

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIEFERSON DA COSTA ESTRELA

PARÂMETROS ANDROLÓGICOS E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM  
ONÇA-PARDA (*Puma concolor* - LINNAEUS, 1771) E JAGUARUNDI (*Puma*  
*yagouarundi* - É. GEOFFROY SAINT-HILAIRE, 1803)

CURITIBA

2022

DIEFERSON DA COSTA ESTRELA

PARÂMETROS ANDROLÓGICOS E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM  
ONÇA-PARDA (*Puma concolor* - LINNAEUS, 1771) E JAGUARUNDI (*Puma  
yagouaroundi* - É. GEOFFROY SAINT-HILAIRE, 1803)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção  
do grau de Doutor em Zoologia, no Programa de  
Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Nei Moreira

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estrela, Dieferson da Costa

Parâmetros andrológicos e criopreservação de sêmen em onça-parda (*Puma concolor* – Linnaeus, 1771) e jaguarundi (*Puma yagouaroundi* – É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) / Dieferson da Costa Estrela. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Nei Moreira.

1. Felideo. 2. Sêmen - Criopreservação. I. Moreira, Nei, 1966-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. III. Título.

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DIEFERSON DA COSTA ESTRELA** intitulada: **PARÂMETROS ANDROLÓGICOS E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM ONÇA-PARDA (Puma concolor - LINNAEUS, 1771) E JAGUARUNDI (Puma yagouarundi - É. GEOFFROY SAINT-HILAIRE, 1803)**, sob orientação do Prof. Dr. NEI MOREIRA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 04 de Julho de 2022.

Assinatura Eletrônica  
05/07/2022 10:37:02.0  
NEI MOREIRA  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
05/07/2022 12:42:44.0  
EMYGDIO LEITE DE ARAUJO MONTEIRO FILHO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
07/07/2022 15:46:02.0  
REGINA CELIA RODRIGUES DA PAZ  
Avaliador Externo (55001108)

Assinatura Eletrônica  
05/07/2022 13:29:28.0  
ALEXANDRE RODRIGUES SILVA  
Avaliador Externo (22003010)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à minha família, minha mãe Rosângela Estrela, minha esposa Bruna Estrela e meu filho João Vicente Estrela que ao longo do curso de doutorado me apoiaram incondicionalmente, deram estímulos em momentos difíceis e conviveram com tantas ausências em função de atividades do doutorado. Agradeço especialmente à minha esposa, que além de todo suporte familiar e carinho colaborou diretamente no estudo em algumas coletas, na concepção de ideias e análise de dados, obrigado meu amor!

Ao meu avô Antonio de Oliveira, que me inspirou desde muito jovem a conhecer os encantos da natureza e da fauna, tendo papel importante na minha escolha pela zoologia, que agora se concretiza com o título de doutor em Zoologia, obrigado Vô!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nei Moreira, que me acolheu no Programa de Pós-Graduação em Zoologia na UFPR (PPG-Zoo), me orientou em diversos momentos e contribuiu para a concretização deste estudo;

Aos docentes do PPG-Zoo, que contribuíram sobremaneira com meu aprendizado e crescimento como zoólogo. Poder participar de momentos tão ricos de aprendizado com os senhores foi um prazer enorme, obrigado professores!

Ao Comitê de Acompanhamento, composto pelos Professores Doutores: Emygdio Leite de Araujo Monteiro Filho, Antônio Campanha Martinez e Renato Herdina Erdmann por todo apoio na condução dos experimentos e os conhecimentos teóricos que me proporcionaram;

Aos colegas da Associação Mata Ciliar (AMC), que foram essenciais na condução das coletas e proporcionaram um acolhimento único, mesmo em meio a tantas dificuldades que enfrentam diariamente na nobre função de receber e realizar a triagem e reabilitação de tantos animais silvestres. Agradeço em especial à Dra. Cristina Harumi Adania, que coordena a fauna da AMC e me recebeu de portas abertas, tornando esse estudo possível;

Agradeço à Ma. Amanda Tanamachi, Profa. Dra. Daisy Salvadori, Prof. Dr. Guilherme Malafaia e Prof. Dr. Antônio Campanha Martinez, que contribuíram com a realização de análises, doaram reagentes, contribuíram intelectualmente e disponibilizaram a infraestrutura de seus laboratórios para que partes desse estudo

fossem realizadas na UNESP Campus de Botucatu, IF Goiano – Campus Urutaí e UEM Campus regional de Umuarama;

Ao Prof. Dr. Wemerson de Oliveira (IFSul – Campus Lajeado) e o Dr. Hans Froder (Univates – Lajeado), que contribuíram intelectualmente e na realização de algumas análises ligadas ao microbioma seminal e uretral, tema interessante desta tese e que foi possível graças ao apoio destes amigos;

Aos colegas da minha antiga instituição, IFSul Campus Avançado Jaguarão, na qual estive na maior parte do Doutorado e pude contar com a compreensão e apoio dos colegas e gestores que apoiaram o desenvolvimento deste estudo;

À CAPES, UFPR e o PPG-Zoo que me proporcionaram um ambiente inspirador e uma formação de nível elevadíssimo, além de financiar parte do estudo por meio de verbas PROAP e uma bolsa de estudos durante parte do Doutorado. Em especial ao PPG-Zoo, que me proporcionou excelente formação e estímulos a ser um pesquisador de alto nível em prol da zoologia no futuro;

Ao IFSul Campus Avançado Jaguarão, que proporcionou parte da infraestrutura utilizada em algumas análises e financiou parte do estudo;

À Botupharma, pela doação dos produtos BotuSêmen® GOLD, BotuBOV®, BotuCRIO®, BotuDOG® e BotuBOX®, que foram testados neste estudo e possibilitaram avanços importantes na busca por técnicas de reprodução assistida.

## RESUMO

A onça-parda (*Puma concolor*) e o jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) são felídeos com ampla distribuição geográfica e considerados vulneráveis em território brasileiro. Estas espécies carecem de estudos sobre sua biologia reprodutiva e reprodução assistida, sobretudo com amostragens em populações pouco estudadas. Diante disso, o presente estudo teve os seguintes objetivos: i) avaliar um protocolo de coleta de sêmen via cateterização uretral em jaguarundi; ii) descrever o microbioma seminal e uretral de jaguarundi; iii) comparar quatro extensores para criopreservação de sêmen em ambas as espécies; iv) padronizar protocolos de ensaio cometa para avaliação de danos ao DNA em ambas as espécies; v) descrever a morfometria espermática seminal de onça-parda e jaguarundi. Machos de jaguarundi (n=8) e onça-parda (n=2) alojados na Associação Mata Ciliar, Jundiá, Brasil foram anestesiados, via intramuscular, com 0,005 mg/kg de dexmedetomidina (Dexdomitor<sup>®</sup>, Zoetis, Campinas, Brasil) associada a 10 mg/kg de cetamina (Quetamina<sup>®</sup>, Vetnil, São José dos Campos, Brasil) e foram obtidas amostras de sêmen via cateterização uretral ou eletroejaculação. Foram usados delineamentos diferentes de acordo com cada objetivo estudado. Em jaguarundi, antes de uma coleta foi realizada lavagem uretral com solução salina (0,9% NaCl) que foi utilizada junto às amostras de sêmen para cultivo e identificação do microbioma de bactérias e fungos, utilizando abordagem metagenômica e sequenciamento de nova geração. O sêmen foi refrigerado em um equipamento elétrico ou em uma caixa térmica (BotuBOX<sup>®</sup>) e, em seguida, congelado com os extensores BotuBOV<sup>®</sup>, BotuCRIO<sup>®</sup>, BotuDOG<sup>®</sup> (produtos fornecidos pela Botupharma, Botucatu, Brasil) e UEM *Cat* (Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, Brasil) todos com 4% de glicerol. Os resultados demonstraram que a técnica de cateterização uretral foi eficaz na obtenção de sêmen em jaguarundi, entretanto, foi inferior à eletroejaculação. Foi descrita a morfometria espermática seminal de jaguarundi e onça-parda. A BotuBOX<sup>®</sup> pode ser utilizada como refrigerador de forma eficiente na criopreservação de sêmen, sendo que entre os extensores avaliados, o BotuBOV<sup>®</sup> preservou maior número de células viáveis e móveis que o BotuCRIO<sup>®</sup> e UEM *Cat* em ambas as espécies. Na onça-parda, o meio BotuDOG<sup>®</sup> apresentou resultados iguais ao BotuBOV<sup>®</sup>. A partir do sêmen fresco e pós-descongelamento foram padronizados protocolos eficazes do ensaio cometa para a avaliação de danos no DNA nas espécies, sendo demonstrados os níveis basais de danos na molécula de DNA (*tail intensity*) em jaguarundi (23,68 ±9,37) e onça-parda (24,43 ±15,80). O microbioma fúngico e bacteriano presente na uretra e sêmen de jaguarundi foi caracterizado pela primeira vez, revelando uma grande diversidade de espécies principalmente representantes dos filos Ascomycota, Proteobacteria e Firmicutes. A análise do microbioma fúngico e a diversidade observada em jaguarundis alerta para a importância de avaliar quais espécies estão presentes nos animais e suas influências sobre a homeostase urogenital. A presença de um microbioma exclusivo da uretra foi apresentada, evidenciando a necessidade de se analisar as espécies que residem nas diferentes partes do sistema urogenital, a fim de compreender como as complexas interações que podem ocorrer em cada um deles afetam a qualidade seminal. Por fim, este estudo apresentou dados sobre extensores potenciais para a criopreservação de sêmen e novas abordagens sobre a avaliação da qualidade seminal e constituintes microbianos no gênero *Puma*.

Palavras-chave: Cateterização uretral. Criopreservação de sêmen. Microbioma seminal e uretral. Ensaio cometa.

## ABSTRACT

The puma (*Puma concolor*) and the jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) are felids with wide geographic distribution and considered vulnerable in Brazil. These species lack studies on their reproductive biology and assisted reproduction, especially with samplings in poorly studied populations. Therefore, the present study had the following objectives: i) to evaluate a semen collection protocol via urethral catheterization in jaguarundi; ii) describe the seminal and urethral microbiome of jaguarundi; iii) to compare four extenders for semen cryopreservation in both species; iv) standardize comet assay protocols for DNA damage assessment in both species; v) describe the seminal sperm morphometry of puma and jaguarundi. Jaguarundi (n=8) and puma (n=2) males housed at Mata Ciliar Association, Jundiá, Brazil were IM anesthetized with 0.005 mg/kg of dexmedetomidine (Dexdomitor<sup>®</sup>, Zoetis, Campinas, Brazil) associated with 10 mg/kg of ketamine (Quetamina<sup>®</sup>, Vetnil, São José dos Campos, Brazil) and semen samples were obtained via urethral catheterization or electroejaculation. Different designs were used according to each objective studied. In jaguarundi, before collection, urethral lavage with saline solution (0.9% NaCl) was performed, which was used with the semen samples for cultivation and identification of the microbiome of bacteria and fungi, using a metagenomic approach and next-generation sequencing. The semen was cooled in electrical equipment or in a thermal box (BotuBOX<sup>®</sup>) and then frozen with the extenders BotuBOV<sup>®</sup>, BotuCRIO<sup>®</sup>, BotuDOG<sup>®</sup> (products supplied by Botupharma, Botucatu, Brazil) and UEM Cat (Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, Brazil) all with 4% glycerol. The results showed that the urethral catheterization technique was effective in obtaining semen in jaguarundi, however, it was inferior to electroejaculation. The seminal sperm morphometry of jaguarundi and puma was described. BotuBOX<sup>®</sup> can be used as a refrigerator efficiently in semen cryopreservation, and among the evaluated extenders, BotuBOV<sup>®</sup> preserved a greater number of viable and mobile cells than BotuCRIO<sup>®</sup> and UEM Cat in both species. In the puma, the BotuDOG<sup>®</sup> medium presented the same results as the BotuBOV<sup>®</sup>. From fresh and post-thawed semen, effective protocols of the comet assay were standardized for the assessment of DNA damage in the species, demonstrating the baseline levels of DNA damage (tail intensity) in jaguarundi (23.68 ±9.37) and puma (24.43 ±15.80). The fungal and bacterial microbiome present in the urethra and semen of jaguarundi was characterized for the first time, revealing a great diversity of species, mainly representatives of the phyla Ascomycota, Proteobacteria and Firmicutes. The analysis of the fungal microbiome and the diversity observed in jaguarundis highlights the importance of evaluating which species are present in the animals and their influence on urogenital homeostasis. The presence of a unique microbiome of the urethra was presented, highlighting the need to analyze the species that reside in different parts of the urogenital system, in order to understand how the complex interactions that can occur in each of them affect seminal quality. Finally, this study presented data on potential extenders for semen cryopreservation and new approaches on the assessment of seminal quality and microbial constituents in the *Puma* genus.

Keywords: Urethral catheterization; Semen cryopreservation; Seminal and urethral microbiome; Comet assay.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Variação do volume testicular em cm<sup>3</sup> de jaguarundi (*Puma yagouarundi*) ao longo de seis coletas (C1-C6). São apresentados os dados dos indivíduos (n=6) que participaram do maior número de coletas..... 126
- FIGURA 2** - Fotomicrografias de diferentes padrões morfológicos de espermatozoides seminais de *Puma yagouarundi*..... 128
- FIGURA 3** - Fotomicrografias de diferentes padrões morfológicos de espermatozoides seminais de *Puma concolor*..... 129
- FIGURA 4** - Fotomicrografias de nucleoides obtidos de amostras de sêmen de *Puma concolor* e analisados pelo ensaio cometa (versões alcalina e neutra). Microscopia de fluorescência, coloração SYBR Gold®, filtro azul (330 a 385 nm), aumento de 400 X..... 142
- FIGURA 5** - Fotomicrografias de nucleoides obtidos de amostras de sêmen de *Puma yagouarundi* e analisados pelo ensaio cometa (versões alcalina e neutra). Microscopia de fluorescência, coloração SYBR Gold®, filtro azul (330 a 385 nm) e aumento de 400 X..... 143

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
CU	Cateterização uretral
CU-EEJ	Cateterização uretral seguida de eletroejaculação
DP	Desvio-padrão
dsDB	Quebras de fitas duplas do DNA
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEJ	Eletroejaculação
FAP	Fator de ativação plaquetária
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
IM	Intramuscular
IME	Índice de motilidade espermática
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
KDA	Quilodalton
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIV	Produção <i>in vitro</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS)
ssDB	Quebras de fita simples do DNA
TRAs	Técnicas de reprodução assistida
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i> (TdT) dUTP Nick-End Labeling

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 -</b>	Resumo de avaliações biométricas e espermáticas de machos de <i>Puma concolor</i> e <i>Puma yagouaroundi</i> compilados de estudos publicados.....	78
<b>TABELA 2 -</b>	Parâmetros seminais (média $\pm$ DP) avaliados em amostras obtidas por Cateterização Uretral (CU) seguida de eletroejaculação ou exclusivamente por eletroejaculação em jaguarundi ( <i>Puma yagouaroundi</i> ) provenientes da Associação Mata Ciliar, Jundiá, Brasil.....	89
<b>TABELA 3 -</b>	Comparação entre resultados de coleta de sêmen por cateterização uretral em diferentes espécies de felídeos selvagens.....	92
<b>TABELA 4 -</b>	Parâmetros seminais (média $\pm$ desvio padrão) de amostras frescas e pós-descongelamento de <i>Puma yagouaroundi</i> (n=7) e <i>Puma concolor</i> (n=2), obtidas por eletroejaculação.....	127
<b>TABELA 5 -</b>	Percentuais médios $\pm$ DP de diferentes tipos de anormalidades espermáticas observadas em <i>Puma yagouaroundi</i> e <i>Puma concolor</i> .....	130
<b>TABELA 6 -</b>	Descrição morfométrica de espermatozoides seminais de <i>Puma yagouaroundi</i> e <i>Puma concolor</i> comparados a espermatozoides epididimais de <i>P. concolor</i> (Cucho et al. 2016).....	130
<b>TABELA 7 -</b>	Parâmetros seminais (média $\pm$ desvio padrão) de amostras frescas e pós-descongelamento de <i>Puma concolor</i> (n=2) e <i>Puma yagouaroundi</i> (n=7).....	140
<b>TABELA 8 -</b>	Porcentagem de danos ( <i>tail intensity</i> ) no DNA (média $\pm$ desvio padrão) em amostras de sêmen frescas e criopreservadas de <i>Puma concolor</i> (n=2) e <i>Puma yagouaroundi</i> (n=7).....	144
<b>TABELA 9 -</b>	Parâmetros andrológicos e número de <i>taxa</i> bacterianos e fúngicos detectados em indivíduos de <i>Puma yagouaroundi</i> (n=5). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP).	177

<b>TABELA 10</b> - Espécies detectadas em amostras de lavado uretral, sêmen, e sêmen contaminado com urina da espécie <i>Puma yagouaroundi</i> (n=5).....	179
---	-----

## SUMÁRIO

	<b>PRÓLOGO</b> .....	15
<b>1</b>	<b>CAPÍTULO 1 BIOLOGIA REPRODUTIVA E ANDROLOGIA DO GÊNERO <i>Puma</i></b> .....	18
	RESUMO.....	19
	DESTAQUES.....	20
1.1	INTRODUÇÃO.....	21
1.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
1.3	GENÉTICA E ENDOGAMIA.....	24
1.4	BIOLOGIA REPRODUTIVA.....	31
1.5	MONITORAMENTO ENDÓCRINO.....	35
1.6	REPRODUÇÃO ASSISTIDA.....	38
1.6.1	Coleta de sêmen.....	38
1.6.2	Morfologia e morfometria espermática.....	42
1.6.3	Criopreservação do sêmen.....	44
1.7	ABORDAGENS “ÔMICAS” E MULTI-ÔMICAS.....	46
1.8	PLASMA SEMINAL.....	53
1.9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
1.10	FINANCIAMENTO.....	57
1.11	REFERÊNCIAS.....	57
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DE SÊMEN OBTIDO POR CATETERIZAÇÃO URETRAL E ELETROEJACULAÇÃO EM JAGUARUNDI (<i>Puma yagouarondi</i>)</b> .....	80
	DESTAQUES.....	81
	RESUMO.....	82
2.1	INTRODUÇÃO.....	83
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
2.2.1	Animais e questões éticas.....	84
2.2.2	Protocolo anestésico e desenho experimental.....	85
2.2.3	Cateterização uretral.....	85
2.2.4	Avaliação seminal.....	86
2.2.5	Análises microscópicas.....	86

2.2.6	Tratamento estatístico.....	87
2.3	RESULTADOS.....	87
2.4	DISCUSSÃO.....	90
2.5	CONCLUSÃO.....	97
2.6	AGRADECIMENTOS.....	98
2.7	REFERÊNCIAS.....	98
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 3 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E MORFOMETRIA ESPERMÁTICA DE ONÇA-PARDA (<i>Puma concolor</i>) E JAGUARUNDI (<i>Puma yagouaroundi</i>).....</b>	<b>103</b>
	DESTAQUES.....	104
	RESUMO.....	105
3.1	INTRODUÇÃO.....	106
3.2	MATERIAL E METODOS.....	108
3.2.1	Animais e questões éticas.....	108
3.2.2	Coleta e criopreservação do sêmen.....	109
3.2.3	Morfologia e morfometria espermática.....	111
3.2.4	Tratamento estatístico.....	112
3.3	RESULTADOS.....	112
3.3.1	Exame andrológico e coleta de sêmen.....	112
3.3.2	Criopreservação de sêmen.....	115
3.3.3	Morfologia e morfometria espermática.....	115
3.4	DISCUSSÃO.....	116
3.5	CONCLUSÕES.....	120
3.6	AGRADECIMENTOS.....	120
3.7	FINANCIAMENTO.....	120
3.8	REFERÊNCIAS.....	121
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 4 - UTILIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA AVALIAÇÃO DO DNA DE SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO DE FELÍDEOS DO GÊNERO <i>Puma</i>.....</b>	<b>132</b>
	DESTAQUES.....	133
	RESUMO.....	134
4.1	INTRODUÇÃO.....	134
4.2	MATERIAL E METODOS.....	136

4.2.1	Animais e questões éticas.....	136
4.2.2	Coleta e criopreservação do sêmen.....	137
4.2.3	Ensaio cometa.....	138
4.2.4	Análise estatística.....	139
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	139
4.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	146
4.5	AGRADECIMENTOS.....	147
4.6	REFERÊNCIAS.....	147
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 5 - MICROBIOMA SEMINAL E URETRAL DE ONÇA-PARDA (<i>Puma concolor</i>) E GATO-MOURISCO (<i>Puma yagouaroundi</i>).....</b>	<b>150</b>
	RESUMO.....	152
5.1	INTRODUÇÃO.....	153
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	156
5.2.1	Animais e questões éticas.....	156
5.2.2	Lavagem uretral e coleta de sêmen.....	157
5.2.3	Sequenciamento de alto desempenho ( <i>Next-Generation Sequencing</i> - NGS) .....	157
5.2.4	Análises seminais.....	160
5.2.5	Tratamento estatístico.....	160
5.3	RESULTADOS.....	161
5.4	DISCUSSÃO.....	163
5.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	170
5.6	REFERÊNCIAS.....	171
	<b>EPÍLOGO.....</b>	<b>182</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>185</b>

## PRÓLOGO

A conservação de espécies ameaçadas de extinção é um campo multidisciplinar, que depende de estratégias e resultados sob diferentes perspectivas para se obter planos de manejo que contribuam efetivamente para conservar tais espécies. O conhecimento sobre a biologia reprodutiva das espécies e a aplicação de Técnicas de Reprodução Assistida (TRAs) possui grande importância para a conservação, sendo que em geral cada espécie possui atributos próprios e demanda adaptações das TRAs para que se obtenha a eficiência desejada.

Neste estudo, foram avaliadas TRAs ligadas à criopreservação de sêmen e descritos alguns aspectos da biologia reprodutiva de jaguarundi [*Puma yagouaroundi* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803)] e onça-parda [*Puma concolor* (Linnaeus, 1771)], ambas ameaças de extinção no território brasileiro, sendo os únicos representantes vivos do gênero *Puma*. Tais espécies possuem poucos estudos envolvendo a criopreservação de sêmen, sendo necessário avaliar diferentes protocolos e obter, a partir das novas tecnologias disponíveis, conhecimentos sobre a biologia reprodutiva que contribuam para o refinamento do manejo das espécies.

Diante disso, no Capítulo 1 desta tese é apresentada uma revisão sistemática sobre a biologia reprodutiva e reprodução assistida de machos de jaguarundi e onça-parda. A partir dos dados apresentados, nota-se a carência de estudos sobre alguns pontos da biologia reprodutiva e reprodução assistida nas espécies. Além disso, são apresentadas novas tecnologias e abordagem que possibilitam investigações aprofundadas, em nível molecular, que apresentam potencial para refinar o conhecimento sobre a biologia reprodutiva e TRAs no gênero *Puma*. A partir dessa revisão geral sobre o gênero, alguns problemas de pesquisa foram observados, os quais motivaram ensaios e estudos apresentados nos quatro capítulos seguintes.

