: Felidae)

[Pharmacological semen collection in cougars (*Puma concolor*: Mammalia:
Carnivora: Felidae)]

G.R. Araujo¹, T.A.R. Paula², T. Deco-Souza³, R.G. Morato⁴, L.C.F. Bergo¹,
L.C. Silva¹, P.N. Jorge-Neto⁵, B.F.B. Sampaio²

¹Instituto de Biociências - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campo Grande, MS

²Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal do Mato
Grosso do Sul - Campo Grande, MS

⁴Centro Nacional de Conservação de Carnívoros Mamíferos - Atibaia, SP

⁵Aluno de pós-graduação - Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia - Universidade de São Paulo - São Paulo, SP

G.R. Araujo
<https://orcid.org/0000-0002-6460-946X>
T.A.R. Paula
<https://orcid.org/0000-0001-9554-0939>
T.D. Souza
<https://orcid.org/0000-0002-5157-3605>
R.G. Morato
<https://orcid.org/0000-0002-8304-9779>
L.C.F. Bergo
<https://orcid.org/0000-0003-2637-7693>
L.C. Silva
<https://orcid.org/0000-0002-9486-1500>
P.N. Jorge-Neto
<https://orcid.org/0000-0002-5894-0148>
B.F.B. Sampaio
<https://orcid.org/0000-0002-9445-6193>

RESUMO

Objetivou-se, por meio do presente estudo, avaliar o método de colheita farmacológica de sêmen com sondagem uretral, em machos de onças-pardas (*Puma concolor*) mantidos em cativeiro. A técnica proposta (Cat; N=3) foi comparada com a eletroejaculação (EE; N=4). Para a colheita farmacológica, utilizou-se medetomidina para induzir a liberação de sêmen na uretra e sonda uretral para gatos, sem janela lateral, para colheita do sêmen por capilaridade. O método foi eficaz em todos os animais usados. Por meio dessa técnica, colheram-se amostras com menor volume ($106,7 \pm 30,5^a \mu\text{L}$) e maior concentração ($524,1 \pm 54,3^b \times 10^6$ espermatozoides/mL) em relação à EE ($450,0 \pm 0,1^b \mu\text{L}$ e $205,0 \pm 141,8^a \times 10^6$ espermatozoides/mL). As avaliações de vigor, motilidade e patologia espermática demonstraram que a técnica não afeta a qualidade do sêmen em relação à EE ($P > 0,05$). Dessa forma, o método proposto consiste em uma técnica mais prática e eficiente para a colheita de sêmen com boa qualidade, dispensando o eletroejaculador.

Palavras-chave: medetomidina, eletroejaculação, *Puma concolor*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the pharmacological semen collection method with urethral catheterization (CT) in captive cougar (*Puma concolor*) males. The pharmacological method (CT; N= 3) was compared to the electroejaculation technique (EE; N= 4). For CT collection, medetomidine was administrated to induce semen release using a tomcat catheter inserted into the urethra to collect by capillarity. The proposed method was efficacious on all animals used. Through the CT method, semen collected yielded smaller volume ($106,7 \pm 30,5^a \mu\text{L}$) and higher concentration ($524,1 \pm 54,3^b \times 10^6$ sperm/mL) compared to EE ($450,0 \pm 0,1^b \mu\text{L}$ and $205,0 \pm 141,8^a \times 10^6$ sperm /mL). Evaluations of vigor, motility and sperm pathology demonstrated that CT does not affect semen quality when compared to EE ($P > 0.05$). Thus, the proposed method consists of a more practical and efficient technique for semen collection with good quality, eliminating the need for electroejaculation.

Keywords: medetomidine, electroejaculation, *Puma concolor*

INTRODUÇÃO

A onça-parda (*Puma concolor*), assim como todos os felídeos selvagens no mundo, vem sofrendo grandes pressões antrópicas, que têm resultado na diminuição das populações de vida

livre (Crawshaw, 1991). Uma das estratégias de conservação de animais ameaçados de extinção é por meio de programas de reprodução assistida, que visam à manutenção de uma população geneticamente viável (Plano Nacional de Conservação da Onça-Parda - PAN Onça-Parda, Portaria MMA nº 76 / 2014).

Recebido em 4 de setembro de 2018

Aceito em 26 de março de 2019

E-mail: gediendson@gmail.com

Apesar do progresso nos estudos para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas em felídeos silvestres, os entraves em desenvolver tais tecnologias iniciam na dificuldade em se obter amostras representativas de sêmen. A eletroejaculação é a técnica de escolha para colheita de sêmen em felídeos silvestres, porém, por exigir equipamentos específicos, operador treinado e principalmente resultar em amostras de sêmen muito diluídas e às vezes contaminadas com urina, torna-se uma técnica pouco viável para animais de vida livre (Zambelli *et al.*, 2008; Lueders *et al.*, 2012). Além disso, a estimulação elétrica inerente à eletroejaculação excita o animal, exigindo doses anestésicas maiores para garantir a analgesia e a segurança da equipe ao manipular um grande felídeo.

Uma nova possibilidade para colheita de sêmen de felídeos surgiu com o trabalho de Zambelli *et al.* (2008), os quais desenvolveram um método farmacológico de colheita de sêmen em gato usando a medetomidina, um alfa-dois-agonista que tem ação nos dos ductos deferentes, auxiliando a ejaculação (Turner *et al.*, 1995). Até o momento, a medetomidina foi testada em gatos domésticos e em outras espécies de felídeos selvagens, o que possibilitou a obtenção de amostras concentradas de sêmen em animais anestesiados, dispensando o eletroejaculador e sem perda da qualidade espermática, mostrando-se, assim, uma técnica promissora a ser aplicada nas demais espécies de felídeos (Zambelli *et al.*, 2008; Zambelli *et al.*, 2010; Lueders *et al.*, 2012; Lueders *et al.*, 2014; Prochowska *et al.*, 2014; Kheirkhah *et al.*, 2017; Araújo *et al.*, 2018). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o método de colheita farmacológica de sêmen com sondagem uretral após aplicação da medetomidina, em machos de onças-pardas mantidos em cativeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a colheita farmacológica de sêmen (Cat), foram usadas três onças-pardas mantidas em cativeiro pela ONG Mata Ciliar, localizada em Jundiá-SP (23°10'41.30"S / 46°56'29.50"O), e pelo Zoológico de Paulínia-SP (22°45'58.40"S / 47° 9'13.60"O). Para a colheita por eletroejaculação, foram usadas quatro onças-pardas mantidas pelo Centro de Reabilitação de Animais Silvestres do Mato Grosso do Sul

(CRAS-MS). Foi realizada uma colheita por animal. Todos os animais eram mantidos em recintos separados, com água *ad libitum* e dieta à base de carne bovina e suína. A idade dos animais foi obtida em prontuários das respectivas instituições mantenedoras.

A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Protocolo n° 727/2015) e da Universidade Federal de Viçosa (Registro n° 21/2008) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Autorização Sisbio 46031-4).

Para a colheita de sêmen por eletroejaculação (EE), os animais foram mantidos em jejum alimentar por 12 horas e contidos quimicamente, via intramuscular, pela associação de cloridrato de cetamina (10mg/kg, Dopalen[®], Vetbrands, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (1,2mg/kg, Anasedan[®], Vetbrands, SP, Brasil). Previamente à colheita de sêmen, foi feito o esvaziamento da vesícula urinária com sonda uretral estéril e seringa de 10mL e a posterior lavagem desta com solução fisiológica estéril. O sêmen foi colhido com auxílio de um aparelho de eletroejaculação (Eletrogen SA200[®], Santa Lydia, SP, Brasil), conforme descrito por Deco *et al.* (2010). Um transdutor retal de 2,5cm de diâmetro, com três eletrodos longitudinais conectados ao aparelho de eletroejaculação, foi introduzido no reto do animal (aproximadamente 12cm), com os eletrodos posicionados ventralmente. O pênis foi exposto e aproximado a um microtubo graduado de 1,5mL, previamente aquecido à temperatura de 38°C, o qual foi substituído a cada série de estímulos. Foram aplicadas, no máximo, quatro séries de 10 estímulos de 16V, com intervalos de um minuto entre as séries. Cada estímulo levou aproximadamente um segundo para ir de 0V a 16V, permanecendo por dois a três segundos, seguido por um retorno abrupto a 0V, com intervalo entre os estímulos de dois a três segundos.