Foi observado que, apesar da eletroejaculação (EEJ) ser o método mais usado para coleta de sêmen, um recente e promissor método chamado cateterização uretral (CU) havia sido superficialmente testado em jaguarundi e não havia sido feita comparação direta com a eletroejaculação. Dessa forma, se a CU é indicada como substituta da EEJ, mas ambas não foram comparadas em jaguarundis e outras espécies, evidencia-se uma lacuna de conhecimento. A partir desse problema de pesquisa, foi testado no capítulo 2 a hipótese de que a CU

poderia fornecer amostras de sêmen em maior concentração e reduzido volume, sendo observados índices qualitativos superiores à EEJ.

No jaguarundi, e em menor proporção na onça-parda, foi evidenciada uma expressiva carência de estudos com criopreservação de sêmen, técnica base para diversas TRA's. Mesmo na onça-parda, os poucos extensores avaliados até o presente apresentaram eficiências moderadas na criopreservação de sêmen. Diante disso, a busca de extensores que se adequem ao sêmen do jaguarundi e elevem a eficiência já conhecida na onça-parda são necessários. Frente a esse problema, foi conduzida avaliação da eficiência de quatro meios de criopreservação de espermatozoides, com concentração igual de glicerol, nas duas espécies (Capítulo 3).

Após a criopreservação ou mesmo em amostras frescas de sêmen a integridade do DNA do espermatozoide é um atributo indispensável para a fertilização. Apesar disso, não foi encontrado nenhum estudo que avaliou a integridade do DNA das espécies do gênero *Puma*, seja em amostras frescas ou criopreservadas. As amostras frescas podem oferecer uma referência de qual a taxa basal de danos ao DNA natural da espécie. Por outro lado, diferentes composições de extensores podem resultar em incremento de danos em amostras criopreservadas. A partir disso, no Capítulo 4 foi realizada padronização de protocolos do ensaio cometa para avaliar danos ao DNA em ambas as espécies e comparadas as influências de dois meios de criopreservação sobre tais danos.

Além das análises diretamente ligadas às TRA's avaliadas nos capítulos já citados, foi constatado que o microbioma seminal e uretral não havia sido descrito. O microbioma é um componente da biologia reprodutiva que pode afetar diretamente a reprodução e TRA's, de modo que não conhecer se existe uma flora seminal e uretral, bem como quais microrganismos fazem parte dela é uma lacuna de conhecimento. A influência dos diferentes microrganismos presentes no sêmen e uretra sobre a reprodução dos machos é uma lacuna secundária importante, que só poderá ser avaliada a partir do conhecimento da flora observada nos animais.

Visando contribuir para sanar tais lacunas, no Capítulo 5 foi testada a hipótese que os jaguarundis possuem uma flora de bactérias e fungos no sêmen e uretra, assim como a flora do sêmen e uretra são parcialmente diferentes em composição de espécies. No capítulo 5 é descrita a composição de fungos e bactérias do microbioma seminal e uretral do jaguarundi.

Os resultados destes estudos possibilitaram avaliar técnicas ligadas diretamente ao congelamento do sêmen e foram descritos parâmetros da biologia reprodutiva como a microbiota seminal e uretral, morfometria espermática seminal e a taxa basal de danos ao DNA do espermatozoide. Os dados obtidos nesta tese agregam técnicas clássicas de análise seminal e novas, que juntas podem contribuir para o refinamento do manejo reprodutivo e TRAs de jaguarundi e onça-parda. Nos capítulos a seguir serão apresentados os dados aqui mencionados, sendo que os capítulos se encontram formatados de acordo com as diretrizes para autores de diferentes periódicos e serão traduzidos para a língua inglesa para submissão.

**CAPÍTULO 1**  
**BIOLOGIA REPRODUTIVA E ANDROLOGIA DO GÊNERO *Puma***

Formatado segundo as diretrizes do periódico *Animal Reproduction Science*.

## 1 **Biologia reprodutiva e andrologia do gênero *Puma***

2

3

4

Dieferson da Costa Estrela<sup>1</sup>, Nei Moreira<sup>2</sup>

5

6 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná,  
7 Paraná, Brasil. Instituto Federal do Triângulo Mineiro – Campus Uberlândia, Minas  
8 Gerais, Brasil. E-mail: [diefersonestrela@gmail.com](mailto:diefersonestrela@gmail.com)

9 <sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Biociências,  
10 Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil.

11

12

### 13 RESUMO

14 O gênero *Puma* é composto por duas espécies com ampla distribuição  
15 geográfica no novo mundo, sendo que a onça-parda (*Puma concolor*) é um dos  
16 felídeos mais estudados do mundo, enquanto o jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) é  
17 um dos menos conhecidos, com muitas lacunas de conhecimento. Apesar da onça-  
18 parda ser mais estudada, o conhecimento concentra-se em alguns tópicos e poucas  
19 populações, restando muitas perguntas sobre sua reprodução. Nesta revisão será  
20 apresentado o conhecimento encontrado sobre a biologia reprodutiva, reprodução  
21 assistida e o monitoramento endócrino e genético das espécies. Também são  
22 indicadas algumas carências de estudos nesses campos da ciência e perspectivas  
23 que podem aprimorar o conhecimento sobre estes felídeos, por meio de técnicas  
24 básicas ou de alta resolução, como as abordagens “ômicas”. De modo geral, ambas  
25 as espécies carecem de estudos sobre a biologia reprodutiva e reprodução assistida,

26 sobretudo com maior cobertura de sua distribuição geográfica. Está clara a diferença  
27 genética entre populações de onça-parda nos EUA e latino-americanas, mas os  
28 estudos apresentam grande concentração em poucas populações. Para o jaguarundi  
29 os poucos estudos disponíveis indicam alta diversidade genética entre os indivíduos,  
30 mas poucas diferenças entre populações distantes. Finalmente, acredita-se que um  
31 melhor conhecimento sobre os constituintes do plasma seminal como proteínas,  
32 lipídeos, carboidratos, microbioma e suas relações com o espermatozoide,  
33 possibilitará o aprimoramento das técnicas de reprodução assistida.

34

35 Palavras-chave: reprodução assistida; criopreservação de sêmen; microbioma  
36 seminal; cateterização uretral; onça-parda; jaguarundi.

37

### 38 **Destaques**

39 - A variação genética da onça-parda foi subamostrada em sua extensão de  
40 ocorrência

41 - O jaguarundi apresenta grande similaridade genética entre populações

42 - A biologia reprodutiva do gênero *Puma* é relativamente conhecida, mas existe  
43 grande carência de monitoramento hormonal reprodutivo

44 - A onça-parda apresenta mais estudos de reprodução assistida que o jaguarundi,  
45 mas ambos foram pouco estudados

46 - Novas abordagens como as ciências ômicas podem contribuir para compreender o  
47 metabolismo reprodutivo do gênero *Puma*

48

49

50

## 51 1 INTRODUÇÃO

52

53 O gênero *Puma* Jardine (1834) da família Felidae é composto por duas  
54 espécies, onça-parda [*Puma concolor* (Linnaeus, 1771)] e jaguarundi [*Puma*  
55 *yagouaroundi* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803)], ambas com ampla distribuição no  
56 Continente Americano. Em nível global as duas espécies estão em declínio  
57 populacional, mas são classificadas como menos preocupante (*Least concern*) pela  
58 *International Union for Conservation of Nature* – IUCN (Caso et al. 2015, Nielsen et  
59 al. 2015). Por outro lado, no território brasileiro essas espécies são consideradas  
60 com algum grau de risco, sendo consideradas na categoria Vulnerável (Brasil 2018)).

61 A taxonomia e posição filogenética destas espécies sofreu modificações ao  
62 longo da história, sendo que a onça-parda já foi alocada no gênero *Felis* e o  
63 jaguarundi nos gêneros *Felis* e *Herpailurus* (Almeida et al. 2013). Contudo, a robusta  
64 filogenia de Johnson et al. (2006) confirmou a classificação das duas espécies no  
65 gênero *Puma* com grande suporte, a partir de genes autossômicos, mitocondriais e  
66 dos cromossomos (22.789,00 pares de base). Estas unem-se à chita (*Acinonyx*  
67 *jubatus*) para formar a linhagem puma, que divergiu há aproximadamente 6,7  
68 milhões de anos do clado formado pelas linhagens do gato-doméstico (*Felis catus*) e  
69 gato-leopardo (*Prionailurus bengalensis*) (Johnson et al. 2006).

70 A principal hipótese biogeográfica da evolução do gênero *Puma* indica que  
71 um ancestral proveniente da Eurásia atravessou o estreito de Bering entre 8,5 e 8  
72 milhões de anos atrás e colonizou a América do Norte, onde a onça-parda e o  
73 jaguarundi diferenciaram-se de outras linhagens (Johnson et al. 2006). A distribuição  
74 das duas espécies por todo o continente americano foi possível após o surgimento  
75 do Istmo do Panamá há aproximadamente 2,7 milhões de anos (Johnson et al.

76 2006). Contudo, acredita-se que as populações norte-americanas atuais sejam fruto  
77 de recolonização a partir de indivíduos vindos da América do Sul (Saremi et al.  
78 2019).

79 A ampla distribuição destas espécies no continente americano gerou  
80 considerável número de populações relativamente isoladas, sendo muitas  
81 consideradas subespécies (Currier 1983, Oliveira 1998). A variação entre algumas  
82 populações e seus próprios estados de risco de extinção são abordados nessa  
83 revisão, focando principalmente em diferenças de variabilidade genética e  
84 reprodutivas conhecidas. Contudo, os estudos disponíveis amostraram apenas  
85 algumas poucas populações que se mostraram geneticamente diferentes entre si.  
86 Futuros estudos que realizem amostragens contemplando toda a área de ocorrência  
87 podem evidenciar novas populações geneticamente diferentes ou evidenciar um  
88 gradiente genético entre as populações.

89 A reprodução assistida tem um importante papel na conservação destas  
90 espécies, combinando criobancos de sêmen e técnicas de inseminação ou  
91 fertilização *in vitro*, o que possibilita armazenar recursos genéticos de indivíduos  
92 cativos ou de vida livre e utilizar estes recursos em prol da conservação das  
93 populações ameaçadas (Kochan et al. 2019, Müller et al. 2020). Contudo, apesar do  
94 grande potencial das técnicas de reprodução assistida (TRAs), uma série de  
95 limitações ainda permeiam sua utilização.

96 A capacidade fertilizante do sêmen após a criopreservação é inferior em  
97 comparação ao fresco, pois possui menor potencial para fertilizar em inseminação  
98 vaginal não cirúrgica, plasma seminal ausente ou altamente diluído, potencial  
99 interferência dos ingredientes dos meios sob as propriedades naturais do  
100 espermatozoide, além da menor longevidade do esperma após o descongelamento

101 (Müller et al. 2020). Dessa forma, ainda são necessárias investigações que busquem  
102 primeiramente compreender melhor a biologia reprodutiva das espécies e, em  
103 seguida, que sejam aplicados estes conhecimentos para aprimorar as TRAs,  
104 possibilitando avanços na sua utilização em diferentes contextos.

105 Como apresentado nos tópicos seguintes, o gênero *Puma* possui duas  
106 espécies com perfis diferentes em termos de conhecimento científico, sendo a onça-  
107 parda um dos felídeos mais estudados; e o jaguarundi um dos menos conhecidos.  
108 Do ponto de vista da reprodução assistida, são relatados os estudos encontrados,  
109 evidenciando que essas espécies possuem poucos estudos. Apresentamos também  
110 perspectivas de novas abordagens analíticas do sêmen como as ciências “ômicas”,  
111 análises de danos ao DNA, indicamos carências no conhecimento sobre aspectos  
112 reprodutivos e possíveis biotécnicas com potencial utilização nestes felídeos.

113

## 114 2 MATERIAL E MÉTODOS

115

116 Foram realizadas pesquisas nas bases PubMed, Google Acadêmico, Scielo,  
117 Scopus. Periódicos CAPES e Science Direct com as palavras-chave: “*Felis*  
118 *yaguarundi*”, “*Felis yagouarundi*”, “*Puma yagouaroudi*”, “yagouaroundi” “jaguarundi”,  
119 “gato-mourisco”, “*Felis concolor*”, “*Puma concolor*”, “concolor”, “puma”, “*Florida-*  
120 *panther*”, “*cougar*”, “*mountain lion*”, “onça-parda”, “suçuarana” e “leão-baio”.

121 Dos 260 estudos encontrados sobre as duas espécies que apresentavam  
122 uma das palavras-chave foram escolhidos 96 que abordavam algum tópico  
123 relacionado à taxonomia, biologia reprodutiva, genética de populações,  
124 monitoramento endócrino ligado à reprodução, técnicas de reprodução assistida,  
125 caracterização do plasma seminal e abordagens “ômicas”. Os estudos selecionados

126 apresentavam foco na reprodução no macho, tema desta revisão. São apresentados  
127 alguns dados ligados à reprodução de fêmeas, contudo, foram selecionados apenas  
128 os que foram julgados mais importantes para compreender os aspectos da  
129 reprodução dos machos, sem o objetivo de apresentar uma revisão sobre as  
130 fêmeas.

131 Nesse estudo também são apresentadas perspectivas futuras para estudos  
132 envolvendo o gênero *Puma*, com métodos e técnicas promissoras já avaliados em  
133 outros mamíferos. Tais perspectivas foram baseadas em estudos com outras  
134 espécies, e foram obtidos por meio de pesquisas nas mesmas bases de dados  
135 mencionadas anteriormente, com palavras-chave ligadas a cada tópico.

136

### 137 3 GENÉTICA E ENDOGAMIA

138

139 O monitoramento genético de algumas populações de onça-parda forneceu  
140 resultados importantes para o manejo da espécie, sendo encontrados 36 estudos  
141 sobre o tema. A onça-parda é uma das espécies mais estudadas sobre diversidade  
142 genética e endogamia, porém, até o momento apenas o estudo de Moreno et al.  
143 (2006) amostrou jaguarundis, restando uma grande lacuna sobre a espécie. A  
144 distribuição geográfica dos estudos com genética da onça-parda é bastante  
145 desigual, com muitos estudos nos EUA e poucos sobre populações latino-  
146 americanas. Do ponto de vista reprodutivo, diferenças entre as populações dos EUA  
147 e latinas foram evidenciadas por Barone et al. (1994<sup>a</sup>), tendo provável relação com a  
148 menor diversidade genética nos EUA.

149 A onça-parda da Flórida (*P. concolor coryi*) é a população com maior número  
150 de estudos e considerada a mais afetada pela depressão endogâmica causada pela

151 severa contração demográfica, o que resultou em um nível notavelmente baixo de  
152 diversidade genética (Roelke et al. 1993). A baixa variabilidade genética resultou em  
153 maior prevalência de defeitos nos espermatozoides, criptorquidia, anormalidades  
154 cardíacas e doenças infecciosas que ameaçam a sobrevivência da subespécie  
155 (Roelke et al. 1993, Mansfield & Land 2002). Barone et al. (1994<sup>a</sup>) compararam  
156 diferentes populações de onça-parda nos EUA e América Latina e observaram que a  
157 da Flórida possuía maior percentual de anormalidades nos espermatozoides, bem  
158 como menores valores de motilidade e concentração espermáticas, e de volume  
159 seminal e testicular.

160 A população de onça-parda da Flórida foi monitorada quanto à presença de  
161 criptorquidia entre 1972 e 2001, sendo observada em 49% (24/49) dos animais  
162 (Mansfield & Land 2002). Barone et al. (1994<sup>a</sup>) registraram 43,8% (7/16) de  
163 criptorquidia unilateral na onça-parda da Flórida, enquanto em outras populações foi  
164 observado 3,9% de criptorquidia (2/51). Os testículos retidos pesavam menos que os  
165 testículos escrotados com um peso médio ( $\pm$ DP) de  $3,5 \pm 0,8$  g (n=8) e  $9,1 \pm 1,6$  g  
166 (n=10), respectivamente (Mansfield & Land 2002). O descenso de ambos os  
167 testículos ocorreu entre 2 e 13 meses de idade (Mansfield & Land 2002).

168 O estudo avaliou a hipótese de que a incidência de criptorquidia era fruto da  
169 endogamia, sendo realizada a introdução de fêmeas de outra população em 1995, o  
170 que resultou em progênie das fêmeas introduzidas sem nenhum caso de  
171 criptorquidia, confirmando a hipótese (Mansfield & Land 2002). Maehr et al. (2002)  
172 monitoraram a dispersão de machos e fêmeas na Flórida entre 1986 e 2000 e  
173 constataram que os machos levaram 7,0 e as fêmeas 9,6 meses para estabelecer  
174 seus territórios. Foi verificado que estes animais estabeleciam territórios mais  
175 próximos de suas áreas natais que outras populações, o que intensifica a

176 endogamia (Maehr et al. 2002). Apesar disso, após a introdução de fêmeas do  
177 Texas (EUA) na Flórida foram observados deslocamentos mais distantes, que  
178 podem ser fruto do aumento da densidade populacional (Maehr et al. 2002).

179 Após a introdução de oito fêmeas do Texas (*P. concolor stanleyana*) na  
180 população de onça-parda da Flórida em 1995, os indícios de sucesso dessa  
181 translocação têm se acumulado. Johnson et al. (2010) avaliaram as consequências  
182 demográficas, genéticas populacionais e biomédicas da translocação e notaram que  
183 o número de indivíduos aumentou três vezes, a heterozigose genética dobrou, as  
184 medidas de sobrevivência e aptidão melhoraram e os correlatos de endogamia  
185 diminuíram.

186 Recentemente, Penfold et al. (2022) confirmaram maior heterozigosidade em  
187 descendentes das fêmeas introduzidas, sendo que tais indivíduos exibiram valores  
188 médios mais elevados para: volume testicular, espermatozoides estruturalmente  
189 normais e número total de espermatozoides em comparação com descendentes da  
190 população original da Flórida.

191 Contudo, os autores destes estudos alertam que, embora esses resultados  
192 sejam encorajadores, a população permanece pequena, isolada, com perda  
193 contínua de habitat, endogamia persistente, agentes infecciosos e possível  
194 saturação de habitat, os quais representam novos dilemas para o esforço de manejo  
195 e conservação do onça-parda da Flórida, podendo ser necessário novo evento de  
196 introgressão genética no futuro (Johnson et al. 2010, Penfold et al. 2022).

197 No Texas existem duas populações bem caracterizadas: no sul e oeste do  
198 estado, com distinta diversidade genética e com evidências de fluxo gênico reduzido  
199 entre esses grupos (Walcker et al. 2000). Com base nesses dados, sugere-se que  
200 as onças-pardas dentro do estado devem ser divididas em pelo menos duas

201 unidades de manejo (Walcker et al. 2000, Holbroock et al. 2012). Holbroock et al.  
202 (2012) analisaram a diversidade genética das duas populações do Texas e uma do  
203 Novo México e concluíram que a população do sul do Texas apresenta a menor  
204 diversidade, sendo necessários mais estudos para confirmar a possível endogamia e  
205 propor medidas de manejo que visem a aumentar a diversidade e evitar a extinção  
206 da população.

207         Em Idaho (EUA) foram comparadas 15 subpopulações de onça-parda e  
208 análises espaciais revelaram que a planície do Rio Snake era uma barreira ao  
209 movimento entre as regiões norte e sul, sendo que os animais do sul apresentavam  
210 menor diversidade genética, níveis mais altos de endogamia e estavam mais  
211 isolados geograficamente que as subpopulações ao norte (Loxterman 2011). Este  
212 estudo reforçou a necessidade se considerar as características da paisagem em  
213 análises de diversidade genética e no planejamento estratégico de manejo, de modo  
214 que os resultados esperados não sejam limitados por possíveis barreiras naturais  
215 (Loxterman 2011). Apesar disso, a perda e fragmentação de hábitat por causas  
216 antrópicas são as principais causas do isolamento de populações (Zanin et al. 2015)

217         As características da paisagem também impactam na permeabilidade dos  
218 habitats em eventos de dispersão de onças-pardas, como os documentados em  
219 Utah (EUA) por Stoner et al. (2013). A população estudada apresentou o padrão  
220 característico de fonte-sumidouro, de modo que ao longo da dispersão de jovens de  
221 ambos os sexos, os obstáculos naturais ou antrópicos reduziram a distância de  
222 dispersão em ambientes fragmentados em comparação com ambientes contínuos  
223 (Stoner et al. 2013).

224         A dinâmica fonte-sumidouro também foi observada em populações da  
225 Califórnia (EUA) por Gustafson et al. (2019), que evidenciaram que uma população

226 pequena em uma região altamente urbanizada apresentava altas taxas de  
227 endogamia e atuava com sumidouro para indivíduos de áreas fonte. Dessa forma,  
228 associar os conhecimentos sobre comportamento da espécie e a configuração da  
229 paisagem é um importante fator a ser considerado no manejo conservacionista  
230 (Stoner et al. 2013).

231 Ernest et al. (2003) suportaram a importância das barreiras de fluxo gênico  
232 da paisagem em populações da Califórnia (EUA). Os níveis de heterozigose  
233 diferiram entre populações costeiras e as do interior, sendo que a Baía de São  
234 Francisco, o Delta do Rio Sacramento - San Joaquin, o Vale Central e a Bacia de  
235 Los Angeles pareciam ser barreiras substanciais ao fluxo gênico, e as frequências  
236 alélicas de populações separadas por essas características diferiram  
237 substancialmente (Ernest et al. 2003).

238 Na Califórnia as onças-pardas das montanhas de Santa Ana estão isoladas,  
239 apresentaram maiores taxas de endogamia e têm experimentado impactos genéticos  
240 relacionados a barreiras ao fluxo gênico (Ernest et al. 2014, Vickers et al. 2015). Em  
241 complemento, Huffmeyer et al. (2022) encontraram sinais físicos e reprodutivos da  
242 depressão endogâmica como criptorquidia, 93% de espermatozoides anormais e  
243 ponta da cauda do animal torcida. Os autores afirmaram que a população no sul da  
244 Califórnia é a segunda com maior nível de depressão endogâmica, atrás apenas da  
245 onça-parda da Flórida (Huffmeyer et al. 2022).

246 Fora dos EUA poucos estudos avaliaram a diversidade genética de onça-  
247 parda. Culver et al. (2000) e Caragiulo et al. (2014) compararam populações dos  
248 EUA e Américas Central e do Sul e notaram diferenças características de cada  
249 população, sendo indicado que a população sul-americana é a mais diversa

250 geneticamente e provável ancestral das atuais populações das Américas Central e  
251 do Norte.

252 Em Belize, Wultsch et al. (2016) observaram diversidade genética moderada  
253 entre as onças-pardas e em uma análise em escala fina notaram redução do fluxo  
254 gênico entre algumas subpopulações associadas a áreas com maior antropização.  
255 No Brasil, Moreno et al. (2006) encontraram diversidade relativamente alta em onça-  
256 parda de diferentes zoológicos. Estes poucos estudos evidenciam a grande  
257 necessidade de se conduzir estudo de diversidade genética em onças-pardas  
258 latinas.

259 Em função do crescente volume de dados de localização geográfica e  
260 genéticos disponíveis torna-se necessário o avanço na criação e utilização de  
261 modelos matemáticos que permitam associar, interpretar e extrair conclusões  
262 valiosas (Zeller et al. 2017, Murphy et al. 2019). Os estudos de Dickson et al. (2013),  
263 Angelieri et al. (2016), De-Matteo et al. (2017), Zeller et al. (2017) e Murphy et al.  
264 (2019) desenvolveram importantes modelos para monitorar as populações de onça-  
265 parda, estabelecer áreas prioritárias para conservação, restauração e o  
266 estabelecimento de corredores ecológicos, bem como a integração de dados de  
267 armadilhas fotográficas com modelos que permitam monitorar os indivíduos de forma  
268 menos invasiva.

269 Com o avanço das técnicas genômicas, amostragens não invasivas,  
270 ferramentas de geoprocessamento e modelos matemáticos, cria-se uma expectativa  
271 promissora de execução de monitoramentos precisos e rápidos do *status*  
272 populacional e de variabilidade genética das espécies (De-Matteo et al. 2017,  
273 Murphy et al. 2019).

274 Para os jaguarundis, foram encontrados apenas três estudos sobre  
275 diversidade genética, mas juntos apresentaram uma amostragem da maior parte das  
276 subespécies descritas pra a espécie. Moreno et al. (2006) encontraram diversidade  
277 relativamente alta em zoológicos brasileiros, um dado valioso para estratégias de  
278 conservação *ex situ*. Em vida livre, Ruiz-García et al. (2018) analisaram 80  
279 mitogenomas (genomas mitocondriais) que representaram sete das oito subespécies  
280 reconhecidas pela morfologia, contudo, os agrupamentos moleculares indicaram três  
281 subespécies, discrepantes das tradicionais oito. Também foi observada uma alta  
282 diversidade genética dentro de cada população, mas baixa diversidade entre  
283 populações distantes geograficamente (Ruiz-García & Pinedo-Castro 2013, Ruiz-  
284 García et al. 2018).

285 A alta diversidade em jaguarundis relatada nesses estudos não foi  
286 observada apenas em uma população no México, avaliada por Holbrook et al.  
287 (2013). Nesta amostragem foi encontrada diversidade moderada e apenas um  
288 haplótipo de DNA mitocondrial, indicando não haver diversidade de mtDNA nessa  
289 população (Holbrook et al. 2013). Apesar das diversidades alta ou moderada  
290 observadas nestes estudos, é importante buscar compreender as causas das  
291 características seminais inferiores dos jaguarundis, quando comparados a outras  
292 espécies neotropicais, como observado em Swanson et al. (2003).

293 De modo geral, as lacunas de conhecimento na onça-parda estão  
294 principalmente nas populações latino-americanas, que juntas representam a maior  
295 parte da área de distribuição da espécie, mas são carentes de estudos e  
296 monitoramento. Em jaguarundis, é necessário amostrar mais populações e com  
297 maior número de indivíduos para confirmar a até então alta diversidade genética e  
298 elucidar as divergências entre subespécies moleculares e morfológicas. Em ambas

299 as espécies, as ferramentas genômicas associadas aos seus genomas recém-  
300 publicados (Saremi et al. 2019, Ochoa et al. 2019, Tamazian et al. 2021)  
301 possibilitarão conhecer mais sobre a diversidade e ameaça das diferentes  
302 populações e do gênero *Puma*.

303

#### 304 4 BIOLOGIA REPRODUTIVA

305

306 O conhecimento sobre a biologia reprodutiva masculina das espécies do  
307 gênero *Puma* é limitado. Apesar disso, os estudos publicados até o momento  
308 fornecem informações valiosas para o manejo destas espécies, podendo subsidiar a  
309 utilização de técnicas de reprodução assistida em iniciativas conservacionistas. A  
310 partir de conhecimentos sólidos da biologia reprodutiva das espécies é possível o  
311 desenvolvimento de diversas técnicas e ferramentas de reprodução assistida, que  
312 por sua vez podem impactar positivamente na conservação destas espécies.

313 Em relação ao sistema de acasalamento, sabe-se que as onças-pardas são  
314 polígamas, mas os mesmos indivíduos podem acasalar ano após ano devido à  
315 estabilidade de suas áreas de vida (Hibben, 1937; Seidensticker et al., 1973). Em  
316 machos de onça-parda, estima-se que a maturidade sexual seja alcançada com  
317 aproximadamente 36 meses (Maehr et al. 1991), porém não foi encontrado estudo  
318 com dados observacionais que corroborem esta idade, tão pouco monitoramento  
319 hormonal que indique o início da puberdade. Nas fêmeas de onça-parda, dados  
320 provenientes de animais de vida livre e cativos suportam consistentemente que elas  
321 atingem maturidade sexual entre 17 e 24 meses (Maehr et al. 1989, Lindzey et al.  
322 1994, Brown & Comizzoli 2018).

323 O início da puberdade de machos de jaguarundi foi recentemente  
324 estabelecido entre 10 e 12 meses de idade por meio do monitoramento de  
325 andrógenos fecais (Souza et al. 2021). Esse período corresponde a menos da  
326 metade da idade que as fêmeas atingem maturidade sexual, definido entre 24 e 34  
327 meses (Brown & Comizzoli 2018). Contudo, não foi encontrado nenhum estudo que  
328 indique quando ocorre o início da puberdade das fêmeas de jaguarundi, que pode  
329 ocorrer com idade próxima à dos machos.

330 O estudo de Souza et al. (2021) avaliou apenas machos cativos de  
331 jaguarundi. É possível que em vida livre os animais levem mais tempo para atingir a  
332 puberdade, como relatado em leões-africanos (*Panthera leo*) por Putman et al.  
333 (2019) e que eles só consigam se reproduzir na natureza após estabelecer seus  
334 territórios, como é esperado em onça-parda (Hornocker 1970, Seidensticker et al.  
335 1973). Putman et al. (2019) observaram maior taxa de ganho de peso e puberdade  
336 mais cedo em animais que nasceram em cativeiro que os de vida livre e inferiram  
337 que o início da puberdade é influenciado pela taxa de crescimento. Os autores  
338 também demonstraram que é possível confirmar a espermatogênese através do  
339 exame de urina, uma ferramenta potencial para confirmação da puberdade (Putman  
340 et al. 2019).

341 Ambas as espécies parecem não apresentar sazonalidade reprodutiva na  
342 maior parte de sua distribuição, sendo conhecida reprodução ao longo de todo o ano  
343 (Maehr et al. 1991, López-Gonzales & Gonzáles-Romero 1998, Brown & Comizzoli  
344 2018). Análises seminais em diferentes estações climáticas no Brasil reforçam esse  
345 entendimento, não sendo observadas diferenças significativas em jaguarundi  
346 (Capítulo dois desta tese). A gestação tem duração entre 82 a 96 dias em onça-  
347 parda (Rabb 1959, Young e Goldman 1946) e de 63 a 75 dias em jaguarundi (Hulley,

348 1976, Nowak, 1992). As ninhadas possuem em média 3 filhotes em onça-parda,  
349 variando de 1 a 6 (Robinette et al., 1961) e em jaguarundi variam de 1 a 4 com  
350 média de 1,9 indivíduos (Oliveira, 1994).

351 Apesar de se reproduzirem ao longo de todo o ano, há relatos de maior  
352 incidência de nascimentos de onça-parda em alguns meses do ano, diferindo de  
353 acordo com a região, como na Flórida ocorrendo de março a julho (Maehr et al.  
354 1991), Utah e Nevada entre junho e outubro (Lindzey et al. 1994, Robinette et al.  
355 1961) e Alberta (Canada) nos meses de junho a agosto (Ross & Jalkotzy 1992). Em  
356 jaguarundis tropicais a reprodução ocorre o ano todo (Bailey, 1905, Ewer, 1973;  
357 Weigel, 1975), mas há relatos de reprodução em apenas dois períodos no México  
358 (Guggisberg, 1975; Leopold, 1959), e um período entre agosto e março na  
359 extremidade norte de sua distribuição geográfica nos EUA (Bailey, 1905).

360 O intervalo entre as ninhadas em onça-parda em vida livre é de em média  
361 dois anos, apesar da fêmea estar apta a se reproduzir o ano todo (Hunter 1921,  
362 Robinette et al. 1961). Entretanto, já foram relatados intervalos de apenas oito e  
363 doze meses em cativeiro (Robinette et al. 1961). Acredita-se que o tempo de  
364 permanência dos filhotes com a mãe seja o principal fator determinante de tal  
365 intervalo, uma vez que se espera que as fêmeas não acasalem enquanto estão com  
366 os filhotes (Robinette et al. 1961), pelo efeito de *feedback* negativo da prolactina  
367 durante a amamentação e também pelo fato de que as fêmeas com filhotes evitam  
368 os machos, pelo risco de infanticídio.

369 De fato, um monitoramento de longo tempo com indivíduos com radio colar  
370 mostrou que adultos de ambos os sexos se evitam a maior parte do tempo, com  
371 exceção dos períodos de acasalamentos (Hornocker 1969). O estudo de Robinette  
372 et al. (1961) evidenciou que 23 das 27 fêmeas capturadas com prenhez detectada

373 estavam sem filhotes, reforçando que não deve ser frequente o acasalamento na  
374 presença dos filhotes.

375 Contudo, quatro fêmeas prenhes capturadas por Robinette et al. (1961)  
376 estavam com filhotes de aproximadamente um ano de idade, evidenciando que o  
377 acasalamento na presença dos filhotes pode ocorrer. Como apresentado  
378 anteriormente, a repetição consecutiva de parceiros reprodutivos ocorre com  
379 frequência, o que pode contribuir para os acasalamentos na presença dos filhotes,  
380 situação que minimizaria as chances de o macho matá-los. As fêmeas também  
381 podem acasalar longe dos filhotes e depois retornar para juntar-se a eles.  
382 Normalmente as fêmeas voltam a ciclar após o desmame dos filhotes, quando cessa  
383 o efeito de *feedback* negativo da prolactina que ocorre durante a lactação. Na  
384 natureza os filhotes ficam mais tempo com as mães, mesmo após o desmame, para  
385 o aprendizado da caça.

386 O infanticídio ocorre nas onças-pardas, sendo um evento comum na família  
387 Felidae, mas possui características particulares em comparação às outras espécies  
388 (Robinette et al. 1961). Nos casos em que a ninhada nasce morta ou é removida  
389 dentro de 24 h, a fêmea geralmente entra em estro dentro de poucas semanas  
390 (Eaton e Verlander, 1977; Rabb, 1959). Mas ao contrário da maioria dos grandes  
391 felídeos, caso as onças-pardas criem os filhotes por pelo menos alguns dias,  
392 geralmente não entram em cio logo após a morte ou remoção da ninhada (Eaton e  
393 Verlander, 1977). Esses achados estão relacionados com os níveis de prolactina,  
394 que se mantêm elevados pós-parto em consequência da amamentação dos filhotes.

395 Os filhotes permanecem com suas mães até idades entre um ano e meio a  
396 dois anos (Robinette et al. 1961 Hornocker 1970, Seidensticker et al. 1973). Com  
397 base em observações de vida livre, acredita-se que os jovens irmãos se mantenham

398 unidos por algum tempo após abandonarem suas mães e mais tarde se separem,  
399 podendo ocorrer ou não dispersão (Robinette et al. 1961).

400 A longevidade reprodutiva de onça-parda em cativeiro é estimada em pelo  
401 menos 12 anos nas fêmeas e 20 nos machos (Eaton e Verlander, 1977). No  
402 Capítulo 3 desta tese é apresentada a qualidade seminal de um jaguarundi entre 16  
403 e 18 anos de idade, que apresentou parâmetros seminais normais e níveis  
404 qualitativos elevados em todas as coletas (n=4), sendo registrado o nascimento de  
405 um filhote desse macho nesse período. Apesar disso, em vida livre é estimado que  
406 um macho de onça-parda de 12 anos seja provavelmente idoso (Young e Goldman,  
407 1946) e indivíduos senis costumam ser transientes, com poucas chances de  
408 reprodução (Hornocker 1969).

409

## 410 5 MONITORAMENTO ENDÓCRINO

411

412 Até o momento, o monitoramento endócrino reprodutivo foi pouco explorado  
413 no gênero *Puma*, tanto invasivo como não invasivo, consistindo uma preocupante  
414 lacuna, uma vez que ele permite avaliar o estado puberal, condições de estresse,  
415 determinar a influência da estação climática na reprodução, diagnosticar possíveis  
416 causas de sub ou infertilidade, dentre outros (Brown et al. 1996).

417 Além da detecção da puberdade já descrita nesta revisão, Swanson et al.  
418 (2003) avaliaram em uma única coleta as concentrações séricas de testosterona e  
419 cortisol por meio de radioimunoensaio nas duas espécies do gênero *Puma*  
420 associadas a uma coleta de sêmen. Os autores observaram concentrações médias  
421 ( $\pm$ SEM) de  $2,13 \pm 0,34$  e  $0,96 \pm 0,19$  ng/ml de testosterona e  $271,9 \pm 18,7$  e  $223,3 \pm$   
422  $18,2$  ng/ml de cortisol, em onça-parda e jaguarundi, respectivamente. Nogueira e

423 Silva (1997) dosaram a concentração sérica de cortisol durante contenção química e  
424 observaram em onça-parda  $193,24 \pm 34,03$  ng/mL e jaguarundis  $138,44 \pm 23,94$   
425 ng/mL, sendo destacados os impactos que o procedimento de contenção pode  
426 ocasionar nos animais.

427 Barone et al. (1994<sup>a</sup>) compararam as concentrações séricas dos hormônios:  
428 folículo-estimulante (FSH), luteinizante ou estimulante das células intersticiais (LH ou  
429 ICSH) e testosterona entre onças-pardas com e sem criptorquidia unilateral e não foi  
430 encontrada diferença entre os animais, revelando que a localização de um dos  
431 testículos não estava ligada a alterações nesses hormônios, talvez por  
432 compensação do outro testículo e/ou por maior resistência à temperatura mais  
433 elevada dos receptores de LH em relação aos receptores de FSH, com isso a  
434 produção de testosterona não se altera e seus efeitos de *feedback* negativo também  
435 não.

436 De forma similar, Wildt et al. (1988) avaliaram os efeitos da eletroejaculação  
437 (EEJ) sob as concentrações de cortisol, LH e testosterona em onça-parda, avaliando  
438 amostras de sangue coletadas antes, durante e depois da EEJ ou no mesmo  
439 intervalo de tempo em animais anestesiados, mas sem EEJ (controle). Entre as  
440 amostras controle (sem EEJ) foram observados os seguintes intervalos para cortisol  
441 (218,4-524,0 ng/mL), LH (6,8-10,0 ng/mL) e testosterona (1,49-3,54 ng/mL) (Wildt et  
442 al. 1988). Já os com EEJ apresentaram concentrações de cortisol (287,7-721,9  
443 ng/mL), LH (1,3-7,5 ng/mL) e testosterona (0,91-7,33 ng/mL) (Wildt et al. 1988).

444 Durante a EEJ o cortisol aumentou mais de duas vezes, atingindo um pico  
445 de 519,7 ng/ml na última amostra (Wildt et al. 1988). Não houve diferença na  
446 concentração de LH e testosterona ao longo do tempo, com ou sem EEJ (Wildt et al.  
447 1988). Os autores fizeram ainda uma aplicação de 250 µg de ACTH, visando a

448 avaliar a resposta adrenal, e concluíram que a EEJ não induz picos tão altos de  
449 cortisol como o ACTH, no qual a concentração foi 196,1 ng/mL maior que na EEJ  
450 (Wildt et al. 1988). As concentrações de LH e testosterona não apresentaram  
451 diferenças após aplicação de ACTH (Wildt et al. 1988).

452 Os dados de Swanson et al. (2003) representam a maior amostragem de  
453 indivíduos de jaguarundi (n=21) até o momento, mas foram obtidos de uma única  
454 coleta em cada indivíduo. Wildt et al. (1988) acompanharam três animais por até  
455 quatro anos, mas as coletas foram realizadas apenas entre fevereiro e abril em um  
456 pequeno número de indivíduos. É necessário que no futuro os hormônios sejam  
457 monitorados em diferentes condições, uma vez que as concentrações são  
458 influenciadas pela idade, estação climática, contenção, manejo, frequência de  
459 contato humano, dentre outros (Norkaew et al. 2019, Fazio et al. 2020).

460 Em função dessas influências, as concentrações hormonais em cada  
461 indivíduo flutuam, sendo ideal a realização de um monitoramento hormonal  
462 longitudinal, possibilitando conhecer a curva com as concentrações basais e a partir  
463 dela poder correlacionar com eventos que as alterem (Fazio et al. 2020). A obtenção  
464 desses dados contribuiria para o conjunto de conhecimentos sobre a biologia  
465 reprodutiva normal e alterações e o refinamento de estratégias de manejo  
466 reprodutivo e TRAs.

467 Além disso, é necessário investigar as concentrações basais e efeitos de  
468 outros hormônios ligados à reprodução, como os tireoidianos, estrogênios e a  
469 ocitocina, que possuem papéis reguladores no orgasmo, reflexo ejaculatório e  
470 contratilidade do epidídimo (Corona et al. 2012). Distúrbios tireoidianos já foram  
471 relatados em onça-parda da Flórida atribuídos inicialmente à baixa variabilidade  
472 genética da população, mas Facemire et al. (1995) indicaram que contaminações

473 ambientais por mercúrio observadas devem ser consideradas como possível causa  
474 de tais distúrbios.

475 Os autores relataram ainda que os níveis séricos de estradiol não diferiam  
476 entre machos e fêmeas, o que pode ter gerado machos feminizados que,  
477 conseqüentemente, podem apresentar os problemas reprodutivos observados nessa  
478 população (Facemire et al. 1995). Assim, o conhecimento sobre os padrões  
479 endócrinos nas diferentes populações de onça-parda, bem como de jaguarundis,  
480 deve ser priorizado e analisado sobre uma perspectiva holística, incluindo  
481 parâmetros genéticos e ambientais (Facemire et al. 1995).

482

## 483 6 REPRODUÇÃO ASSISTIDA

### 484 6.1 Coleta de sêmen

485

486 Ao compilar dados publicados sobre a biometria testicular, morfologia e  
487 morfometria espermática, além de outros parâmetros seminais do gênero,  
488 observam-se variações entre estudos e espécies ao longo de algumas décadas de  
489 pesquisas (Tabela 1). Publicações sobre coleta e avaliações seminais básicas são  
490 os mais abundantes no gênero com 12 estudos, mas alguns dados sobre biometria,  
491 morfologia e morfometria não são apresentados na maior parte desses estudos.  
492 Apesar de ser o tema mais abundante, o pequeno número disponível de estudos  
493 demonstra que ainda é necessário um grande esforço para conhecer os padrões  
494 básicos reprodutivos, sobretudo em jaguarundi.

495

496 O estudo mais antigo encontrado que coletou sêmen de jaguarundi é Pope  
497 et al. (1998), contudo, o foco do estudo era realizar FIV, ICSI e transferência de  
498 embriões, não sendo relatados os dados seminais. Em onça-parda, o estudo mais  
499 abrangente e com maior número de indivíduos (n=77) até hoje é o de Barone et al.  
500 (1994<sup>a</sup>) com populações da Flórida, Texas, Colorado, América Latina e cativos em  
501 zoológicos. Os autores evidenciaram diferenças e amplitudes consideráveis entre as  
502 populações em todos os parâmetros analisados (Barone et al. 1994<sup>a</sup>).

503 Esse estudo de Barone et al. (1994<sup>a</sup>) foi o único que analisou  
504 espermatozoides do gênero *Puma* com microscopia eletrônica (MET), sendo  
505 detectado fragmentos de material acrossomal localizados entre o acrossoma e a  
506 membrana plasmática, desarranjos na continuidade acrossomal e resquícios  
507 vesiculares do complexo de Golgi na área da cabeça do espermatozoide.

508 Após os primeiros estudos com reprodução assistida em machos do gênero  
509 *Puma*, outros têm apresentado dados valiosos, como a duração do processo de  
510 espermatogênese, que foi determinada em aproximadamente 44,5 dias em onça-  
511 parda (Leite et al. 2006) e 37,8 dias em jaguarundi (Silva 2014). Em jaguarundi  
512 também foram descritos os índices gonadossomático em 0,032%, tubulossomático  
513 de 0,027% e leydigossomático em 0,001% (Silva 2014), que representam o  
514 percentual de massa corporal alocada nos testículos, túbulos seminíferos e células  
515 de Leydig, respectivamente. Segundo Silva (2014), o jaguarundi apresenta alta  
516 produção espermática diária com cerca de 51,52 milhões de espermatozoides por  
517 grama de testículo.

518 Em populações de onça-parda com reconhecido processo de depressão  
519 endogâmica, como a da Flórida, foi observada criptorquidia, como já relatado nesta  
520 revisão (Mansfield & Land 2002). Os machos sem criptorquidia com idade entre 1 e

521 24 meses apresentaram massa testicular média de  $9,1 \pm 1,6$  g (n=10) enquanto os  
522 testículos retidos foram menores com  $3,5 \pm 0,8$  g (n=8) (Mansfield & Land 2002).

523 Em coleta de sêmen por EEJ, foi relatada aspermia em alguns indivíduos de  
524 onça-parda e jaguarundi no estudo de Swanson et al. (2003), mas os autores não  
525 relataram quantos dos indivíduos estudados apresentaram essa condição. Swanson  
526 et al. (2003) realizaram apenas uma coleta em cada animal, não sendo conclusivo  
527 se tal condição era definitiva ou pontual.

528 No Capítulo 3 dessa tese é relatado um caso similar em jaguarundi, sendo  
529 que desse macho com fertilidade comprovada e alojado com fêmea não foi obtido  
530 sêmen (resultou aspérmico) em três coletas consecutivas, mas em coletas seguintes  
531 foram obtidas amostras de sêmen com características semelhantes aos demais  
532 animais. Dessa forma, a constatação de aspermia utilizando EEJ demanda  
533 acompanhamento do indivíduo ao longo de várias coletas e avaliação de outros  
534 parâmetros complementares como exames hormonais e de imagem como a  
535 ultrassonografia testicular.

536 A coleta de sêmen no gênero *Puma* ocorre predominantemente por EEJ  
537 mas, alternativamente, alguns estudos já avaliaram o uso da cateterização uretral  
538 (CU) após anestesia com medetomidina ou dexmedetomidina (Madrigal-Valverde et  
539 al. 2019, Araujo et al. 2020<sup>a,b</sup>, Capítulo 2 desta tese). Na EEJ foram utilizadas  
540 voltagens entre 2 e 16 V com sucesso na obtenção de sêmen, sendo o mais comum  
541 usar de 2 a 5 V seguindo o protocolo de Howard et al. (1993), que consiste em um  
542 total de 80 estímulos elétricos aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos).