Para a colheita farmacológica de sêmen por cateterização uretral (Cat), os animais foram mantidos em jejum alimentar de 12 horas e então anestesiados por meio da associação de medetomidina (0,08-0,1mg/kg, Precision Pharmacy, CA, USA) e cetamina (5mg/kg, Dopalen[®], Ceva, SP, Brasil). Após o término dos

procedimentos, a anestesia foi revertida utilizando-se o atipamezole (0,25mg/kg, Precision Pharmacy, CA, USA) via intramuscular.

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

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

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

Para a concentração espermática (spz/mL), foi usada a diluição de sêmen em água destilada na

proporção 1:100. Uma alíquota dessa diluição foi depositada nos dois lados de uma câmara de Neubauer espelhada e observada em microscópio óptico (200x). A contagem dos espermatozoides foi feita da média da quantidade encontrada nos cinco quadrantes de cada lado. A concentração foi determinada pela fórmula padrão, apresentando o número de espermatozoides por mL do ejaculado: $C = 5 \times 10 \times N \times D \times 10^3 \text{ spz/mL}$, em que: C é a concentração, 5 é o número de quadrantes contados em cada lado da câmara, 10 é a altura entre câmara e lamínula, N é a média do número de espermatozoides contados em cada lado da câmara, D é o fator de diluição da amostra (100) e 10^3 corresponde à transformação de mm^3 para mL. O total de espermatozoides por ejaculado foi calculado multiplicando-se a concentração pelo volume do ejaculado. A morfologia espermática foi realizada com uma alíquota de sêmen fixada em formol salino tamponado (1:10). Foram contadas 200 células em preparação úmida utilizando-se um microscópio de contraste de fase, as quais foram classificadas em normais ou quanto aos tipos de defeitos maiores e menores (CBRA, 2013).

Os dados obtidos nas análises do sêmen fresco de onças-pardas foram expressos em média e desvio-padrão. Usou-se o teste de Lilliefors para verificar distribuição normal ou não das variáveis. A homogeneidade das variâncias foi avaliada por meio do teste de Cochran e Bartlett. Para as variáveis que atenderam às premissas para avaliação paramétrica (ANOVA), foi usado o teste t de Student a 5% de significância para a comparação das médias entre os tratamentos Cat e EE. Para variáveis que não permitiram análise paramétrica e para o dado qualitativo vigor, foi usado o teste não paramétrico de Wilcoxon a 5% de significância.

RESULTADOS

Para a colheita farmacológica (Cat), o sêmen foi colhido com a introdução da sonda uretral, em média 12cm, e mediante uma leve pressão negativa na seringa. Por meio da colheita farmacológica, usando a medetomidina, foi possível colher sêmen em todos os animais, no entanto um animal (Pc3) só ejaculou líquido seminal. A coloração observada nos ejaculados foi leitosa, com exceção apenas do animal Pc3, que foi translúcida.

Por meio da colheita farmacológica, colheram-se amostras de sêmen mais concentradas ($524,1 \pm 54,3^b$ vs. $205,0 \pm 141,8^a$, $P < 0,05$) e menos volumosas ($106,7 \pm 30,5^a$ vs. $450,0 \pm 0,1^b$, $P < 0,05$) em relação à colheita por EE, porém sem prejuízo ao total de espermatozoides colhidos ($56,5 \pm 16,3^a$ vs. $93,5 \pm 73,7^a$, $P > 0,05$) (Tab. 1). Também não houve diferença na qualidade do sêmen colhido entre os dois métodos (Tab. 1) em relação ao vigor ($3,0 \pm 0,0^a$ vs. $3,5 \pm 0,6^a$, $P > 0,05$), motilidade ($70,0 \pm 0,0^a$ vs. $75,0 \pm 13,0^a$, $P > 0,05$) e total de patologias ($59,5 \pm 7,8^a$ vs. $53,9 \pm 15,5^a$, $P > 0,05$).