543 A CU em onça-parda apresentou resultados interessantes em três indivíduos  
544 por Araujo et al. (2020<sup>a,b</sup>). O sêmen obtido por CU em onça-parda apresentou menor  
545 volume ( $106,7\mu\text{L}$ ), alta concentração ( $524 \times 10^6$  espermatozoides/mL) e demais

546 parâmetros semelhantes à EEJ (Araujo et al. 2020<sup>a,b</sup>). Em jaguarundi os resultados  
547 de CU até o momento são conflitantes. Madrigal-Valverde (2019) validaram a técnica  
548 em uma coleta em um único animal usando 0,1 mg/kg de medetomidina e obtiveram  
549 pequeno volume (20µL), alta concentração (570 X 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) e  
550 demais parâmetros com qualidade semelhante a outros estudos com EEJ (Tabela  
551 1).

552 Por outro lado, no estudo apresentado no Capítulo 2 esta tese, utilizando  
553 0,005 mg/kg de dexmedetomidina na CU em seis jaguarundis ao longo de cinco  
554 coletas foram obtidas amostras com volume extremamente reduzido (3,53 µL), o que  
555 impossibilitou o cálculo da concentração, sendo que os demais parâmetros foram  
556 inferiores às coletas por EEJ. Imediatamente após a CU, foi realizada a EEJ e  
557 obtidas amostras com qualidade e volume semelhante ou superior a outros estudos  
558 demonstrados na Tabela 1 (Capítulo 2 desta tese). Dessa forma, é necessário que  
559 novas investigações avaliem diferentes doses do anestésico e o princípio ativo  
560 (medetomidina ou dexmedetomidina) com finalidade de compreender sua influência  
561 sob os resultados e confirmar a eficiência da CU.

562 O sêmen obtido tem sido historicamente avaliado quase que exclusivamente  
563 com parâmetros básicos subjetivos e microscopia óptica simples como vigor,  
564 motilidade, motilidade progressiva, vitalidade e morfologia, os dois últimos com os  
565 corantes eosina, rosa bengala e a associação eosina-nigrosina (Madrigal-Valverde et  
566 al. 2019, Araujo et al. 2020<sup>a,b</sup>, Capítulo 3 desta tese). Recentemente, foi utilizada  
567 análise de sêmen automatizada (CASA) e o teste hiposmótico em um indivíduo de  
568 jaguarundi, sendo o único estudo encontrado no gênero *Puma* com tais análises  
569 (Madrigal-Valverde et al. 2019). A análise com CASA indicou: velocidade curvilínea  
570 de 29,99 µm/s; velocidade de linha reta de 10,05 µm/s; velocidade média da

571 trajetória de 14,48  $\mu\text{m/s}$ ; índice de linearidade de 34,67%; e índice de retidão de  
572 58,28% (Madrigal-Valverde et al. 2019).

573 A integridade do DNA é um ponto essencial para a reprodução, mas só  
574 foram avaliados os danos ao DNA dos espermatozoides no gênero *Puma* na  
575 presente tese, utilizando o ensaio cometa (Capítulo 4 desta tese). Esta técnica é tida  
576 como a mais refinada para avaliar danos ao DNA e foi realizada a padronização do  
577 ensaio para onças-pardas e jaguarundis, sendo a primeira utilização conhecida  
578 desta técnica em felídeos (Capítulo 4 desta tese). Os resultados permitiram  
579 conhecer os níveis basais de danos ao DNA de indivíduos férteis, possibilitando  
580 comparar com animais subférteis e inférteis e também avaliar a influência do  
581 congelamento e diferentes meios. No estudo, os dois extensores utilizados não  
582 tiveram diferença nos níveis de danos (Capítulo 4 desta tese).

583 O parâmetro concentração de espermatozoides apresentou grande variação  
584 entre estudos publicados (Tabela 1), mas em acréscimo, uma tendência de aumento  
585 da concentração nos estudos mais recentes foi notada nesta revisão. O volume  
586 seminal obtido também tem sido maior nos estudos recentes. Estas diferenças  
587 podem ser causadas pelas diferentes populações avaliadas e não com o fator  
588 temporal, contudo, essa curiosa tendência pode também indicar melhorias nos  
589 protocolos anestésicos, técnica e equipamento de coleta e nutrição em cativeiro.

590

## 591 6.2 Morfologia e morfometria espermática

592

593 A teratospermia (>60% de espermatozoides anormais) é uma característica  
594 de muitas das 37 espécies de felídeos (Pukazhenthil et al. 2006), sendo também  
595 observada no gênero *Puma* (Wildt et al. 1988, Swanson et al. 2003). Contudo, os

596 diferentes estudos compilados na Tabela 1 evidenciaram que não há um padrão  
597 geral em ambas as espécies, sendo que parte indica todos ou a maioria dos animais  
598 teratospérmicos e em outros nenhum ou a minoria possui tal condição.

599 Alguns estudos como Wildt et al. (1988), Swanson et al. (2003) e Barone et  
600 al. (1994<sup>a</sup>) evidenciaram grandes índices de teratospermia, enquanto outros  
601 observaram percentuais abaixo de 60% na maioria dos animais (Deco-Souza et al.  
602 2010, Madrigal-Valverde et al. 2019, Capítulos 2 e 3 desta tese). Estas diferenças  
603 podem estar relacionadas a diferenças entre as populações amostradas na América  
604 Latina e nos EUA nestes estudos.

605 Barone et al. (1994<sup>a</sup>) analisaram três populações de onça-parda nos EUA e  
606 uma composta por animais de diferentes locais da América Latina e observaram  
607 diferença nos níveis de teratospermia entre as populações dos EUA e destas com a  
608 latina. As onças-pardas latinas foram as que apresentaram menores níveis de  
609 teratospermia, estando a média observada 60,6% muito próxima do limiar 60%  
610 (Barone et al. 1994<sup>a</sup>). Os estudos de Araujo et al. (2020<sup>a</sup>), Deco-Souza et al. (2010),  
611 Madrigal-Valverde et al. (2019) e os Capítulos 2 e 3 desta tese foram conduzidos  
612 com animais brasileiros e apesar de as médias de teratospermia estarem entre 50 e  
613 59%, também próximas ao limiar (60%), tal condição não se confirmou na maioria  
614 dos animais destes estudos.

615 As principais formas anormais observadas foram cauda enrolada/dobrada,  
616 muitas vezes fortemente enrolada, peça intermediária dobrada, muitas vezes com  
617 gota citoplasmática, enquanto as menos observadas foram macrocefalia, cabeça  
618 estreita na base e cabeça isolada normal (Wildt et al. 1988, Swanson et al. 2003,  
619 Deco-Souza et al. 2010, Capítulo 3 desta tese). As principais formas anormais

620 citadas juntas representaram a maior parte das anormalidades em todos os estudos,  
621 demonstrando ser uma característica conservada no gênero.

622 Do ponto de vista morfométrico, são conhecidos apenas dois estudos  
623 envolvendo a onça-parda e um com o jaguarundi (Tabela 1). Além disso, o número  
624 amostral nesses estudos foi pequeno, sendo de onça-parda, um indivíduo em Cucho  
625 et al. (2016) e dois no Capítulo 3 desta tese, e seis jaguarundis no Capítulo 3 desta  
626 tese. Os resultados de Cucho et al. (2016) apresentaram três subpopulações de  
627 espermatozoides obtidos do epidídimo de uma onça-parda. No Capítulo 3 desta tese  
628 não foi realizada análise de subpopulações espermáticas.

629

### 630 6.3 Criopreservação do sêmen

631

632 Após as análises seminais básicas o sêmen é centrifugado, retirado o  
633 sobrenadante, e o *pellet* ressuspensão em meios de criopreservação. Os extensores  
634 descritos nos estudos no gênero *Puma* apresentam formulação bastante semelhante  
635 com os seguintes ingredientes e intervalos de concentração observados: Tris (2,4-  
636 3,02g); carboidratos - frutose 1,25g, glicose 1g, lactose 11g; citrato (1,3-1,7g); gema  
637 de ovo 20%; glicerol (4-7,5%); estreptomicina 1 mg/L (Swanson et al. 2003, Deco-  
638 Souza et al. 2013, Capítulo 2 e 3 desta tese). O antibiótico estreptomicina foi  
639 utilizado em Deco-Souza et al. (2013), os demais não relataram uso de antibióticos.

640 No estudo de Swanson et al. (2003) foi utilizada solução salina (0,9% NaCl)  
641 e não foi utilizado Tris. No Capítulo 3 desta tese foram utilizados quatro meios,  
642 sendo que um tem sua formulação descrita e outros três foram obtidos sem a  
643 descrição detalhada de seus componentes, sabe-se apenas que também são a base  
644 de gema de ovo e 4% de glicerol.

645 Os protocolos de congelamento utilizados no gênero *Puma* até o presente  
646 consistem em reduzir as temperaturas das amostras em refrigerador ou caixas  
647 térmicas com gelo até atingir a temperatura de 4°C, congelá-las em vapor de  
648 nitrogênio líquido e por fim armazená-las imersas no mesmo. O congelamento  
649 utilizando curvas controladas por equipamentos automatizados apresentou melhores  
650 resultados que protocolos manuais em *Leopardus wiedii* em Erdmann et al. (2020),  
651 mas até o momento nenhuma avaliação foi feita no gênero *Puma*. Por outro lado, em  
652 coletas a campo, caixas térmicas com gelo reciclável podem ser utilizadas a fim de  
653 eliminar a dependência de energia (Araujo et al. 2020<sup>b</sup>, Capítulo 3 desta tese).

654 Após o congelamento as perdas de motilidade são comuns em vários  
655 mamíferos, não sendo diferente em onças-pardas ou jaguarundis. No estudo de  
656 Deco-Souza et al. (2013) a motilidade espermática após o descongelamento variou  
657 de 40 a 42,5%, representando uma queda média de 33,75% em relação ao sêmen  
658 fresco. Os autores avaliaram em onça-parda a influência de duas concentrações de  
659 glicerol, 5 e 7,5%, mas não houve diferença (Deco-Souza et al. 2013). No capítulo  
660 dois desta tese, foram avaliados quatro meios com 4% de glicerol em onça-parda e  
661 jaguarundi e foram observadas grandes perdas de motilidade após o  
662 descongelamento, que variaram de 44,91% a 75% (Tabela 2).

663 Os poucos estudos com avaliações após o descongelamento evidenciam a  
664 carência de avaliações sobre criopreservação de sêmen e a necessidade de  
665 aprimoramento de tais biotécnicas reprodutivas. A utilização de abordagens ômicas  
666 sobre a constituição do plasma seminal em alta definição, bem como suas  
667 influências sob os espermatozoides pode ser uma rica fonte de dados para  
668 aprimoramento dos meios de criopreservação e possíveis tratamentos aplicados às  
669 células após o descongelamento. Também deve-se buscar variações de outros

670 componentes dos meios além do glicerol, pois como observado no Capítulo 3 desta  
671 tese, quatro meios com 4% de glicerol resultaram em diferentes sobrevivências, o  
672 que se deve aos seus demais constituintes.

673         Ao comparar o conhecimento sobre onça-parda e jaguarundis nota-se que  
674 ambas são pouco estudadas do ponto de vista da reprodução masculina, mas a  
675 carência de dados sobre jaguarundis é expressivamente maior. O estudo de  
676 Swanson et al. (2003) comparou características seminais de oito espécies de  
677 felídeos latino-americanos, sendo que o jaguarundi (n=21) apresentou o menor  
678 índice de motilidade espermática 57,8%, menor volume seminal 0,08 mL, menor  
679 número total de espermatozoides  $1 \times 10^6/\text{mL}$  e maior percentual de espermatozoides  
680 anormais 74,3% entre as espécies avaliadas. Estes dados enfatizam a preocupação  
681 com a conservação do jaguarundi, uma das espécies menos estudadas de felídeos  
682 e que apresenta parâmetros seminais preocupantes.

683

## 684 7 ABORDAGENS “ÔMICAS” E MULTI-ÔMICAS

685

686         O avanço na biologia molecular das últimas décadas possibilitou o  
687 desenvolvimento de abordagens abrangentes de pesquisa que agregam um  
688 complexo conjunto de conhecimentos sobre biomoléculas e suas funções. Tais  
689 abordagens receberam o nome de abordagens “ômicas”, um neologismo  
690 provavelmente derivado da palavra bioma, sendo que tais abordagens designam  
691 amplos campos de estudo da biologia, pautados na caracterização global de  
692 biomoléculas com o intuito de alcançar uma compreensão abrangente de suas  
693 funções biológicas (D’Alexandri et al. 2010).

694 Os projetos genomas iniciaram uma nova era ao sequenciar o genoma de  
695 seres vivos procariontes e eucariontes, envolvendo o homem (Koboldt et al. 2003).  
696 Dessa forma, a genômica é tida como primeira ciência ômica e baseia-se no  
697 sequenciamento genético dos organismos (Hasin et al. 2017). Ao se conhecer os  
698 genomas se tornou evidente que havia muitas etapas complexas entre o genoma e o  
699 fenótipo dos organismos, levando ao surgimento de outras abordagens ômicas  
700 (Hasin et al. 2017).

701 Atualmente, além da genômica existem muitas denominações ômicas, como:  
702 a transcriptômica, que estuda a expressão genética por meio de todas as moléculas  
703 de RNA (Trapnell et al. 2010, Barret & Salzman 2016); a proteômica, glicômica e  
704 lipidômica que buscam, individualmente, caracterizar o perfil completo de proteínas,  
705 carboidratos e lipídios em nível estrutural, funcional e suas interações com outras  
706 moléculas do mesmo grupo ou demais grupos (Haider & Pal 2013, Blakeley-Ruiz &  
707 Kleiner 2022, Cravatt et al., 2007); a metabolômica que interpreta os metabólitos de  
708 uma célula, com a capacidade de retratar a fisiologia celular de forma instantânea  
709 (Patti et al. 2012); a fenômica que interpreta os fenótipos (Bilder et al. 2009); dentre  
710 outros.

711 De modo geral as ciências ômicas têm proporcionado uma expressiva  
712 revolução com avanços no conhecimento detalhado sobre a biologia das espécies e  
713 impactos promissores ligados às doenças e possíveis terapias (Bilder et al. 2009,  
714 Hasin et al. 2017, D'Alexandri et al. 2010). Por meio de abordagens ômicas,  
715 processos biológicos naturais ou induzidos podem ser interpretados em nível  
716 molecular, com alta resolução, o que possibilita conhecê-los detalhadamente e  
717 compreender variações entre indivíduos e técnicas utilizadas (Seli et al. 2010).

718 Diante disso, diversas aplicações destas abordagens na reprodução animal  
719 têm se tornado realidade, sobretudo na busca por biomarcadores de condições  
720 patológicas ou etapas cruciais na reprodução como: a implantação de embriões,  
721 proteínas do citotrofoblasto, pré-eclâmpsia, parto prematuro, secreções  
722 embrionárias, seleção de embriões, desenvolvimento inicial de embriões,  
723 estimulação da ovulação, fertilização *in vitro*, microbioma semiovaginal, dentre  
724 outros (Sawicki et al. 2003, Kenny et al. 2005, O'Neill 2005, Butt et al. 2006, Horgan  
725 et al. 2008, Seli et al. 2010, Hernández-Vargas et al. 2020, Mändar et al. 2015). Ao  
726 se observar o perfil da literatura sobre ômicas, nota-se que a maioria dos estudos é  
727 com fêmeas e poucos com machos.

728 A infertilidade masculina está relacionada a vários distúrbios que envolvem  
729 as diferentes abordagens ômicas, sendo que em mamíferos existem estudos nas  
730 perspectivas genômicas, epigenômica, proteômica e metabolômica, principalmente  
731 com humanos e roedores (para mais detalhes consulte Sinha et al. 2017). Muitos  
732 candidatos a marcadores moleculares de infertilidade já foram relatados,  
733 demandando análises integradas do enorme e crescente volume de dados ômicos  
734 que possam validá-los (Pacheco et al. 2011, Rolland et al. 2012, Jayaraman et al.  
735 2014, Urdinguio et al. 2015).

736 Na família Felidae poucos estudos ômicos foram realizados até o momento,  
737 sobretudo ligados à reprodução. O sequenciamento do genoma de algumas  
738 espécies foi concluído nas duas últimas décadas como do gato-doméstico (Pontius  
739 et al. 2007), tigre (Cho et al. 2013, Reddy et al. 2018), leopardo-da-neve (Cho et al.  
740 2013) e leão-africano (Cho et al. 2013). A comparação dos genomas destas  
741 espécies revelou grande similaridade entre elas, demonstrando que muitas

742 características como genes ligados à carnivoría estrita são conservadas entre os  
743 felídeos (Cho et al. 2013).

744 Mais recentemente, os genomas da onça-parda e do jaguarundi foram  
745 publicados (Saremi et al. 2019, Ochoa et al. 2019, Tamazian et al. 2021). Tamazian  
746 et al. (2021) compararam os genomas do jaguarundi, onça-parda e chita, que juntos  
747 formam a linhagem puma, e encontraram grande similaridade entre as espécies.  
748 Ochoa et al. (2019) compararam a diversidade de genomas de onça-parda da  
749 Flórida antes e depois do evento de introdução de fêmeas do Texas já descrito  
750 nessa revisão, e observaram aumento de três vezes na heterozigose em relação aos  
751 seus predecessores imediatos. Estes resultados se somam a outros estudos que  
752 comprovam o sucesso desse evento de introdução de variabilidade genética em uma  
753 população ameaçada.

754 Os genomas do gato-doméstico e do tigre são 95,6% similares, sendo que  
755 ambas as linhagens divergiram há, aproximadamente, 10,8 milhões de anos atrás  
756 (Johnson et al. 2006). Cho et al. (2013) observaram 3646 genes com alterações de  
757 aminoácidos específicos dos grandes felídeos (tigre, leão-africano e leopardo-da-  
758 neve) e 5882 genes com alterações de aminoácidos da linhagem felídea (grandes  
759 felídeos mais o gato).

760 A partir da genômica, estudos de outras abordagens ômicas se agregam,  
761 como estudos de proteômica, lipidômica, glicômica e metabolômica. A descrição das  
762 proteínas do plasma seminal e sua proteômica é essencial para conhecer a  
763 diversidade proteica e identificar biomarcadores de fertilidade e fisiológicos (Pilch &  
764 Mann 2006). O plasma seminal humano e do gato doméstico já possuem  
765 caracterização proteômica (Pilch & Mann 2006, Brzozowska et al. 2019), contudo,  
766 não foi encontrado nenhum estudo com felídeos silvestres.

767 Além da proteômica, abordagem ômica mais utilizada na reprodução, os  
768 outros componentes do plasma seminal, e mesmo de espermatozoides, como  
769 lipídios, carboidratos e metabólitos foram pouco investigados em felídeos. Este fato  
770 evidencia uma lacuna de conhecimento crítica para o melhor entendimento da  
771 composição e funções do plasma seminal e seus possíveis biomarcadores. Este  
772 conhecimento seguramente contribuirá para a melhoria das TRAs, como a  
773 criopreservação de sêmen, PIV, ICSI, dentre outras.

774 Com uma abordagem metagenômica, no capítulo cinco desta tese foi  
775 caracterizado o microbioma de bactérias e fungos presentes no sêmen e uretra de  
776 jaguarundi, dado inédito entre os felídeos. Foram identificados 33 táxons de  
777 bactérias distribuídas em cinco filos e oito espécies de fungos provenientes dos filos  
778 Basidiomycota e Ascomycota no sêmen e uretra. Apesar de pouco estudado em  
779 animais silvestres, já foi demonstrado que o microbioma seminal está alterado em  
780 homens com afecções reprodutivas como hiperviscosidade seminal e  
781 oligoastenoteratozoospermia (Monteiro et al. 2018), e que alguns gêneros de  
782 bactérias como *Lactobacillus* e *Gardnerella* são dominantes em amostras de maior  
783 qualidade, enquanto *Prevotella* dominou em amostras de menor qualidade (Weng et  
784 al. 2014).

785 Štšepetova et al. (2020) confirmaram que a FIV em humanos não ocorre em  
786 um ambiente estéril e os próprios meios de cultura usados no processo possuíam  
787 microrganismos. Os autores também observaram que a dominância de  
788 microrganismos da classe Alphaproteobacteria estava negativamente correlacionada  
789 com a obtenção de embriões de maior qualidade (Štšepetova et al. 2020).

790 O compartilhamento de microrganismos entre os parceiros também já foi  
791 documentado em humanos, sendo necessário um estudo conjunto entre os

792 indivíduos para inferir sobre a fertilidade individual e/ou do casal (Mändar et al.  
793 2015). De modo complementar, levanta-se a hipótese de que ocorra a transferência  
794 de microrganismos dos genitores para a prole, podendo o microbioma dos pais  
795 impactar diretamente na fertilidade dos descendentes (Altmäe et al. 2019).

796         Agregando dados dos diferentes componentes do sêmen se torna mais clara  
797 a necessidade de analisá-lo sob diferentes perspectivas e abordagens, mas sem  
798 dúvida, a integração de tantas partes é complexa e devem ocorrer muitas interações  
799 entre diferentes moléculas ali presentes. A presença de uma microbiota equilibrada  
800 tende a favorecer a manutenção de taxas normais de proteínas, lipídios e  
801 carboidratos no sêmen. Por outro lado, um desequilíbrio na microbiota pode  
802 provocar a degradação de moléculas importantes para o espermatozoide, a  
803 presença de metabólitos microbianos nocivos, ou mesmo a expressão de  
804 antimicrobianos que podem afetar de forma colateral os gametas.

805         Na perspectiva ômica, além das caracterizações ômicas isoladas é proposta  
806 a integração entre várias camadas de estudos ômicos, denominada multi-ômica. A  
807 multi-ômica oferece a oportunidade de entender o fluxo subjacente de informações  
808 ao processo fisiológico ou à doença de forma holística (Hasin et al. 2017). O  
809 conhecimento multi-ômico sobre a fisiologia reprodutiva saudável conduzirá a um  
810 entendimento integrado dos mecanismos bioquímicos reprodutivos de cada espécie  
811 e a maior compreensão das afecções pode possibilitar mudanças expressivas no  
812 contexto clínico e terapêutico.

813         Recentemente o estudo de Ghaemi et al. (2019) apresentaram uma  
814 modelagem multi-ômica ao longo de todo o período gestacional em mulheres  
815 integrando dados do imunoma, transcriptoma, microbioma, proteoma e metaboloma  
816 das mesmas pacientes. Este estudo possibilitou conhecer a dinâmica fisiológica sob

817 as diferentes perspectivas ômicas em gestações a termo e no futuro comparações  
818 com distúrbios gestacionais poderão indicar com grande resolução pontos-chave das  
819 patologias para intervenções (Ghaemi et al. 2019).

820 Ao se imaginar aplicações de conhecimentos multi-ômicos nas TRAs as  
821 possibilidades são exponenciais, variando desde a caracterização das biomoléculas  
822 presentes em meios utilizados e seus impactos no metabolismo dos  
823 espermatozoides e embriões, até a compreensão de complexos mecanismos  
824 transcricionais, metabólicos e de sinalização que medeiam a implantação bem-  
825 sucedida de um embrião (O'Neill 2005, Seli et al. 2010).

826 Um exemplo interessante de investigação em camundongos, sob a  
827 perspectiva multi-ômica, confirmou o maior potencial de desenvolvimento de  
828 doenças em proles obtidas por TRAs como FIV, ICSI e transferência de embriões  
829 congelados comparados aos não congelados (Chen et al. 2020). Os autores  
830 concluíram que diferentes procedimentos de TRA podem induzir anormalidades  
831 epigenéticas locais e funcionais, especialmente metilação do DNA e modificação de  
832 histonas, fornecendo uma base epigenética para os potenciais riscos de saúde a  
833 longo prazo na prole concebida por TRA (Chen et al. 2020). Resultados como estes  
834 alertam para a necessidade de analisar as TRAs com abordagens ômicas, podendo  
835 reinterpretar práticas rotineiras e selecionar técnicas que não causem impactos  
836 negativos ou até proporcionem melhorias à prole.

837 Em última instância, propõe-se que seja feita uma integração entre dados  
838 ômicos e não ômicos, como fatores ambientais, epidemiológicos e demográficos, a  
839 fim de que se obtenham estratégias analíticas integradas (Boks et al. 2009,  
840 Maturana et al. 2019). Uma importante contribuição dessa integração é trazer as  
841 conclusões altamente aprofundadas das abordagens ômicas, que demandam

842 equipamentos de alto custo e mão de obra altamente especializada, para o cotidiano  
843 clínico. Isso possibilitaria a utilização desse conhecimento com base em dados  
844 clínicos, ambientais, dentre outros que tornem a rotina clínica ou de manejo mais  
845 eficientes, contudo, sem demandar especialização em abordagens ômicas aos  
846 profissionais envolvidos em tais rotinas.

847

## 848 8 PLASMA SEMINAL

849

850 O plasma seminal representa a fração mais abundante do sêmen, sendo  
851 produzido por diferentes glândulas, mas, apesar disso, historicamente tem sido dada  
852 pouca atenção a ele em detrimento dos espermatozoides, ocorrendo muitas vezes  
853 em felídeos o descarte do plasma seminal (Chatdarong et al. 2010, Tipkantha et al.,  
854 2016). No processo de criopreservação do sêmen, o plasma é retirado ou altamente  
855 diluído, o que contribui para a diminuição dos índices de sucesso em inseminações  
856 artificiais com sêmen criopreservado em felídeos (Swanson et al. 2003, Zambelli et  
857 al. 2006, Deco-Souza et al. 2010, Capítulo dois desta tese).

858 O estudo de Henault & Killian (1996) foi pioneiro em demonstrar a  
859 importância do plasma seminal ao realizar um ensaio no qual espermatozoides de  
860 touros com grande fertilidade foram lavados e inseridos em plasma de indivíduos  
861 com baixa fertilidade, bem como o oposto. Os autores constataram que a penetração  
862 em oócitos por espermatozoides de touros de baixa fertilidade foi aumentada pelo  
863 plasma seminal de touros de alta fertilidade e, ao contrário, espermatozoides de alta  
864 fertilidade penetraram menos quando expostos ao plasma seminal de baixa  
865 fertilidade (Henault & Killian 1996).

866 Em TRAs, a suplementação de meios de criopreservação com diversos  
867 compostos tem sido avaliada, alguns apresentando melhorias no desempenho do  
868 espermatozoide após o descongelamento como a cisteína, vitamina E, ATP  
869 extracelular, dentre outros (Zambelli et al., 2006, Thuwanut et al. 2008). Uma ampla  
870 gama de antioxidantes, vitaminas, lipídios e carboidratos já foram avaliados e outros  
871 seguem sendo propostos com o intuito de aprimorar a técnica de criopreservação de  
872 sêmen (Zambelli et al., 2006, Soheila & Pavin 2020, Thuwanut et al. 2008, Güngör et  
873 al. 2021, Capítulo dois desta tese).

874 Entretanto, são pouco conhecidas e valorizadas as diversas biomoléculas  
875 que estão presentes no plasma seminal e possuem atributos moldados por milhões  
876 de anos de seleção natural espécie-específica. Hoje está claro que a composição do  
877 plasma seminal é complexa e ele possui propriedades tamponantes, nutritivas para a  
878 ativação do espermatozoide, capacitação, interação com o trato reprodutor feminino,  
879 implantação do embrião, dentre outros (Pilch & Mann 2006, Roudebush 2007). O  
880 conhecimento detalhado sobre a constituição do plasma seminal de animais férteis e  
881 subférteis provavelmente indicará biomarcadores-chave para suplementar extensões  
882 ou tratamento dos espermatozoides após a criopreservação.

883 Um dos constituintes do plasma seminal mais bem conhecido é o fator de  
884 ativação plaquetária FAP que foi descrito em coelhos e logo também identificado em  
885 embriões, sendo que a mediação pré-implantação do embrião é sua função mais  
886 bem compreendida (Benveniste et al. 1972, O'Neill, 1985). Apesar disso, o FAP  
887 também é produzido por uma variedade de outros tecidos reprodutivos, sendo  
888 encontrado no endométrio, sêmen, ovário e feto (O'Neill 2005). No sêmen, ainda se  
889 tem poucos estudos, mas sua função é sem dúvida substancial (Roudebush 2007).

890            Dessa forma, foi estabelecido que o FAP possui características pleiotrópicas,  
891 sendo fruto de um gene e influenciando várias características biológicas (Hanahan  
892 1986, Braquet et al. 1987). No embrião é produzido logo após a fertilização e  
893 persiste durante toda a fase de pré-implantação em todas as espécies de mamíferos  
894 estudadas até então (O'Neill 2005). A liberação de FAP pelo embrião causa uma  
895 série de alterações na fisiologia materna, incluindo ativação plaquetária, alterações  
896 na função imunológica do oviduto, endométrio e parto, bem como atua de forma  
897 autócrina como fator trófico inicial de sobrevivência para o embrião (O'Neill 2005).

898            Em TRAs ocorre a privação da ação do FAP, limitando a sobrevivência dos  
899 embriões, como no caso da FIV em camundongos, na qual houve redução média de  
900 30 vezes na liberação de FAP em comparação com embriões do trato reprodutivo  
901 (O'Neill 1997, 2005). De forma autócrina, o FAP estimula o metabolismo do embrião,  
902 a progressão do ciclo celular e a viabilidade do embrião (Ryan et al. 1989, Spinks e  
903 O'Neill 1988; Ryan et al. 1990; Spinks et al. 1990, Roberts et al. 1993).

904            No sêmen se sabe que o FAP é sintetizado, metabolizado e usado pelo  
905 espermatozoide (Roudebush 2007). Não está claro ainda se as glândulas que  
906 produzem o plasma também liberam FAP, mas as enzimas acetiltransferase e  
907 acetilhidrolase necessárias para ativação do FAP estão presentes no plasma  
908 (Roudebush 2007). As concentrações endógenas de FAP no sêmen estão  
909 diretamente correlacionadas com a motilidade, motilidade progressiva, reação  
910 acrossômica, interação espermatozoide-oócito, fertilização, implantação e taxas de  
911 gestação em humanos e outras espécies de mamíferos (Roudebush et al. 1990,  
912 1993, Hellstrom et al. 1991, Angle et al. 1993, Fukuda et al. 1994). É possível que o  
913 FAP seja um biomarcador para a capacitação espermática (Roudebush 2007).

914 Utilizado em TRAs, o PAF exógeno melhorou a motilidade em  
915 espermatozoides pós-descongelamento e as taxas de gestação em inseminações  
916 intrauterinas humanas (Hellstrom et al. 1991, Angle 1993, Roudebush et al. 2004).  
917 Contudo, a manipulação laboratorial pode inadvertidamente diminuir as  
918 concentrações de FAP, uma vez que esse se liga fortemente a vidrarias de  
919 borossilicato não siliconadas (Roudebush 2007).

920 Apesar de se conhecer estas importantes correlações, os mecanismos de  
921 ação do FAP ainda são pouco conhecidos, bem como a interação de FAP's de  
922 origem endometrial, seminal e embrionária na reprodução (O'Neill 2005, Roudebush  
923 2007). Como apresentado nesta revisão, abordagens ômicas possibilitam uma  
924 compreensão detalhada de mecanismos moleculares subjacentes à reprodução e  
925 poderiam ser aplicadas para obter um conhecimento mais detalhado sobre o FAP,  
926 bem como diversos outros possíveis fatores seminais menos conhecidos. O  
927 conhecimento multi-ômico do plasma seminal será um importante avanço para  
928 compreender os constituintes básicos e funções que estes desempenham na  
929 reprodução de felídeos e outros animais.

930

## 931 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

932

933 A onça-parda e o jaguarundi carecem de estudos sobre a biologia  
934 reprodutiva e reprodução assistida, sobretudo com maior cobertura de sua  
935 distribuição geográfica. Está clara a diferença entre populações de onça-parda nos  
936 EUA e América Latina, mas os estudos apresentam grande concentração em poucas  
937 populações. No jaguarundi os poucos estudos disponíveis indicam alta diversidade  
938 genética entre os indivíduos, mas poucas diferenças entre populações distantes.

939 Finalmente, acredita-se que um melhor conhecimento sobre os constituintes do  
940 plasma seminal como proteínas, lipídeos, carboidratos, microbioma e suas relações  
941 com o espermatozoide possibilitará o aprimoramento das técnicas de reprodução  
942 assistida.

943

#### 944 10 FINANCIAMENTO

945

946 O primeiro autor deste estudo recebeu bolsa de estudos da Coordenação de  
947 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

948

#### 949 11 REFERÊNCIAS

950

951 Altmäe, S, Franasiak, JM, Mändar, R, 2019. The seminal microbiome in health and  
952 disease. *Nat Rev Urol*. 16(12):703-721. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0250-y>.

953 Angelieri, CCS, Adams-Hosking, C, Ferraz, KMPMB, Souza, MP, McAlpine, CA,  
954 2016. Using species distribution models to predict potential landscape restoration  
955 effects on puma conservation. *PLoS ONE* 11(1): e0145232.  
956 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145232>

957 Angle, MJ, Tom, R, Jarvi, K, McClure, RD, 1993. Effect of platelet activating factor  
958 (PAF) on human spermatozoa-oocyte interactions. *J Reprod Fertil* 98:541–548.  
959 <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0980541>

960 Araujo, GR, Deco-Souza, T, Bergo, LCF, Silva, LC, Morato, RG, Jorge-Neto, PN,  
961 Silva, MCC, Macedo, GG, Paula, TAR, 2020<sup>b</sup>. Field friendly method for wild feline  
962 semen cryopreservation. *Journal of Threatened Taxa* 12(5): 15557–15564.  
963 <https://doi.org/10.11609/jott.5744.12.5.15557-15564>.

- 964 Araujo, GR, Paula, TAR, Deco-Souza, T, Morato, RG, Bergo, LCF, Silva, LC, Jorge-  
965 Neto, PN, Sampaio, BFB, 2020<sup>a</sup>. Colheita farmacológica de sêmen de onças-pardas  
966 (*Puma concolor*: Mammalia: Carnivora: Felidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*  
967 72(02). <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11030>
- 968 Bailey, V., 1905. Biological survey of Texas. North American Fauna, 25:1-222.  
969 <https://doi.org/10.3996/nafa.25.0001>
- 970 Barone, MA, Wildt, DE, Byers, AP, Roelke, ME, Glass, CM, Howard, JG, 1994<sup>b</sup>.  
971 Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination  
972 in the puma (*Felis concolor*). *Reproduction* 101(1): 103–108.  
973 <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010103>
- 974 Barone, MA, Roelke, ME, Howard, J, Brown, JL, Anderson, AE, Wildt, DE, 1994<sup>a</sup>.  
975 Reproductive characteristics of male Florida panthers: Comparative Studies from  
976 Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American Zoos. *Journal of*  
977 *Mammalogy* 75(1), 150–162. <https://doi.org/10.2307/1382247>
- 978 Barrett, SP, Salzman, J, 2016. Circular RNAs: analysis, expression and potential  
979 functions. *Development* 143(11): 1838-47. <https://doi.org/10.1242/dev.128074>
- 980 Benveniste, J, Henson, PM, Cochrane, CG, 1972. Leukocyte dependent histamine  
981 release from rabbit platelets: the role of Ig-E, basophils, and platelet-activating factor.  
982 *J Exp Med* 136:1356–1376. <https://doi.org/10.1084/jem.136.6.1356>.
- 983 Bilder, RM, Sabb, FW, Cannon, TD, London, ED, Jentsch, JD, Parker, DS, Poldrack,  
984 RA, Evans, C, Freimer, NB, 2009. Phenomics: the systematic study of phenotypes on  
985 a genome-wide scale. *Neuroscience* 164(1): 30–42.  
986 <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.027>

- 987 Blakeley-Ruiz, JA, Kleiner, M, 2022. Considerations for constructing a protein  
988 sequence database for metaproteomics. *Comput Struct Biotechnol J*. 20:937-952.  
989 <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.01.018>.
- 990 Boks, MP, Derks, EM, Weisenberger, DJ, Strengman, E, Janson, E, Sommer, IE,  
991 Kahn, RS, Ophoff, RA, 2009. The relationship of DNA methylation with age, gender  
992 and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One* 4(8):e6767.  
993 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006767>
- 994 Braquet, P, Touqui, L, Shen, TY, Vargaftig, BB, 1987. Perspectives in platelet  
995 activating factor research. *Pharmacol Rev*;39: 97–144.
- 996 Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018. Livro  
997 Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos. In:  
998 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (Org.). Livro Vermelho da  
999 Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: ICMBio. 622p.
- 1000 Brown, JL, Comizzoli, P, 2018. Female Cat Reproduction. *Encyclopedia of*  
1001 *Reproduction*: 692–701. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20638-9>
- 1002 Brown, JL, Terio, KA, Graham, LH, 1996. Fecal androgen metabolite analysis for  
1003 noninvasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. *Zoo Biology* 15(4):  
1004 425–434. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2361\(1996\)15:4<425:aid-zoo7>3.0.co;2-](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2361(1996)15:4<425:aid-zoo7>3.0.co;2-d)  
1005 [d](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2361(1996)15:4<425:aid-zoo7>3.0.co;2-d)
- 1006 Butt, RH, Lee, MW, Pirshahid, SA, Backlund, PS, Wood, S, Coorsen, JR, 2006. An  
1007 initial proteomic analysis of human preterm labor: placental membranes. *J Proteome*  
1008 *Res.*(11):3161-72. <https://doi.org/10.1021/pr060282n>.
- 1009 Caragiulo, A, Dias-Freedman, I, Clark, JA, Rabinowitz, S, Amato, G, 2013.  
1010 Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography of Neotropic pumas

- 1011 (*Puma concolor*). Mitochondrial DNA, 25(4), 304–312.  
1012 <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.800486>
- 1013 Caso, A, Oliveira, T, Carvajal, SV, 2015. *Herpailurus yagouaroundi*. The IUCN Red  
1014 List of Threatened Species: e.T9948A50653167. Disponível em:  
1015 <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T9948A50653167> Acesso em: 16  
1016 fev. 2022.
- 1017 Chatdarong, K, Thuwanut, P, Morrell, JM, 2010. Single-layer centrifugation through  
1018 colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology*  
1019 Jun;73(9):1284-92. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.009>.
- 1020 Chatdarong, K, 2016. Retained fertilizing capability in cryopreserved feline  
1021 spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 261–264.  
1022 <https://doi.org/10.1111/rda.12855>
- 1023 Chen, W, Peng, Y, Ma, X, Kong, S, Tan, S, Wei, Y, Qiao, J, 2020. Integrated multi-  
1024 omics reveal epigenomic disturbance of assisted reproductive technologies in human  
1025 offspring. *EBioMedicine* 61: 103076. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103076>
- 1026 Cho, Y, Hu, L, Hou, H, Lee, H, Xu, J, Kwon, S, Oh, S, Kim, HM, Jho, S, Kim, S, Shin,  
1027 Y, Kim, BC, Kim, H, Kim, C, Luo, S, Johnson, WE, Koepfli, KP, Schmidt-Küntzel, A,  
1028 Turner, JA, Marker, L, 2013. The tiger genome and comparative analysis with lion  
1029 and snow leopard genomes. *Nat Commun* 4: 2433.  
1030 <https://doi.org/10.1038/ncomms3433>
- 1031 Corona, G, Jannini, EA, Vignozzi, L, Rastrelli, G, Maggi, M, 2012. The hormonal  
1032 control of ejaculation. *Nat Rev Urol.* (9):508-19.  
1033 <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.147>

- 1034 Cucho, H, Alarcón, V, Ordóñez, C, Ampuero, E, Meza, A, Soler, C, 2016. Puma  
1035 (*Puma concolor*) epididymal sperm morphometry. *Asian J Androl.* 18(6):879-881.  
1036 <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187584>
- 1037 Culver, M, Johnson, WE, Pecon-Slattey, J, O'Brien, SJ, 2000. Genomic ancestry of  
1038 the American puma (*Puma concolor*). *Journal of Heredity* 91(3):186–197.  
1039 <https://doi.org/10.1093/jhered/91.3.186>
- 1040 Currier, MJP, 1983. *Felis concolor*. *Mammalian species* 200: 1-7.
- 1041 D'Alexandri, FL, Scolari, S, Ferreira, CR, 2010. Reproductive biology in the “omics”  
1042 era: what can be done? *Anim. Reprod* 7(3): 177-186.
- 1043 Deco-Souza, T, Paula, TAR, Costa, DS, Araújo, GR, Garay, RM, Vasconcelos, GSC,  
1044 Csermak-Junior, AC, Silva, LC, Barros, JBG, 2010. Coleta e avaliação de sêmen de  
1045 pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos mantidos em cativeiro. *Rev. Bras.*  
1046 *Reprod. Anim.* 34(4): 252-259.
- 1047 Deco-Souza, T, Paula, TAR, Costa, DS, Costa, EP, Barros, JBG, Araujo, GR,  
1048 Carreta-Jr, M, 2013. Comparação entre duas concentrações de glicerol para a  
1049 criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). *Animais Selvagens,*  
1050 *Pesq. Vet. Bras.* 33 (4). <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400015>
- 1051 DeMatteo, KE, Rinas, MA, Zurano, JP, Selleski, N, Schneider, RG, Argüelles, CF,  
1052 2017. Using niche-modelling and species-specific cost analyses to determine a  
1053 multispecies corridor in a fragmented landscape. *PLoS ONE* 12(8): e0183648.  
1054 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183648>
- 1055 Dickson, BG, Roemer, GW, McRae, BH, Rundall, JM, 2013. Models of Regional  
1056 Habitat Quality and Connectivity for Pumas (*Puma concolor*) in the Southwestern  
1057 United States. *PLoS ONE* 8(12): e81898.  
1058 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081898>

- 1059 Eaton, RL, Verlander, KA, 1977. Reproduction in the puma: biology, behavior and  
1060 ontogeny. Pp. 45-70, In: The world's cats (R. L. Eaton, ed.), Vol. 3, No.3. Carnivore  
1061 Research Inst., Burke Museum, Univ. Washington, Seattle, 144 pp.
- 1062 Erdmann, RH, Blank, MH, Ribeiro, RN, Oliveira, MJ, Cubas, ZS, Pradiee, J, Goularte,  
1063 KL, Moreira, N, 2020. Cryopreservation of margay (*Leopardus wiedii*) spermatozoa:  
1064 effects of different extenders and frozen protocols. *Theriogenology* 143: 27-34.
- 1065 Ernest, HB, Boyce, WM, Bleich, VC, May, B, Stiver, SJ, Torres, SG, 2003. Genetic  
1066 structure of mountain lion (*Puma concolor*) populations in California. *Conservation*  
1067 *Genetics* 4: 353–366. <https://doi.org/10.1023/A:1024069014911>
- 1068 Ernest, HB, Vickers, TW, Morrison, SA, Buchalski, MR, Boyce, WM, 2014. Fractured  
1069 genetic connectivity threatens a southern California Puma (*Puma concolor*)  
1070 population. *PLoS ONE* 9(10): e107985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107985>
- 1071 Ewer, RF, 1973. The carnivores. Cornell University Press, Ithaca, New York, 494 pp.  
1072 Disponível em: [https://www.cornellpress.cornell.edu/book/9780801407451/the-](https://www.cornellpress.cornell.edu/book/9780801407451/the-carnivores/#bookTabs=1)  
1073 [carnivores/#bookTabs=1](https://www.cornellpress.cornell.edu/book/9780801407451/the-carnivores/#bookTabs=1) Acesso em: 15 jan. 2022.
- 1074 Facemire, CF, Gross, TS, Guillette-Jr, LJ, 1995. Reproductive impairment in the  
1075 Florida panther: nature or nurture? *Environ Health Perspect.* 103(4):79-86.  
1076 <https://doi.org/10.1289/ehp.103-1519283>.
- 1077 Fazio, JM, Freeman, EW, Bauer, E, Rockwood, L, Brown, JL, Hope, K, Siegal-Willott,  
1078 J, Parsons, ECM, 2020. Longitudinal fecal hormone monitoring of adrenocortical  
1079 function in zoo housed fishing cats (*Prionailurus viverrinus*) during institutional  
1080 transfers and breeding introductions. *PLoS One* 15(3): e0230239.  
1081 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230239>
- 1082 Fukuda, A, Roudebush, WE, Thatcher, SS, 1994. Platelet activating factor enhances  
1083 the acrosome reaction, fertilization in vitro by subzonal sperm injection and resulting

- 1084 embryonic development in the rabbit. *Hum Reprod.* 9(1):94-9.  
1085 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138330>
- 1086 Ghaemi, MS, DiGiulio, DB, Contrepolis, K, Callahan, B, Ngo, TTM, Lee-McMullen, B,  
1087 Lehallier, B, Robaczewska, A, Mcilwain, D, Rosenberg-Hasson, Y, Wong, RJ,  
1088 Quaintance, C, Culos, A, Stanley, N, Tanada, A, Tsai, A, Gaudilliere, D, Aghaeepour,  
1089 N, 2019. Multiomics modeling of the immunome, transcriptome, microbiome,  
1090 proteome and metabolome adaptations during human pregnancy. *Bioinformatics.*  
1091 35(1):95-103. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty537>.
- 1092 Guggisberg, CAW, 1975. Wild cats of the world. Taplinger Publishing Company, New  
1093 York, 328 pp.
- 1094 Güngör, BH, Cinkara, SD, Acısu, TC, Arkalı, G, Koca, RH, Akarsu, SA, Can, C, Kaya,  
1095 Türk, G, 2021. Effect of hydrated carbon 60 fullerene on frozen ram semen quality.  
1096 *Biopreservation and biobanking, ahead of print.*  
1097 <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0001>
- 1098 Gustafson, KD, Gagne, RB, Vickers, TW, Riley, SPD, Wilmers, CC, Bleich, VC,  
1099 Pierce, BM, Kenyon, M, Drazenovich, TL, Sikich, JA, Boyce, WM, Ernest, HB, 2019.  
1100 Genetic source–sink dynamics among naturally structured and anthropogenically  
1101 fragmented puma populations. *Conserv Genet* 20: 215–227.  
1102 <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1125-0>
- 1103 Haider, S, Pal, R, 2013. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data.  
1104 *Current genomics* 14(2): 91–110. <https://doi.org/10.2174/1389202911314020003>
- 1105 Hanahan, DJ, 1986. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride.  
1106 *Annu Rev Biochem* 55:483–509.
- 1107 Hasin, Y, Seldin, M, Lusic, A, 2017. Multi-omics approaches to disease. *Genoma Biol*  
1108 18, 83. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>