DISCUSSÃO

O resultado do presente estudo apresenta a primeira descrição das características de sêmen de onças-pardas colhido por sondagem uretral após aplicação da medetomidina (Cat). A medetomidina é um sedativo da classe dos alfa-adrenérgicos (α -A) que possui a maior seletividade para os receptores alfa-2 (α -2A) e consequentemente maior eficácia dentre os sedativos da categoria (Moens *et al.*, 2003). A utilização de α -2A mostrou-se efetiva na estimulação da ereção e ejaculação em cavalos (Turner *et al.*, 1995), na duração da ereção peniana em rinoceronte-branco (Silinski *et al.*, 2002) e no aumento da concentração de espermatozoides no ejaculado de cães (Dooley *et al.*, 1990). Como observado no presente trabalho com pumas, a medetomidina não causou ereção nem a ejaculação em gatos (Zambelli *et al.*, 2007) ou em onças-pintadas (Araujo *et al.*, 2018), mas promoveu a liberação dos espermatozoides na uretra. Dessa forma, apesar de a medetomidina não promover ereção ou ejaculação em felídeos, ao sondar esses animais, é possível colher o sêmen liberado na uretra.

As características da sonda uretral são cruciais para a colheita farmacológica de sêmen, uma vez que o sucesso no procedimento dependerá do deslocamento do sêmen através da sonda por capilaridade – pressões negativas excessivas podem contaminar a amostra com urina. Dessa

forma, a sonda uretral semiflexível sem janela lateral, usada em gatos (*TomCat*), devido ao pequeno diâmetro, possibilita uma sondagem uretral segura e permite a colheita do sêmen por capilaridade.

Por meio da colheita farmacológica, foram obtidos ejaculados em todos os animais, no entanto uma onça-parda (Pc3) ejaculou apenas líquido seminal. No exame andrológico, foi observado que os testículos desse animal apresentavam consistência firme. A degeneração testicular é a lesão mais frequente associada à infertilidade e à baixa qualidade seminal – baixa concentração e elevada taxa de espermatozoides patológicos e até azoospermia –, nesses casos, a consistência testicular pode estar alterada – flácida ou firme, dependendo da gravidade da lesão (Nascimento e Santos, 2003; Elcock e Schoning, 1984). Diversos fatores são capazes de induzir lesões testiculares, incluindo nutrição, inflamação por infecções, trauma, agentes nocivos e idade (Elcock e Schoning, 1984). O macho em questão estava com 20 anos de idade, estando a senilidade possivelmente associada à azoospermia e degeneração testicular, nesse caso. Dessa forma, os dados obtidos desse animal somente foram usados para o cálculo do volume de sêmen colhido.

Por meio da colheita farmacológica (Cat), foi possível obter amostras de sêmen mais concentradas em relação à colheita por EE ($524,1$ e 205×10^6 spz/mL, respectivamente), e, apesar do menor volume, o total de espermatozoides colhido por Cat foi semelhante ($P > 0,05$) ao colhido por EE ($56,5$ e $93,5 \times 10^6$ spz, respectivamente; Tab. 1). Esses resultados (baixo volume com grande concentração de espermatozoides) foram semelhantes aos descritos por Zambelli *et al.* (2008), em gatos domésticos, por Lueders *et al.* (2012), em leões africanos, e por Lueders *et al.* (2014), em gato-dourado asiático, sendo utilizado o mesmo método de colheita farmacológica do presente trabalho.