- 1109 Hellstrom, WJG, Wang, R, Sikka, SC, 1991. Platelet-activating factor stimulates  
1110 motion parameters of cryopreserved human sperm. *Fertil Steril* 56:768–770.  
1111 [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)54613-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)54613-5)
- 1112 Henault, MA, Killian, GJ, 1996. Effect of homologous and heterologous seminal  
1113 plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by  
1114 penetration of zona-free bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 108(2):199-204.  
1115 <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1080199>.
- 1116 Hernández-Vargas, P, Muñoz, M, Domínguez, F, 2020. Identifying biomarkers for  
1117 predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve  
1118 reproductive outcomes. *Human Reproduction Update* 26(2): 264–301.  
1119 <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz042>
- 1120 Hibben, FC, 1937. A preliminary study of the mountain lion (*Felis oregonensis* sp.).  
1121 Univ. New Mexico Bull., *Biol. Ser.* 5(3):1-59.
- 1122 Holbrook, JD, Caso, A, Deyoung, RW, Tewes, ME, 2013. Population genetics of  
1123 jaguarundis in Mexico: Implications for future research and conservation. *Wildlife*  
1124 *Society Bulletin* 37(2): 336–341. <https://doi.org/10.1002/wsb.246>
- 1125 Holbrook, JD, DeYoung, RW, Janecka, JE, Tewes, ME, Honeycutt, RL, Young, JH,  
1126 2012. Genetic diversity, population structure, and movements of mountain lions  
1127 (*Puma concolor*) in Texas. *Journal of Mammalogy* 93(4): 989–  
1128 1000. <https://doi.org/10.1644/11-mamm-a-326.2>
- 1129 Horgan, R, Clancy, O, Myers, J, Baker, P, 2008. An overview of proteomic and  
1130 metabolomic technologies and their application to pregnancy research. *BJOG: An*  
1131 *International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 116(2): 173–181.  
1132 <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01997.x>

- 1133 Hornocker, MG, 1970. An analysis of mountain lion predation upon mule deer and elk  
1134 in the Idaho primitive area. *Wildl. Monogr.*, 21:1-39.
- 1135 Hornocker, MG, 1969. Winter territoriality in mountain lions. *Journal of Wildlife*  
1136 *Management* 33(3): 457-464.
- 1137 Howard, JG, 1993. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In: Zoo  
1138 and Wildlife Animal Medicine: Current Therapy III. Fowler, M. E. and Miller, R. E.,  
1139 editors. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co, 390–399.
- 1140 Hulley, JT, 1976. Maintenance and breeding of captive jaguarundis *Felis*  
1141 *yagouaroundi* at Chester Zoo and Toronto. *International Zoo Yearbook* 16: 120-122.
- 1142 Hunter, JS, 1921. The control of the mountain lion in California. *Calif. Fish and Game*  
1143 7: 99-101.
- 1144 Jayaraman, V, Ghosh, S, Sengupta, A, Srivastava, S, Sonawat, HM, Narayan, PK,  
1145 2014. Identification of biochemical differences between different forms of male  
1146 infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *J Assist Reprod Genet*  
1147 31: 1195–1204. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0282-4>
- 1148 Johnson, L, Petty, CS, Neves, WB, 1981. A new approach to qualification of  
1149 spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human  
1150 spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 25: 217-226.
- 1151 Johnson, WE, Eizirik, E, Pecon-Slattery, J, Murphy, WJ, Antunes, A, Teeling, E,  
1152 O'Brien, SJ, 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic  
1153 assessment. *Science* 311(5757): 73-7. <https://doi.org/10.1126/science.1122277>
- 1154 Johnson, WE, Onorato, DP, Roelke, ME, Land, ED, Cunningham, M, Belden, RC,  
1155 McBride, R, Jansen, D, Lotz, M, Shindle, D, Howard, J, Wildt, DE, Penfold, LM,  
1156 Hostetler, JA, Oli, MK, O'Brien, SJ, 2010. Genetic Restoration of the Florida Panther.  
1157 *Science* 329(5999): 1641–1645. <https://doi.org/10.1126/science.1192891>

- 1158 Johnson, WE, Eizirik, E, Pecon-Slattery, J, Murphy, WJ, Antunes, A, Teeling, E,  
1159 O'Brien, SJ, 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic  
1160 assessment. *Science* 311(5757): 73-7. <https://doi.org/10.1126/science.1122277>
- 1161 Kenny, LC, Dunn, WB, Ellis, DI, Myers, J, Baker, PN, Kell, DB, 2005. Novel  
1162 biomarkers for pre-eclampsia detected using metabolomics and machine learning.  
1163 *Metabolomics* 1, 227. <https://doi.org/10.1007/s11306-005-0003-1>.
- 1164 Kitchener, AC, Breitenmoser-Würsten, CH, Eizirik, E, Gentry, A, Werdelin, L, Wilting,  
1165 A, Yamaguchi, N, Abramov, AV, Tobe, S, 2017. A revised taxonomy of the Felidae.  
1166 The final report of the Cat Classification Task Force of the IUCN/SSC Cat Specialist  
1167 Group. *Cat News Special Issue* 11, 80 pp.
- 1168 Koboldt, DC, Steinberg, KM, Larson, DE, Wilson, RK, Mardis, ER, 2013. The next-  
1169 generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 155(1):27-38.  
1170 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.006>.
- 1171 Kochan, J, Niżański, W, Moreira, N, Cubas, ZS, Nowak, A, Prochowska, S, Partyka,  
1172 A, Młodawska, W, Skotnicki, J, 2019. ARTs in wild felid conservation programs in  
1173 Poland and in the World. *J Vet Res.* (3):457-464. [https://doi.org/10.2478/jvetres-](https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0043)  
1174 [2019-0043](https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0043).
- 1175 Leite, FLG, Paula, TAR, Matta, SLP, Fonseca, CC, Neves, MTD, Barros, JBG, 2006.  
1176 Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Animal*  
1177 *Reproduction Science* 91(3-4): 307–316. [https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.003)  
1178 [04.003](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.003)
- 1179 Leopold, AS, 1959. *Wildlife of Mexico*. University of California Press, Berkeley, 568  
1180 pp.

- 1181 Lindzey, FG, Van Sickle, WD, Ackerman, BB, Barnhurst, D, Hemker, TP, Laing, SP,  
1182 1994. Cougar population dynamics in southern Utah. *The Journal of Wildlife*  
1183 *Management* 58(4): 619-624.
- 1184 López-Gonzales, CA, Gonzáles-Romero, A, 1998. A synthesis of current literature  
1185 and knowledge about the ecology of the puma (*Puma concolor* Linnaeus). *Acta*  
1186 *Zoológica Mexicana* (75): 171-190. <https://doi.org/10.21829/azm.1998.75751713>
- 1187 Lordan, R, Tsoupras, A, Zabetakis, I, Demopoulos, CA, 2019. Forty years since the  
1188 structural elucidation of platelet-activating factor (PAF): historical, current, and future  
1189 research perspectives. *Molecules* 24(23):4414.  
1190 <https://doi.org/10.3390/molecules24234414>
- 1191 Loxterman, JL, 2011. Fine scale population genetic structure of pumas in the  
1192 Intermountain West. *Conservation Genetics* 12: 1049–1059.  
1193 <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0208-y>
- 1194 Madrigal-Valverde, M, 2019. Criopreservação de espermatozoides de felídeos  
1195 domésticos e silvestres. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência  
1196 Animal nos Trópicos) Universidade Federal da Bahia. 136 p.
- 1197 Maehr, DS, Land, ED, Roelke, ME, 1991. Mortality patterns of panthers in Southwest  
1198 Florida. *Proc. Annu. Conf. Southeast. Fish and Wildl. Agencies* 45:201-207.
- 1199 Maehr, DS, Land, ED, Shindle, DB, Bass, OL, Hctor, TS, 2002. Florida panther  
1200 dispersal and conservation. *Biological Conservation* 106(2): 187–  
1201 197. [https://doi.org/10.1016/s0006-3207\(01\)00245-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3207(01)00245-2)
- 1202 Maehr, DS, Roof, JC, Land, ED, McCown, JW, 1989. First reproduction of a panther  
1203 (*Felis concolor coryi*) in southwestern Florida, U.S.A. *Mammalia* 53(1): 129-131.

- 1204 Mändar, R, Punab, M, Borovkova, N, Lapp, E, Kiiker, R, Korrovits, P, Truu, J, 2015.  
1205 Complementary seminovaginal microbiome in couples. *Research in Microbiology*  
1206 166(5): 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.03.009>
- 1207 Mansfield, KG, Land, ED, 2002. Cryptorchidism in Florida panthers: prevalence,  
1208 features, and influence of genetic restoration. *J Wildl Dis.* 38(4):693-8.  
1209 <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.4.693>.
- 1210 Maturana, LE, Alonso, L, Alarcón, P, Martín-Antoniano, IA, Pineda, S, Piorno, L,  
1211 Calle, ML, Malats, N, 2019. Challenges in the integration of omics and non-omics  
1212 data. *Genes*; 10(3):238. <https://doi.org/10.3390/genes10030238>
- 1213 Monteiro, C, Marques, PI, Cavadas, B, Damião, I, Almeida, V, Barros, N, Barros, A,  
1214 Carvalho, F, Gomes, S, Seixas, S, 2018. Characterization of microbiota in male  
1215 infertility cases uncovers differences in seminal hyperviscosity and  
1216 oligoasthenoteratozoospermia possibly correlated with increased prevalence of  
1217 infectious bacteria. *Am J Reprod Immunol.* 79(6):e12838.  
1218 <https://doi.org/10.1111/aji.12838>.
- 1219 Moreno, VR, Grisolia, AB, Campagnari, F, Milazzotto, M, Adania, CH, Garcia, JF,  
1220 Souza, EB, 2006. Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor*  
1221 and *Panthera onca* (Mammalia, Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites.  
1222 *Genetics and Molecular Biology* 29(2): 290-293.
- 1223 Müller, K, Eder, S, Jakop, U, Schiller, J, Müller, P, Bashawat, M, 2020. Assisted  
1224 reproduction for felid species conservation-sperm competences at risk. *Reprod*  
1225 *Domest Anim.* 55(2):55-60. <https://doi.org/10.1111/rda.13581>.
- 1226 Murphy, SM, Wilckens, DT, Augustine, BC, Peyton, MA, Harper, GC, 2019.  
1227 Improving estimation of puma (*Puma concolor*) population density: clustered camera-

- 1228 trapping, telemetry data, and generalized spatial mark-resight models. *Sci Rep* 9:  
1229 4590. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40926-7>
- 1230 Nielsen, C, Thompson, D, Kelly, M, Lopez-Gonzalez, CA, 2015. *Puma concolor*  
1231 (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species:  
1232 e.T18868A97216466. [https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-](https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T18868A50663436.en)  
1233 4.RLTS.T18868A50663436.en.
- 1234 Nogueira, GP, Silva, JCR, 1997. Plasma cortisol levels in captive wild felines after  
1235 chemical restraint. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30(11):  
1236 1359–1361. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1997001100016>
- 1237 Norkaew, T, Brown, JL, Bansiddhi, P, Somgird, C, Thitaram, C, Punyapornwithaya,  
1238 V, Punturee, K, Vongchan, P, Somboon, N, Khonmee, J, 2019. Influence of season,  
1239 tourist activities and camp management on body condition, testicular and adrenal  
1240 steroids, lipid profiles, and metabolic status in captive Asian elephant bulls in  
1241 Thailand. *PLoS One* 14(3):e0210537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210537>.
- 1242 Nowak, RM, 1992. Walker's mammals of the world. Fifth ed. The Johns Hopkins  
1243 University Press, Baltimore, 2:643-1629.
- 1244 Ochoa, A, Onorato, DP, Fitak, RR, Roelke-Parker, ME, Culver, M, 2019. De novo  
1245 assembly and annotation from parental and F1 Puma genomes of the Florida  
1246 Panther genetic restoration program. *G3 Genes|Genomes|Genetics* g3.400629.2019.  
1247 <https://doi.org/10.1534/g3.119.400629>
- 1248 Oliveira, TG, 1998. *Herpailurus yagouaroundi*. Mammalian species 578, pp. 1-6.
- 1249 Oliveira, TG, 1994. Neotropical cats: ecology and conservation. Edufma, São Luis,  
1250 Brazil, 220 pp.
- 1251 O'Neill, C, 1985. Partial characterization of the embryo-derived platelet activating  
1252 factor in mice. *J Reprod Fertil* 75: 375–380. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0750375>

- 1253 O'Neill, C, 1997. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for  
1254 development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol Reprod.* 56(1):229-37.  
1255 <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.1.229>
- 1256 O'Neill, C, 2005. The role of paf in embryo physiology. *Hum Reprod Update*  
1257 11(3):215-28. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi003>
- 1258 Pacheco, SE, Houseman, EA, Christensen, BC, Marsit, CJ, Kelsey, KT, Sigman, M,  
1259 Boekelheide, K, 2011. Integrative DNA methylation and gene expression analyses  
1260 identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility  
1261 sperm. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020280>
- 1262 Patti, GJ, Yanes, O, Siuzdak, G, 2012. Innovation: Metabolomics: the apogee of the  
1263 omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(4):263-9. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- 1264 Penfold, LM, Criffield, M, Cunningham, MW, Jansen, D, Lotz, M, Shea, C, Onorato,  
1265 D, 2022. Long-term evaluation of male Florida panther (*Puma concolor coryi*)  
1266 reproductive parameters following genetic introgression, *Journal of Mammalogy*,  
1267 gyac029. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyac029>
- 1268 Pilch, B, Mann, M, 2006. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of  
1269 human seminal plasma. *Genome biology* 7(5): R40. [https://doi.org/10.1186/gb-2006-](https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-5-r40)  
1270 [7-5-r40](https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-5-r40)
- 1271 Pontius, JU, Mullikin, JC, Smith, DR, Lindblad-Toh, K, Gnerre, S, Clamp, M, Chang,  
1272 J, Stephens, R, Neelam, B, Volfovsky, N, Tesler, G, 2007. NISC Comparative  
1273 Sequencing Program, O'Brien S. J. Initial sequence and comparative analysis of the  
1274 cat genome. *Genome Research* 17(11), 1675–1689, 2007.  
1275 <https://doi.org/10.1101/gr.6380007>
- 1276 Pope, C, Johnson, C, McRae, M, Keller, G, Dresser, B, 1998. Development of  
1277 embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Animal*

- 1278   Reproduction   *Science*   53(1-4):   221–236.   <https://doi.org/10.1016/s0378->  
1279   4320(98)00115-8
- 1280   Pukazhenth, BS, Neubauer, K, Jewgenow, K, Howard, J, Wildt, DE, 2006. The  
1281   impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild  
1282   relatives.                           *Theriogenology*                           66(1):112-21.  
1283   <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.020>.
- 1284   Putman, SB, Brown, JL, Saffoe, C, Franklin, AD, Pukazhenth, BS, 2019. Linkage  
1285   between fecal androgen and glucocorticoid metabolites, spermaturia, body weight  
1286   and onset of puberty in male African lions (*Panthera leo*). *PLoS One* 14(7):e0217986.  
1287   <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217986>
- 1288   Rabb, GB, 1959. Reproductive and vocal behavior in captive pumas, *Journal of*  
1289   *Mammalogy* 40(4): 616–617. <https://doi.org/10.2307/1376293>
- 1290   Reddy, PA, Kothandaraman, H, Arun, PVPS, Challagandla, A, Baghel, DS, 2018.  
1291   High coverage genome sequencing and identification of genomic variants in Bengal  
1292   tiger (*Panthera tigris tigris*). *bioRxiv* 306399. <https://doi.org/10.1101/306399>
- 1293   Roberts, C, O'Neill, C, Wright, L, 1993. Platelet activating factor (PAF) enhances  
1294   mitosis in preimplantation mouse embryos. *Reprod Fertil Dev* 5: 271–279.  
1295   <https://doi.org/10.1071/rd9930271>.
- 1296   Robinette, WL, Gashwiler, JS, Morris, OW, 1961. Notes of cougar productivity and  
1297   life history. *J. Mammal.* 42(2): 204-217. <https://doi.org/10.2307/1376830>
- 1298   Roelke, ME, Martenson, JS, O'Brien, SJ, 1993. The consequences of demographic  
1299   reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Current Biology*  
1300   3(6): 340–350. [https://doi.org/10.1016/0960-9822\(93\)90197-v](https://doi.org/10.1016/0960-9822(93)90197-v)
- 1301   Rolland, AD, Lavigne, R, Dauly, C, Calvel, P, Kervarrec, C, Freour, T, Evrard, B,  
1302   RiouxLeclercq, B, Auger, J, Pineau, C, 2012. Identification of genital tract markers in

- 1303 the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Hum Reprod* 28:  
1304 199–209. <https://doi.org/10.1093/humrep/des360>
- 1305 Ross, PI, Jalkotzy, MG, 1992. Characteristics of a hunted population of cougars in  
1306 southwestern Alberta. *The Journal of Wildlife Management* 56(3): 417-426.
- 1307 Roudebush, WE, 2007. Seminal platelet-activating factor. *Semin Thromb Hemost.*  
1308 33(1):69-74. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958464>.
- 1309 Roudebush, WE, Fukuda, AI, Minhas, BS, 1993. Enhanced embryo development of  
1310 rabbit oocytes fertilized in vitro with platelet activating factor (PAF) treated sperm. *J*  
1311 *Assist Reprod Genet* 10:91–94.
- 1312 Roudebush, WE, Massey, JB, Toledo, AA, Kort, HI, MitchellLeef, D, Elsner, CW,  
1313 2004. Platelet-activating factor significantly enhances intrauterine insemination  
1314 pregnancy rates. *Fertil Steril* 82:52–56.
- 1315 Roudebush, WE, Minhas, BS, Ricker, DD, Palmer, TV, Dodson, MG, 1990. Platelet  
1316 activating factor enhances in vitro fertilization of rabbit oocytes. *Am J Obstet Gynecol*  
1317 163:1670–1673. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(90\)90648-q](https://doi.org/10.1016/0002-9378(90)90648-q)
- 1318 Ruiz-García, M, Pinedo-Castro, M, 2013. Population genetics and phylogeographic  
1319 analyses of the jaguarundi (*Puma yagouarundi*) by means of three mitochondrial  
1320 markers: The first molecular population study of this species. In: Ruiz-Garcia, M,  
1321 Shostell, JM. Molecular population genetics, evolutionary biology and biological  
1322 conservation of neotropical carnivores. Nova Science Publishers, Inc.
- 1323 Ruiz-García, M, Pinedo-Castro, M, Shostell, JM, 2018. Mitogenomics of the  
1324 jaguarundi (*Puma yagouarundi*, Felidae, Carnivora): disagreement between  
1325 morphological subspecies and molecular data. *Mammalian Biology.*  
1326 <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.09.004>

- 1327 Ryan, JP, Spinks, NR, O'Neill, C, Wales, RG, 1990. Implantation potential and fetal  
1328 viability of mouse embryos cultured in media supplemented with platelet activating  
1329 factor. *J Reprod Fertil* 89: 309–315. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0890309>.
- 1330 Ryan, JP, Spinks, NR, O'Neill, C, Ammit, AJ, Wales, RG, 1989. Platelet activating  
1331 factor (PAF) production by mouse embryos in-vitro and its effects on embryonic  
1332 metabolism. *J Cell Biochem* 40: 387–395. <https://doi.org/10.1002/jcb.240400314>
- 1333 Saremi, NF, Supple, MA, Byrne, A, Cahill, JA, Coutinho, LL, Dalén, L, Figueiró, HV,  
1334 Johnson, WE, Milne, HJ, O'Brien, SJ, O'Connell, B, Onorato, DP, Riley, SPD, Sikich,  
1335 JA, Stahler, DR, Villela, PMS, Vollmers, C, Wayne, RK, Eizirik, E, Corbett-Detig, RB,  
1336 Green, RE, Wilmers, CC, Shapiro, B, 2019. Puma genomes from North and South  
1337 America provide insights into the genomic consequences of inbreeding. *Nat Commun*  
1338 10: 4769. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12741-1>
- 1339 Saremi, NF, Supple, MA, Byrne, A, Cahill, JA, Coutinho, LL, Dalén, L, Figueiró, HV,  
1340 Johnson, WE, Milne, HJ, O'Brien, SJ, Shapiro, B, 2019. Puma genomes from North  
1341 and South America provide insights into the genomic consequences of inbreeding.  
1342 *Nature Communications* 10(1): 4769. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12741-1>
- 1343 Seidensticker, JCIV, Hornocker, MG, Wiles, WV, Messick, JP, 1973. Mountain lion  
1344 social organization in the Idaho Primitive Area. *Wildl. Monogr.* 35: 1-60.
- 1345 Seli, E, Robert, C, Sirard, MA, 2010. OMICS in assisted reproduction: possibilities  
1346 and pitfalls. *Molecular Human Reproduction* 16(8): 513–530.  
1347 <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq041>
- 1348 Silva, VHD, 2014. Avaliação do processo espermatogênico de gatos-mouriscos  
1349 (*Puma yagouarundi*, Lacépède, 1809) adultos. Dissertação (Programa de Pós-  
1350 Graduação em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Viçosa. 54 f.