Tabela 1. Avaliação do sêmen colhido por sondagem uretral após aplicação de medetomidina (Cat; N=3) e por eletroejaculação (EE; N=4), em onças-pardas (*Puma concolor*)

	Cat	EE
Volume (µl)*	106,7±30,5 ^a	450,0±0,1 ^b
Concentração (espermatozoides x 10 ⁶ /mL)*	524,1±54,3 ^b	205,0±141,8 ^a
Espermatozoides por ejaculado (x 10 ⁶ spz)*	56,5±16,3 ^a	93,5±73,7 ^a
Vigor (0-5)**	3,0±0,0 ^a	3,5±0,6 ^a
Motilidade espermática (%)*	70,0±0,0 ^a	75,0±13,0 ^a
Espermatozoides patológicos*	59,5±7,8 ^a	53,9±15,5 ^a

Dados apresentados em média±desvio-padrão.

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna são diferentes (P<0,05) pelo *teste t ou **Wilcoxon

O volume pequeno e a elevada concentração espermática na colheita farmacológica (Cat) de sêmen podem indicar ausência ou presença mínima de líquido seminal (Zambelli *et al.*, 2008). A EE, por sua vez, por estimular a contração das glândulas sexuais acessórias, resulta na liberação de grande quantidade de líquido seminal no ejaculado, sendo necessária, na maioria das vezes, a centrifugação do ejaculado, para corrigir a concentração, e a retirada do plasma seminal (Ball, 1986). Além disso, diferentes fatores também podem determinar falhas no fechamento do colo da vesícula urinária durante o método da eletroejaculação, possibilitando a contaminação das amostras por urina – tóxica para os espermatozoides –, além de ejaculação retrógrada (Howard, 1999), sendo a contaminação por urina o principal problema na eletroejaculação de felinos (Morato *et al.*, 1998). Esse problema foi contornado, no presente trabalho, por meio da lavagem da vesícula urinária previamente ao procedimento de colheita por EE, porém, ainda assim, as amostras são bem mais diluídas em relação à Cat.

Os parâmetros de qualidade espermática – vigor, motilidade e morfologia – não diferiram entre os métodos (3,0±0,0^a vs. 3,5±0,6^a; 70,0±0,0^a vs. 75,0±13,0^a; e 59,5±7,8^a vs. 53,9±15,5^a, P>0,05). De forma semelhante, Zambelli *et al.* (2008) também não encontraram diferenças entre a qualidade espermática e a congelabilidade do sêmen colhido por Cat e por EE. Esses resultados demonstram que o procedimento de colheita farmacológica por meio de sondagem uretral após administração de medetomidina não prejudica a qualidade seminal.

A metodologia de colheita de sêmen proposta facilitou a logística do trabalho, por permitir a colheita de amostras com alta concentração de

espermatozoides e baixa concentração de líquido prostático, dispensando o uso da centrífuga, e principalmente por se tratar de um procedimento muito mais rápido e prático que a metodologia da eletroejaculação, permitindo a aplicação para captação de sêmen de forma eficiente em ações *in situ*. Outra vantagem do protocolo anestésico proposto para a colheita de sêmen foi a reversão dos efeitos da medetomidina após aplicação do atipamezole, diminuindo substancialmente o tempo despendido no manejo do animal. Dessa forma, a associação da cetamina com a medetomidina aparece como um protocolo anestésico indicado para sedação de onças-pardas independentemente da intenção de colheita de sêmen.

CONCLUSÃO

O método de colheita farmacológica de sêmen usando a medetomidina permite a colheita de amostras de sêmen com concentração superior à eletroejaculação sem perda da qualidade de movimentação ou mesmo sem influência sobre a morfologia espermática, dispensando o uso do eletroejaculador, facilitando assim, a colheita e o processamento de sêmen de animais *in situ*, por meio de um protocolo de contenção química seguro e eficaz.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, à Fapemig e à Fundect, pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsas de estudos a eles. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, G.R.; PAULA, T.A.R.; DECO-SOUZA, T. *et al.* Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. *Anim. Reprod. Sci.*, v.195, p.1-7, 2018.
- BALL, L. Electroejaculation. In: KLEMM, W.R. (Ed.). *Applied electronics for veterinary medicine and animal physiology*. Springfield: Charles C. Thomas, 1986. p.395-441.
- CRAWSHAW JR., P.G. Recommendations for study design on research projects on neotropical felids. In: MONDOLFI, E. *Felinos de Venezuela: biología, ecología y conservación*. Caracas: Fudeci, 1991. p.187-222.
- DECO T.S.; PAULA T.A.R.; COSTA D.S. *et al.* Coleta e avaliação de sêmen de puma (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos mantidos em cativeiro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.34, p.252-259, 2010.
- DOOLEY, M.P.; PINEDA, M.H.; HOPPER, J.G.; HSU, W.H. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of dogs during ejaculation or after sedation with xylazine. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, p.1574-1579, 1990.
- ELCOCK, L.H.; SCHONING, P. Age-related changes in the cat testis and epididymis. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, p.2380-2384, 1984.
- HOWARD, J.G. Assisted reproductive techniques in non-domestic carnivores. In: FOWLER, M.E.; MILLER, R.E. (Eds.). *Zoo and wild animal medicine*. Toronto: Elsevier, 1999. p.449-457.
- KHEIRKHAH, M.S.; MOHAMMADSADEGH, M.; MOSLEMI, H.R. Sperm evaluation of Jungle Cat (*Felis chaus*) obtained by urethral catheterization (CT) after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.91, p.17-20, 2017.
- LUEDERS, I.; LUTHER, I.; SCHEEPERS, G.; VAN DER HORST, G. Improved semen collection method for wild felids: urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). *Theriogenology*, v.78, p.696-701, 2012.
- LUEDERS, I.; LUDWIG, C.; SCHROEDER, M. *et al.* Successful nonsurgical artificial insemination and hormonal monitoring in an Asiatic golden cat (*Catopuma temmincki*). *J. Zoo Wildl. Med.*, v.45, p.372-379, 2014.
- CBRA (Colégio Brasileiro Reprodução Animal). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013.104p.
- MOENS, Y.; LANZ, F.; DOHERR, M.G.; SCHATZMANN, U. A comparison of the antinociceptive effects of xylazine, detomidine and romifidine on experimental pain in horses. *Vet. Anaesth. Analg. Davis*, v.30, p.183-190, 2003.
- MORATO, R.G.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; NUNES, A.L.V. *et al.* Colheita e avaliação espermática em onça pintada. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.35, p.198-201, 1998.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 172p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 76, de 27 de junho de 2014. Plano de ação nacional para a conservação da onça parda. PAN Onça parda. <[http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-onca parda/portaria-onca-parda-76-2014.pdf](http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-onca%20parda/portaria-onca-parda-76-2014.pdf)>.
- PROCHOWSKA, S.; NIZANSKI, W.; OCHOTA, M.; PARTYKA, A. Effect of dilution rate on feline urethral sperm motility, viability, and DNA integrity. *Theriogenology*, v.82, p.1273-1280, 2014.
- SILINSKI, S.; WALZER, C.; SCHWARZENBERGER, F. *et al.* Pharmacological methods of enhancing penile erection for ex-copula semen collection in standing white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Eur. Assoc. Zoo Wildl. Vet.*, p.391-394, 2002.
- TURNER, R.M.O.; MCDONNELL, S.M.; HAWKINS, J.F. Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen from stallion with a fractured radius. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.12, p.1906-1908, 1995.
- ZAMBELLI, D.; CUNTO, M.; PRATI, F.; MERLO, B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology*, v.68, p.796-803, 2007.
- ZAMBELLI, D.; PRATI, F.; CUNTO, M. *et al.* Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.69, p.485-490, 2008.
- ZAMBELLI, D.; RACCAGNI, R.; CUNTO, M. *et al.* Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology*, v.74, p.1396-1402, 2010.