- 1351 Sinha, A, Singh, V, Yadav, S, 2017. Multi-omics and male infertility: status,  
1352 integration and future prospects. *Frontiers In Bioscience, Scholar* 9: 375-394.  
1353 <https://doi.org/10.2741/s493>
- 1354 Soheila, P, Parvin, S, 2020. The effect of free radicals on sperm DNA and antioxidant  
1355 protective role; an assessment and review. *Reviews in Clinical Medicine* 7(1): 37-42.
- 1356 Souza, A, Boffo, E, Azzolini, F, Moreira, N, Oliveira, MJ, Ribeiro, RN, Erdmann, RH,  
1357 2021. Monitoramento endócrino para identificação da puberdade em gato-mourisco  
1358 (*Herpailurus yagouaroundi*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*). *PUBVET*  
1359 15(2): a746. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n02a746.1-8>
- 1360 Spinks, NR, O'Neill, C, 1988. Antagonists of embryo-derived platelet activating factor  
1361 prevent implantation of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 84: 89–98.  
1362 <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0840089>.
- 1363 Spinks, NR, Ryan, JP, O'Neill, C, 1990. Antagonists of embryo-derived platelet  
1364 activating factor act by inhibiting the ability of the mouse embryo to implant. *J Reprod*  
1365 *Fertil* 88: 241–248. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880241>.
- 1366 Stoner, DC, Wolfe, ML, Mecham, C, Mecham, MB, Durham, SL, Choate, DM, 2013.  
1367 Dispersal behaviour of a polygynous carnivore: do cougars *Puma concolor* follow  
1368 source-sink predictions? *Wildlife Biology* 19(3): 289-301. [https://doi.org/10.2981/12-](https://doi.org/10.2981/12-124)  
1369 124
- 1370 Štšepetova, J, Baranova, J, Simm, J, 2020. The complex microbiome from native  
1371 semen to embryo culture environment in human *in vitro* fertilization procedure.  
1372 *Reprod Biol Endocrinol* 18: 3. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0562-z>
- 1373 Swanson, WF, Johnson, WE, Cambre, RC, Citino, SB, Quigley, KB, Brousset, DM,  
1374 Morais, RN, Moreira, N, O'Brien, SJ, Wildt, DE, 2003. Reproductive status of

- 1375 endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ  
1376 conservation. *Zoo Biology* 22(5): 421–441. <https://doi.org/10.1002/zoo.10093>
- 1377 Tamazian, G, Dobrynin, P, Zhuk, A, Zhernakova, DV, Perelman, PL, Serdyukova,  
1378 NA, Graphodatsky, AS, Komissarov, A, Kliver, S, Cherkasov, N, Scott, AF, 2021.  
1379 Draft de novo genome assembly of the elusive jaguarundi, *Puma yagouaroundi*.  
1380 *Journal of Heredity* 112(6): 540-548.
- 1381 Thuwanut, P, Chatdarong, K, Techakumphu, M, Axne´r, E, 2008. The effect of  
1382 antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-  
1383 thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenol* 70:233–40.
- 1384 Tipkantha, W, Thuwanut, P, Morrell, J, Comizzoli, P, Chatdarong, K, 2016. Influence  
1385 of living status (single vs. paired) and centrifugation with colloids on the sperm  
1386 morphology and functionality in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*).  
1387 *Theriogenology* pii: S0093-691X(16)30329-6.  
1388 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.02>
- 1389 Trapnell, C, Williams, BA, Pertea, G, Mortazavi, A, Kwan, G, van Baren, MJ,  
1390 Salzberg, SL, Wold, BJ, Pachter, L, 2010. Transcript assembly and quantification by  
1391 RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell  
1392 differentiation. *Nat Biotechnol.* 28(5): 511-5. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- 1393 Urduingio, RG, Bayón, GF, Dmitrijeva, M, Toraño, EG, Bravo, C, Fraga, MF, Bassas,  
1394 L, Larriba, S, Fernández, AF, 2015. Aberrant DNA methylation patterns of  
1395 spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod* 30: 1014–1028.  
1396 <https://doi.org/10.1093/humrep/dev053>
- 1397 Vickers, TW, Sanchez, JN, Johnson, CK, Morrison, SA, Botta, R, Smith, T, 2015.  
1398 Survival and mortality of Pumas (*Puma concolor*) in a fragmented, urbanizing

1399 landscape. *PLoS ONE* 10(7): e0131490.  
1400 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131490>

1401 Walker, CW, Harveson, LA, Pittman, MT, Tewes, ME, Honeycutt, RL,  
1402 2000. Microsatellite variation in two populations of Mountain Lions (*Puma concolor*) in  
1403 Texas. *The Southwestern Naturalist* 45(2): 196. <https://doi.org/10.2307/3672461>

1404 Weigel, I, 1975. Small felids and clouded leopards. Pp, 281-332, In: Grzimek's animal  
1405 life encyclopedia (R. Altevogt, R. Angermann, H. Dathe, B. Grzimek, K. Herter, D.  
1406 Muller-Using, U. Rahm, and E. Thenius, eds.), Van Nostrand Reinhold, New York,  
1407 12:1-657.

1408 Weng, SL, Chiu, CM, Lin, FM, Huang, WC, Liang, C, Yang, T, 2014. Bacterial  
1409 communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing  
1410 reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS ONE* 9(10):  
1411 e110152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110152>

1412 Wildt, DE, Phillips, LG, Simmons, LG, Chakraborty, PK, Brown, JL, Howard, JG,  
1413 Teare, A, Bush, M, 1988. A comparative analysis of ejaculate and hormonal  
1414 characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard and puma. *Biology of*  
1415 *Reproduction* 38 245-255. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.2.245>

1416 Wultsch, C, Waits, LP, Kelly, MJ, 2016. A comparative analysis of genetic diversity  
1417 and structure in jaguars (*Panthera onca*), pumas (*Puma concolor*), and ocelots  
1418 (*Leopardus pardalis*) in fragmented landscapes of a critical mesoamerican linkage  
1419 zone. *PLoS ONE* 11(3): e0151043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151043>

1420 Young, SP, Goldman, EA, 1946. The puma, mysterious American cat. Dover  
1421 Publication Inc, New York, 358. Disponível em:  
1422 [https://archive.org/details/pumamysteriousam00youn/page/n5/mode/2up?view=theat](https://archive.org/details/pumamysteriousam00youn/page/n5/mode/2up?view=theater)  
1423 er Acesso em: 13 jan. 2022.

- 1424 Zanin, M, Palomares, F, Brito, D, 2015. What we (don't) know about the effects of  
1425 habitat loss and fragmentation on felids. *Oryx*, 49(1), 96-106.  
1426 <https://doi.org/10.1017/S0030605313001609>
- 1427 Zambelli, D, Merlo, B, Iacono, E, Prati, F, Belluzzi, S, 2006. Fertilizing ability of  
1428 electro-ejaculated cryopreserved semen in the domestic cat. *Reproduction in*  
1429 *Domestic Animals* 41(2): 137–141. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00654.x>
- 1430 Zeller, KA, Vickers, TW, Ernest, HB, Boyce, WM, 2017. Multi-level, multi-scale  
1431 resource selection functions and resistance surfaces for conservation planning:  
1432 Pumas as a case study. *PLoS ONE* 12(6): e0179570.  
1433 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179570>
- 1434 Zhang, WQ, Zhang, MH, 2013. Complete mitochondrial genomes reveal phylogeny  
1435 relationship and evolutionary history of the family Felidae. *Genet Mol Res.*  
1436 12(3):3256-62. <https://doi.org/10.4238/2013.September.3.1>
- 1437
- 1438

1439 **TABELA 1** – Resumo de avaliações biométricas e espermáticas de machos de *Puma*  
 1440 *concolor* e *Puma yagouaroundi* compilados de estudos publicados. Dados\* são  
 1441 apresentados em média e amplitude.

Parâmetros <sup>&amp;</sup>	<i>P. concolor</i>	<i>P. yagouaroundi</i>
Volume testicular (cm <sup>3</sup> )	17,76 (9,6-26,6) <sup>[1,3,4]</sup>	2,56 (1,1-5,4) <sup>[1,2,3]</sup>
Massa testicular <sup>#</sup> (g)	17,76 (9,6-26,6) <sup>[1,3,4]</sup>	2,56 (1,1-5,4) <sup>[1,2,3]</sup>
Índice gonadossomático (%)	0,03 <sup>[1,5]</sup> (0,02-0,04)	0,04 (0,02-0,11) <sup>[1,2]</sup>
Tônus testicular <sup>\$</sup>	1,86 (1,83-1,90) <sup>[1,5]</sup>	2,50 <sup>[1]</sup>
Volume seminal (ml)	1,96 (0,4-3,90) <sup>[1,3,4,5,6,7]</sup>	0,10 (0,03-0,55) <sup>[1,4]</sup>
Concentração (x 10 <sup>6</sup> /ml)	62,17 (4,80-205) <sup>[1,3,4,5,6,7]</sup>	11,00 (7,20-55) <sup>[1,4]</sup>
Motilidade (%)	62,63 (38,20-80) <sup>[1,3,4,5,6,7]</sup>	50,99 (10-80) <sup>[1]</sup>
IME (%)	67,73 (52,50-80,00) <sup>[1,4,6,8]</sup>	50,86 (30-80) <sup>[1,4]</sup>
Morfologia anormal (%)	63,37 (53,88-73,50) <sup>[1,4,6,9]</sup>	65,90 (42,50-84,62) <sup>[1,4]</sup>
Comprimento da cabeça (µm)	5,18 (4,23 - 6,69) <sup>[1,10]</sup>	5,56 (2,68-8,72) <sup>[1]</sup>
Largura da cabeça (µm)	2,87 (2,27 - 3,81) <sup>[1,10]</sup>	3,27 (2,23-5,30) <sup>[1]</sup>
Área da cabeça (µm <sup>2</sup> )	12,13 (8,59 – 17,72) <sup>[1,10]</sup>	14,42 (5,62-33,08) <sup>[1]</sup>
Perímetro da cabeça (µm)	18,46 (11,69 – 26,84) <sup>[1,10]</sup>	23,99 (11,09-36,80) <sup>[1]</sup>

1442 **Legenda:** \*Médias simples foram calculadas a partir de dados obtidos de estudos para cada  
 1443 indivíduo e/ou média das amostras do estudo. A amplitude foi obtida dos mesmos estudos,  
 1444 considerando o menor e maior valor observado para cada parâmetro; IME - Índice de  
 1445 motilidade espermática; <sup>&</sup>Foram utilizados apenas dados provenientes de sêmen obtido por  
 1446 eletroejaculação; <sup>[1]</sup>Capítulo dois desta tese, <sup>[2]</sup>Silva (2014), <sup>[3]</sup>Barone et al. (1994<sup>a</sup>),  
 1447 <sup>[4]</sup>Swanson et al. (2003), <sup>[5]</sup>Deco-Souza et al. (2010), <sup>[6]</sup>Wildt et al. (1988), <sup>[7]</sup>Deco-Souza et al.  
 1448 (2013), <sup>[8]</sup>Barone et al. (1994<sup>b</sup>), <sup>[9]</sup>Araujo et al. (2020<sup>a</sup>), <sup>[10]</sup>Cucho et al. (2016). <sup>\$</sup>O tônus  
 1449 testicular foi categorizado como duro=1, normal=2 e flácido=3; <sup>#</sup>no cálculo da média foram  
 1450 inseridos dados de massa obtidos a partir do volume testicular, pois segundo Johnson et al.

1451 (1981) a densidade do testículo é muito próxima a 1, podendo ser convertido o volume em  
1452 massa diretamente.

**CAPÍTULO 2**  
**AVALIAÇÃO DE SÊMEN OBTIDO POR CATETERIZAÇÃO URETRAL E**  
**ELETROEJACULAÇÃO EM JAGUARUNDI (*Puma yagouarundi*)**

Artigo formatado segundo as diretrizes do periódico *Theriogenology*.

1 **Avaliação de sêmen obtido por cateterização uretral e eletroejaculação em**  
2 **jaguarundi (*Puma yagouaroundi*)**

3  
4 Dieferson da Costa Estrela<sup>1</sup>, Bruna de Oliveira Mendes<sup>2</sup>, Guilherme Malafaia<sup>3</sup>,  
5 Antonio Campanha Martinez<sup>4</sup>, Jessica da Silva Paulinho<sup>5</sup>, Cristina Harumi Adania<sup>5</sup>,  
6 Nei Moreira<sup>6</sup>

7  
8 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná,  
9 Paraná, Brasil. Instituto Federal Sul-rio-grandense – Campus Avançado Jaguarão,  
10 Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: [diefersonestrela@gmail.com](mailto:diefersonestrela@gmail.com)

11 <sup>2</sup>Mestre em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado.

12 <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado.  
13 Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, Goiás, Brasil.

14 <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal,  
15 Universidade Estadual de Maringá – Campus Regional de Umuarama, Paraná,  
16 Brasil.

17 <sup>5</sup>Associação Mata Ciliar, Jundiaí, São Paulo, Brasil.

18 <sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Biociências,  
19 Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil.

20  
21 **Destaques**

22 - Sêmen coletado com sucesso de jaguarundi através de cateterização uretral (CU)

23 - A baixa qualidade do sêmen da CU inviabilizou a criopreservação

24 - As duas modalidades de eletroejaculação testadas registraram valores superiores  
25 à CU

26 - Não houve diferença entre eletroejaculação após CU (CU-EEJ) e eletroejaculação  
27 isolada

28 - Algumas amostras de CU-EEJ apresentaram células sanguíneas

29

## 30 RESUMO

31

32 A cateterização uretral (método Zambelli) é uma técnica alternativa à  
33 eletroejaculação para coleta de sêmen. Os resultados com felídeos selvagens  
34 demonstraram eficácia em nove espécies até o momento, apesar da considerável  
35 variação entre indivíduos e baixo número amostral de alguns estudos. Diante do  
36 potencial inovador da técnica, este estudo teve como objetivo avaliar um protocolo  
37 de coleta de sêmen por cateterização uretral seguido de eletroejaculação em *Puma*  
38 *yagouaroundi* e compará-lo à eletroejaculação isolada. Para isso foram realizadas  
39 cinco coletas em seis machos com idade entre 2 e 13 anos, mantidos na Associação  
40 Mata Ciliar, Jundiaí, estado de São Paulo, Brasil. O sêmen foi coletado com  
41 cateterização uretral (CU) seguida de eletroejaculação (CU-EEJ em três coletas  
42 (n=18) e com eletroejaculação (EEJ – n=10) exclusivamente em duas (n=10). Os  
43 indivíduos foram contidos com puçá e anestesiados via IM com dexmedetomidina  
44 (0,005 mg/kg – Dexdomitor®, Zoetis, Campinas, Brasil) associada à cetamina (10  
45 mg/kg – Quetamina®, Vetnil, São José dos Campos, Brasil). O número de  
46 espermatozoides vivos foi analisado utilizando coloração de eosina-nigrosina e  
47 expresso em percentual no parâmetro vitalidade. A técnica de CU foi eficaz para  
48 coleta de sêmen em 57% (n=10) dos animais, mas em nenhum animal foi obtido  
49 sêmen em todas as coletas. Em 18 tentativas foram obtidas seis amostras de sêmen  
50 com volume médio de  $3,53 \pm 0,69$  (SD)  $\mu\text{L}$ , das quais apenas uma apresentou  
51 qualidade compatível com congelamento (vigor 3, motilidade de 80% e 88% de  
52 vitalidade). As demais apresentaram vigor  $1,86 \pm 0,86$ , motilidade de  $21,32 \pm 12,59\%$   
53 e  $27,6 \pm 13,05\%$  de vitalidade. Devido ao baixo volume das amostras não foi  
54 possível avaliar suas concentrações. As amostras provenientes de CU-EEJ e EEJ  
55 apresentaram em média, respectivamente, vigor  $3,00 \pm 0,93$  e  $3,13 \pm 0,67$ ,  
56 motilidade  $52,50 \pm 25,36\%$  e  $54,09 \pm 20,47\%$  e vitalidade  $58,5 \pm 24,50\%$  e  $62,78 \pm$   
57  $16,28\%$ . As amostras de CU-EEJ e EEJ foram iguais e ambas superiores à CU nos  
58 parâmetros qualitativos. Em conclusão, a técnica de CU foi eficaz, mas com a baixa  
59 dose de dexmedetomidina utilizada os resultados foram incompatíveis com a  
60 criopreservação de sêmen e inferiores à eletroejaculação.

61

62 Palavras-chave: Ejaculação farmacológica; *Herpailurus yagouaroundi*; Gato-  
63 mourisco; alpha-2-agonista; dexmedetomidina.

64

## 65 2.1 INTRODUÇÃO

66

67 A criopreservação de gametas e a construção de bancos genéticos têm se  
68 concretizado como importantes ferramentas em potencial para auxiliar na  
69 conservação de espécies de felídeos ameaçadas de extinção [1,2,3]. Devido às  
70 dificuldades de criopreservação de gametas femininos, a utilização de sêmen é mais  
71 frequente, sendo que a busca por técnicas eficientes e menos arriscadas para os  
72 animais é constante. Recentemente, tem sido avaliada a técnica de coleta de sêmen  
73 por cateterização uretral (CU) em felídeos selvagens, como alternativa à  
74 eletroejaculação, método mais frequentemente empregado [4].

75 Este método foi proposto por Zambelli et al. (2004, apud [5]) em gatos  
76 domésticos, sendo obtida ejaculação farmacológica por meio da associação de alta  
77 dose do alpha-2-agonista medetomidina (130-140 µg/kg), que promove a deposição  
78 do sêmen na uretra que, posteriormente, pode ser coletado com cateter uretral. A  
79 técnica possui importantes vantagens, como não necessitar de equipamento  
80 específico como a eletroejaculação. Tais vantagens podem possibilitar ampliação  
81 das oportunidades de coleta em campo e locais com pouca infraestrutura e/ou  
82 profissionais com tal qualificação.

83 Os resultados com felídeos selvagens até o momento demonstraram eficácia  
84 em nove espécies: *Caracal caracal* [6]; *Catopuma temmincki* [7]; *Panthera onca*,  
85 *Puma yagouaroundi* e *Leopardus wiedii* [8,9]; *Panthera leo* [10,6]; *Felis chaus* [11];  
86 *Prionailurus bengalensis euptilurus* [12]; *Puma concolor* [13]; *Leopardus guttulus*  
87 [14]. Apesar da eficácia, foi observada considerável variação entre indivíduos, como  
88 no estudo de Iglesias et al. [14]. Também foi observado baixo número amostral em  
89 algumas espécies, como em Lueders et al. [7] e Madrigal-Valverde et al. [9] que  
90 testaram a técnica em *L. wiedii*, *P. yagouaroundi* e *P. onca*, com apenas um animal  
91 de cada ou em Schepper [6], com dois indivíduos de *C. caracal*.

92 O jaguarundi (*P. yagouaroundi*) é classificado como vulnerável na lista de  
93 espécies ameaçadas de extinção no território brasileiro [15]. Apesar de sua ampla  
94 distribuição no país, a densidade populacional estimada é baixa (0,01-0,05  
95 indivíduos/km<sup>2</sup>), sendo assumido que a população efetiva da espécie seja de  
96 aproximadamente 5200 indivíduos com expectativa de declínio de 10% até 2028  
97 [16]. A CU foi testada na espécie e apresentou eficácia no estudo de Madrigal-

98 Valverde et al. [9]. Entretanto, foi avaliada a técnica em um animal em apenas uma  
99 coleta, restando muitas variáveis a serem analisadas e a necessidade de um maior  
100 número amostral que suporte tal eficácia.

101 Em função do potencial inovador da técnica, como alternativa à  
102 eletroejaculação, é imprescindível que a eficiência destas técnicas seja comparada,  
103 a fim de auxiliar na tomada de decisão sobre qual utilizar em determinado contexto.  
104 Contudo, dentre os estudos conduzidos com espécies de felídeos selvagens,  
105 apenas o estudo de Araujo et al. [13] e o presente estudo compararam os dois  
106 métodos, sendo que a presente investigação é pioneira em avaliar a recuperação  
107 adicional de sêmen após a CU, como observado em gatos por Swanson et al. [17].  
108 Além disso, este estudo é o primeiro a constatar a presença de células sanguíneas  
109 em amostras obtidas após cateterização uretral em felídeos silvestres, dado não  
110 avaliado microscopicamente pelos demais estudos com felídeos silvestres.

111 Assim, considerando a carência de dados da espécie e a inexistência de  
112 comparações entre a eficiência destas variantes da eletroejaculação e CU na  
113 maioria das espécies de felídeos selvagens, este estudo teve como objetivo avaliar  
114 um protocolo de obtenção de sêmen por cateterização uretral, seguida de  
115 eletroejaculação em *P. yagouaroundi*, e comparar a qualidade das amostras obtidas  
116 às provenientes de eletroejaculação exclusivamente.

117

## 118 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 119 2.2.1 Animais e questões éticas

120

121 Os animais amostrados neste estudo estavam alojados na Associação Mata  
122 Ciliar, Jundiá, estado de São Paulo, Brasil. Dos sete animais que participaram, seis  
123 eram cativos na instituição e um proveniente de vida livre. Entre os cativos, cinco  
124 estiveram em todas as coletas e um esteve em quatro das cinco coletas. O animal  
125 de vida livre participou de uma coleta do estudo, pois ele foi resgatado após  
126 atropelamento e permaneceu por pouco tempo no Centro de Reabilitação de  
127 Animais Silvestres da Instituição (CRAS).

128 O método utilizado seguiu rigorosos preceitos éticos e foi aprovado, sob o  
129 protocolo n. 14/2018, pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da  
130 Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina (Palotina, Paraná, Brasil) e pelo  
131 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/Ministério do

132 Meio Ambiente) por meio do Sistema de Autorização e Informação em  
133 Biodiversidade (SISBio), sob autorização n. 60832-2.

134

#### 135 2.2.2 Protocolo anestésico e desenho experimental

136

137 Os indivíduos foram contidos com puçá e anestesiados via IM com  
138 dexmedetomidina (0,005 mg/kg - Dexdomitor<sup>®</sup>, Zoetis, Campinas, Brasil) associada  
139 à cetamina (10 mg/kg) – Quetamina<sup>®</sup>, Vetnil, São José dos Campos, Brasil). Tais  
140 doses foram definidas com base nos resultados iniciais do estudo de Iglesias et al.  
141 [14], com *Leopardus guttulus*, uma vez que o referido estudo e o presente ocorreram  
142 no mesmo local de coleta e com fases simultâneas. Foi escolhida uma dose  
143 intermediária entre as avaliadas, que variaram entre 0,003-0,008 mg/kg de  
144 dexmedetomidina e 8,0-13,9 mg/kg de cetamina. No decorrer do procedimento, foi  
145 utilizado isoflurano inalatório com concentrações variando entre 0,2% e 2% de  
146 acordo com a demanda do animal.

147 Ao longo do estudo foram realizadas cinco coletas, em intervalos de no  
148 mínimo três meses, entre os anos de 2018 e 2020, com seis machos em cada,  
149 sendo sete o total de animais amostrados. O sêmen foi coletado com CU conforme  
150 Zambelli et al. [5], seguida de eletroejaculação (CU-EEJ) em três coletas (6 animais  
151 em 3 coletas, n=18) e, apenas com eletroejaculação (EEJ) em duas (6 animais em 2  
152 coletas, n=12). O grupo CU-EEJ possibilitou a recuperação adicional de sêmen após  
153 CU, conforme descrito por Swanson et al. [17], em gato-doméstico.

154

#### 155 2.2.3 Cateterização uretral

156

157 Na primeira coleta foram testadas diferentes profundidades de introdução do  
158 cateter uretral do tipo “Tom cat”, variando entre 5, 6 e 7 cm. Com base nos  
159 resultados foi definida a profundidade de 7 cm como a mais adequada, por  
160 possibilitar maior número de amostras e maior volume seminal na referida coleta,  
161 sendo utilizada exclusivamente nas demais coletas. Antes da sondagem, a glândula  
162 do pênis foi higienizada com solução salina (0,9% de NaCl) e em seguida,  
163 introduzido o cateter lubrificado. Além da capilaridade resultante da introdução do  
164 cateter, foi aplicada pressão adicional por meio do acoplamento de uma seringa de 1  
165 mL e exercida sucção, conforme utilizado por Araújo et al. [8].

166 As sondagens uretrais foram realizadas 20 min após a aplicação da  
167 anestesia como padrão. Nos animais que rapidamente alcançaram plano anestésico  
168 adequado ou demoraram mais a alcançar tal plano, as sondagens foram realizadas  
169 com 15 e 35 min após a aplicação. Nos casos em que a sondagem foi realizada com  
170 15 min, uma nova tentativa foi realizada com 20 min, ambos após a aplicação. Já  
171 nos casos realizados com 35 min, não houve sondagem com 20 min devido ao não  
172 estabelecimento do plano anestésico ideal até este momento.

173

#### 174 2.2.4 Avaliação seminal

175

176 As amostras obtidas foram mantidas em microtubos esterilizados de 2 mL  
177 em banho-Maria e analisadas em lâminas pré-aquecidas no microscópio óptico,  
178 todos a 37°C. Foram avaliados os parâmetros a seguir com base em Pope et al. [18]  
179 e Swanson et al. [19]: volume; vigor espermático (0-5); motilidade espermática (%);  
180 pH com fitas indicadoras (Merck Chemical, São Paulo, Brasil); concentração com  
181 câmara de Neubauer; vitalidade (% de células com membrana íntegra) com  
182 coloração de eosina e nigrosina; teratospermia (defeitos maiores e menores) com o  
183 corante rosa bengala (3%); e presença de eritrócitos e leucócitos com panótico  
184 rápido.

185 Foi realizada biometria dos testículos e região peniana para definir o volume  
186 testicular e avaliar a presença de aderências testiculares, hematomas ou ferimentos  
187 no pênis e bolsa escrotal, estado das espículas (tamanho normal, pequenas ou  
188 ausentes) e tônus (1 - duro, 2 - normal, 3 - flácido). O volume testicular total foi  
189 obtido pela soma dos volumes de cada testículo, que foi determinado por meio das  
190 medidas comprimento (C) e largura (L), em mm com uso de paquímetro, e  
191 calculados pela fórmula  $V = C \times L^2 \times 0,524$  proposta por Wildt et al. [20], em que  
192 0,524 é uma constante relativa ao formato tridimensional padrão (ovoide) do  
193 testículo felídeo.

194

#### 195 2.2.5 Análises microscópicas

196

197 A avaliação dos parâmetros vitalidade, teratospermia e presença de  
198 eritrócitos e leucócitos foi realizada por meio da confecção de esfregaços em  
199 duplicata com amostras frescas de sêmen, corados com as diferentes colorações

200 descritas no item anterior e leitura em microscópio óptico. Para análise de vitalidade,  
201 teratospermia e defeitos foram contadas 200 células (100 em cada réplica), sendo  
202 que a leitura do primeiro parâmetro foi realizada imediatamente após a obtenção das  
203 amostras e as demais após o término das coletas, conforme proposto por Swanson  
204 et al. [21].

205

#### 206 2.2.6 Tratamento estatístico

207

208 Os dados obtidos nas coletas foram submetidos à análise de *outliers* por  
209 meio de *Boxplot* e pressupostos por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e  
210 homoscedasticidade de Levene, seguidos por teste t pareado ou análise de  
211 variância (ANOVA de Medida Repetida) e teste de Fisher. Os dados de variáveis  
212 categóricas foram submetidos ao teste de Qui-quadrado. Também foi conduzida  
213 análise de regressão linear simples para variáveis dependentes em dados de  
214 concentração e volume testicular. Todas as análises foram conduzidas com 5% de  
215 probabilidade e utilizando *software* específico (Statistica versão 7.1,  
216 VinceStatSoftware).

217

218

### 219 2.3 RESULTADOS

220

221 Ao longo do estudo foi possível obter sêmen dos animais por meio dos três  
222 métodos de coleta, Cateterização Uretral (CU), seguida de eletroejaculação (CU-  
223 EEJ) ou, exclusivamente, por eletroejaculação (EEJ). As características destas  
224 amostras são apresentadas na Tabela 2. Não foram observadas alterações  
225 testiculares no exame andrológico, sendo que o volume testicular total médio foi de  
226  $2,39 \pm 0,92$  (SD)  $\text{cm}^3$  e tônus de  $2,5 \pm 0,5$ ; não tendo sido observadas diferenças  
227 entre os testículos em ambas as variáveis. A técnica de CU foi eficaz para coleta de  
228 sêmen em quatro dos sete animais em pelo menos uma coleta. Em 44,4% (n=8) das  
229 tentativas de coleta via CU foram obtidas amostras translúcidas, com volume médio  
230 de  $2,11 \pm 0,57$   $\mu\text{L}$  e sem espermatozoides.

231 Além das amostras obtidas por CU sem espermatozoides, foram coletadas  
232 seis amostras de sêmen com volume médio de  $3,53 \pm 0,69$   $\mu\text{L}$ , das quais apenas  
233 uma apresentou qualidade compatível com congelamento (vigor 3, motilidade de

234 80% e 88% de vitalidade). Contudo, devido ao pequeno volume obtido isso não foi  
235 possível, assim como não foram determinadas as concentrações espermáticas. As  
236 demais amostras apresentaram em média, vigor de  $1,86 \pm 0,86$ , motilidade de  $21,32$   
237  $\pm 12,59\%$  e  $27,6 \pm 13,05\%$  de vitalidade.

238 Em função do tempo levado para obtenção da sedação adequada para  
239 realização dos procedimentos, em quatro ocasiões não foi utilizado o tempo de 20  
240 min para a sondagem uretral. Desse modo, em dois casos os animais foram  
241 sondados com 15 e 20 min e outros dois com 35 min após a aplicação da anestesia.  
242 A sondagem com 35 min resultou em ausência de sêmen em um deles e presença  
243 de sêmen com qualidade similar à média geral de CU em outro (Tabela 2).

244 Os animais sondados com 15 e 20 min foram os únicos em que a sonda foi  
245 introduzida mais de duas vezes e em ambas as sondagens foram obtidas amostras  
246 de volume muito pequeno, mas com espermatozoides nos dois casos. Estes casos  
247 não ocorreram na mesma ocasião em que foram encontradas células sanguíneas  
248 (descrito a seguir), não sendo possível inferir se as sondagens adicionais que  
249 resultaram em acréscimo de sêmen também podem ter causado lesões à uretra. Por  
250 outro lado, estes quatro casos alternativos ao padrão de 20 min permitiram observar  
251 que é possível obter sêmen por CU na espécie com intervalos entre 15 e 35 min  
252 após a anestesia.

253 Em relação às amostras provenientes de CU-EEJ e EEJ (características na  
254 Tabela 2), não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ), mas ambas foram  
255 superiores, de modo geral, às obtidas por CU. Foram obtidas amostras de sêmen  
256 por CU-EEJ em 78% ( $n=16$ ) e por EEJ em 92% ( $n=11$ ) dos casos. Apesar da  
257 diferença entre os percentuais de obtenção de amostras, não houve diferença  
258 estatística entre as duas técnicas ( $X^2_{(2)} = 4,333$ ,  $p = 0,114$ ). Situação similar ocorreu  
259 com o parâmetro concentração, apesar das médias serem consideravelmente  
260 distintas, sendo uma o dobro da outra, CU-EEJ  $50 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  ( $\pm 35,24$ ) e EEJ  $102,81$   
261  $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  ( $\pm 103,56$ ), não houve diferença significativa ( $t_{(12)} = -1,324$ ,  $p = 0,242$ ),  
262 provavelmente pelo elevado desvio padrão observado.

263 **TABELA 2** – Parâmetros seminais (média  $\pm$  DP) avaliados em amostras obtidas por Cateterização Uretral (CU) seguida de eletroejaculação (6  
 264 animais em 3 coletas, n=18) ou exclusivamente por eletroejaculação (6 animais em 2 coletas, n=12) em jaguarundi (*Puma yagouaroundi*)  
 265 provenientes da Associação Mata Ciliar, Jundiá, Brasil.

Parâmetros	CU	Eletroejaculação após CU	Eletroejaculação	Sumário estatístico
Volume ( $\mu$ L)	3,53 $\pm$ 0,69 <sup>b</sup>	83,64 $\pm$ 72,60 <sup>a</sup>	60,59 $\pm$ 44,11 <sup>a</sup>	F <sub>(2, 24)</sub> =4,285, p=0,025
Concentração (10 <sup>6</sup> /mL)	-	50 $\pm$ 35,24	102,81 $\pm$ 103,56	t <sub>(12)</sub> =-1,324, p=0,242
Vigor	1,86 $\pm$ 0,86 <sup>b</sup>	3 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>	3,13 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	F <sub>(2, 26)</sub> =3,595, p=0,041
Motilidade (%)	21,32 $\pm$ 12,59 <sup>b*</sup>	52,5 $\pm$ 25,36 <sup>a</sup>	54,09 $\pm$ 20,47 <sup>a</sup>	F <sub>(2, 25)</sub> =4,416, p=0,024
Vitalidade (%)	27,6 $\pm$ 13,54 <sup>b*</sup>	58,5 $\pm$ 24,50 <sup>a</sup>	62,78 $\pm$ 16,28 <sup>a</sup>	F <sub>(2, 25)</sub> =5,709, p=0,009
pH	-	8,14 $\pm$ 1,21	8,85 $\pm$ 0,37	t <sub>(12)</sub> =1,507, p=0,182
Teratospermia (%)	68,2 $\pm$ 6,21 <sup>a</sup>	56,3 $\pm$ 6,35 <sup>b</sup>	56,66 $\pm$ 6,21 <sup>b</sup>	F <sub>(2, 23)</sub> =267,52, p<0,001
Defeitos maiores (%)	51,72 $\pm$ 8,5 <sup>a</sup>	53,15 $\pm$ 5,28 <sup>b</sup>	54,39 $\pm$ 6,39 <sup>b</sup>	F <sub>(2, 23)</sub> =207,03, p<0,001
Defeitos menores (%)	48,28 $\pm$ 5,86 <sup>a</sup>	46,85 $\pm$ 4,69 <sup>b</sup>	45,61 $\pm$ 4,17 <sup>b</sup>	F <sub>(2, 23)</sub> =68,228, p<0,001

266 \* Os dados apresentados resultam de cinco das seis amostras obtidas, uma amostra foi retirada desta análise por ser considerada *outlier* por  
 267 meio de análise de Boxplot. Letras sobrescritas indicam diferença estatística (p<0,05) entre os diferentes tratamentos, em ordem crescente.

268

269

270 Foi conduzida uma análise de regressão para variáveis dependentes a fim de verificar o efeito do volume testicular sobre a  
 271 concentração de espermatozoides em amostras de CU-EEJ e EEJ conjuntamente, uma vez que não houve diferenças entre elas.

272 O resultado evidenciou efeito significativo entre as variáveis (F<sub>(1,6)</sub>= 6,070, p=0,047), indicando que um aumento do volume  
 273 testicular contribuiu para o aumento da concentração do sêmen. Entretanto, o coeficiente de determinação observado (R<sup>2</sup>= 0,536)

274 indicou, nos moldes das coletas, que a porção da variável concentração explicada pelo volume testicular foi moderada.

## 275 2.4 DISCUSSÃO

276

277 A utilização da técnica de CU para coleta de sêmen é tida como promissora,  
278 uma vez que não requer equipamentos específicos e mão de obra especializada  
279 como na coleta por eletroejaculação [5]. Entretanto, resultados desta técnica têm  
280 apresentado considerável variação entre estudos, doses do anestésico alpha-2-  
281 agonista e entre animais em um mesmo estudo. Resultados de testes da técnica em  
282 felídeos silvestres, comparados aos deste estudo, são apresentados na Tabela 3.

283 Conforme pode ser observado na Tabela 3 existe uma grande variação entre  
284 as doses do anestésico alpha-2-agonista utilizadas pelos nove estudos com felídeos  
285 silvestres já realizados, seja de medetomidina ou dexmedetomidina. Apesar dos  
286 diferentes métodos e dosagens utilizados pelos estudos apresentados na Tabela 3  
287 dificultar análises estatísticas comparativas, parece haver um padrão de obtenção de  
288 maiores volumes seminais e com maior qualidade nos estudos que utilizaram  
289 maiores doses destes fármacos. Contudo, as altas doses utilizadas na proposição da  
290 técnica, e em outros estudos, levantam preocupações sobre sua segurança e  
291 possíveis efeitos adversos nos animais [22,14,23].

292 Os estudos de Romagnoli et al. [23,24], mesmo grupo de pesquisadores que  
293 propôs a CU, foram pioneiros em avaliar e observar possíveis riscos da utilização de  
294 alta dose (0,13 mg/kg) de medetomidina. Enquanto Romagnoli et al. [24] reportaram  
295 redução da frequência cardíaca, aumento da pré-carga cardíaca e comprometimento  
296 da função sistólica, Romagnoli et al. [23] observaram que o fármaco atingiu seu pico  
297 de concentração plasmática lentamente e com variabilidade entre os indivíduos, com  
298 baixa depuração corporal total, provavelmente devido a alterações cardiovasculares  
299 associadas à administração de medetomidina.

300 Estas pesquisas avaliaram a mesma dose de medetomidina usada para  
301 descrever a técnica (0,13 mg/kg), sendo que a mesma dose ou pequena variação  
302 dela foi utilizada em outros estudos também com gatos-domésticos  
303 [5,25,26,27,24,28,23]. Em felídeos silvestres, apesar do pequeno número de  
304 estudos, o intervalo entre doses já utilizadas é expressivo, variando de 0,003 mg/kg  
305 de dexmedetomidina [14], dose sugerida pelo fabricante, até 0,1 mg/kg de  
306 medetomidina [8,9,13].

307 Como a dexmedetomidina é considerada duas vezes mais potente que a  
308 medetomidina [29,30], é possível ajustar a dose de dexmedetomidina para a escala

309 de medetomidina. Assim, nota-se uma variação entre 0,006 e 0,1 mg/kg, sendo a  
310 última aproximadamente 15 vezes maior que a primeira. Essa grande variação em  
311 diferentes espécies nos estudos dificulta conclusões gerais e comparações diretas  
312 entre seus resultados.

313 Os resultados do presente estudo e o de Iglesias et al. [14], com doses entre  
314 0,003-0,005 mg/kg de dexmedetomidina, obtidos com as doses mais baixas já  
315 testadas, foram incompatíveis com a criopreservação de sêmen, com pequenos  
316 volumes, não sendo possível avaliar as concentrações das amostras. Por outro lado,  
317 os estudos com as maiores doses testadas obtiveram resultados que possibilitaram  
318 a criopreservação [8,9,13]. Também é importante notar que doses intermediárias,  
319 próximas de 0,05 mg/kg foram pouco avaliadas, apenas Jeong et al. [12] testaram  
320 esta dose em *Prionailurus bengalensis* e obtiveram resultados satisfatórios (Tabela  
321 3).

322 Dessa forma, é evidente a necessidade de novos estudos que testem  
323 variações maiores do que as já avaliadas em cada espécie, a fim de se definir a  
324 dose que proporcione melhor sêmen e menores riscos à saúde dos animais. Além  
325 disso, o estudo de Pisu et al. [22] em gatos-domésticos apresentou uma alternativa  
326 às altas doses com resultados promissores. Na ocasião os autores utilizaram um  
327 protocolo de anestesia injetável com metadona (0,2 mg/kg) e dexmedetomidina  
328 (0,005 mg/kg), seguida de indução com propofol. O teste de protocolos que utilizem  
329 outros fármacos além do alpha-2-agonista (medetomidina ou dexmedetomidina) e  
330 cetamina é encorajado em felídeos.

**TABELA 3** – Comparação entre resultados de coleta de sêmen por cateterização uretral em diferentes espécies de felídeos selvagens.

Fonte	Espécie	Anestesia Dex/Med. e Cet. (mg/kg)	Volume ( $\mu$ L)	Concentração ( $10^6$ mL $^{-1}$ )	Vigor	Motilidade (%)	Vitalidade (%)	Teratospermia (%)
Presente estudo	<i>Puma yagouaroundi</i>	0,005 e 10#	3,53 $\pm$ 0,69	-	1,86 $\pm$ 0,86	21,32 $\pm$ 12,59*	27,6 $\pm$ 13,54*	68,2 $\pm$ 6,21
[9]	<i>Puma yagouaroundi</i>	0,1 e 5	20	570	3	60	63	31
[8]	<i>Panthera onca</i>	0,08-0,1 e 5	347,2 $\pm$ 295,6	2635,2 $\pm$ 1598,1	-	77 $\pm$ 11,4	-	44,15*
[9]	<i>Panthera onca</i>	0,1 e 5	700	-	1	20	78	26
[9]	<i>Leopardus wiedii</i>	0,1 e 5	20	120	4	90	63	12
[14]	<i>Leopardus guttulus</i>	0,003-0,005 e 8- 11,11#	9,7 $\pm$ 9,20	-	-	-	-	-
[14]	<i>Leopardus guttulus</i>	0,008 e 10#	35,9 $\pm$ 19,84	552,8 $\pm$ 482,13	3,1	71	68	44
[11]	<i>Felis chaus</i>	0,09 e 0,45@	69 $\pm$ 27,92	75,13 $\pm$ 17,05	-	77,13 $\pm$ 14,15	60,6 $\pm$ 4,04	27
[10]	<i>Panthera leo</i>	0,075 e 0,93\$	422,86 $\pm$ 296,07	1940 $\pm$ 1610	-	86,48 $\pm$ 16,81**	66,3 $\pm$ 10,1	54 25,5
[6]&	<i>Panthera leo</i>	0,01 e 0,13 &	340 $\pm$ 159,37	125-2530	-	-	66 $\pm$ 20,24	85 $\pm$ 3,52
[12]	<i>Prionailurus bengalensis</i>	0,05 e 4	6,7 $\pm$ 3,7	1698 $\pm$ 758	-	84,1 $\pm$ 9,7	-	18,3 $\pm$ 8,6

[6]&	<i>Caracal caracal</i>	-	240	8-236	-	-	86	88
[7]	<i>Puma concolor</i>	0,08-0,1 e 5	106,7 ±30,5	524,1 ±54,3	3 ±0	70 ±0	-	59,5 ±7,8

332 **Legenda:** Med. = Medetomidina; Cet. = Cetamina; - = dado não obtido; \* = média dos valores observados entre animais cativos e de vida livre;

333 \*\* = média dos valores observados em dois meios de cultura; # = estudo utilizou dexmedetomidina e não medetomidina; @ = dose ajustada

334 para mg/kg com base nos dados do próprio estudo; \$ = dose estimada em mg/kg a partir da dose/animal apresentada no estudo e o peso

335 médio de machos obtido de Smuts et al. [31] e Altman et al. [32]; & = o estudo não apresentou média e desvio padrão das concentrações

336 obtidas, apenas o intervalo. Para a espécie *Panthera leo* as médias e desvios foram calculados a partir dos dados presentes no estudo. A dose

337 também foi estimada em mg/kg a partir da dose/animal apresentada no estudo e o peso médio de machos obtido de Smuts et al. [31] e Altman

338 et al. [32].

339 Ao comparar as doses utilizadas em jaguarundis para CU, no presente  
340 estudo e no de Madrigal-Valverde et al. [9], observa-se que a do último é 10 vezes  
341 maior que a presente. Associando as doses ao padrão geral dos resultados,  
342 observou-se amostras incompatíveis com o congelamento em baixa dosagem e  
343 uma amostra congelada proveniente da utilização de alta dose. Contudo, o estudo  
344 de Madrigal-Valverde et al. [9] realizou apenas uma coleta em um indivíduo, o que  
345 dificulta extrapolações dos resultados relatados, pois pode tratar-se de uma  
346 resposta refletindo características individuais. Dessa forma, sugere-se que novos  
347 estudos avaliem doses intermediárias, que possam oferecer menor risco aos  
348 animais e possibilitar amostras compatíveis com o congelamento. Também  
349 sugerimos a reavaliação da dose 0,1 mg/kg com maior número de indivíduos e que  
350 avalie possíveis riscos à saúde dos animais.

351 Em relação à qualidade das amostras obtidas por diferentes métodos de  
352 coleta, a comparação entre CU e epididimais provenientes de orquiectomia em  
353 gatos-domésticos, os resultados demonstraram que: as amostras provenientes de  
354 CU apresentam igual qualidade para fertilização *in vitro* (FIV), frescas ou após  
355 congelamento; são mais adequadas para análise automatizada – (*Computer*  
356 *Assisted Sperm Analysis* – CASA); apresentaram níveis igualmente baixos de  
357 alterações apoptóticas e; em geral, apresentam qualidade igual e não diferiram de  
358 forma expressiva após criopreservação, apesar de se observar diferenças pontuais  
359 entre os tipos de amostras [33,25,27,28,34,35].

360 Também foi relatado que o sêmen de CU tolera elevadas diluições (até  $1 \times$   
361  $10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) sem perdas expressivas de qualidade [36]. Já o estudo de Prochowska et  
362 al. [35], que analisou variáveis apoptóticas em amostras de CU e epididimais,  
363 observaram baixos índices de alterações, os autores concluíram que a deterioração  
364 da qualidade dos espermatozoides após o descongelamento provavelmente está  
365 mais ligada a danos diretos às células do que à ativação de processos apoptóticos.

366 A eletroejaculação foi comparada à CU e coleta em epidídimo em gatos-  
367 domésticos por Jelinkova et al. [37]. As amostras de maior qualidade foram obtidas  
368 por eletroejaculação e as de menor por CU, assim como nos resultados em  
369 jaguarundi neste estudo. Resultados semelhantes foram observados por Swanson  
370 et al. [16], que obtiveram número total de espermatozoides quase duas vezes  
371 maior por eletroejaculação após a CU do que por CU.

372 Por outro lado, a comparação entre CU e eletroejaculação em gatos-  
373 domésticos conduzida por Zambelli et al. [26] revelou diferença entre volume e  
374 concentração, mas o número total de espermatozoides não foi diferente entre as  
375 duas técnicas. Neste estudo, não foi possível obter a concentração de CU, mas  
376 com base no pequeno volume, o número total de espermatozoides obtidos muito  
377 provavelmente foi maior por eletroejaculação em ambas as formas testadas.

378 Em espécies silvestres a eletroejaculação é o método mais utilizado [4],  
379 contudo, apenas Araujo et al. [13] com *P. concolor* e o presente estudo com *P.*  
380 *yagouaroundi* compararam a eficiência deste método com a CU. Em geral, não  
381 foram observadas diferenças entre os métodos em *P. concolor*. No entanto, os  
382 resultados deste estudo mostram que as amostras obtidas por eletroejaculação  
383 eram adequadas à criopreservação enquanto da CU não. Também não houve  
384 diferença significativa entre as formas de eletroejaculação após a CU (CU-EEJ) ou  
385 isoladamente (EEJ), apesar de diferenças numéricas. Esta ausência de diferença  
386 estatística, apesar da diferença numérica, e o elevado desvio padrão no parâmetro  
387 concentração, quando comparados os métodos CU-EEJ e EEJ, pode indicar a  
388 necessidade de maior número amostral.

389 A concentração, e conseqüente número total de espermatozoides, é um  
390 parâmetro importante para a criopreservação, afetando diretamente o número de  
391 amostras congeladas. Os resultados deste estudo apresentaram grande variação  
392 nesse parâmetro, indicada pelo desvio padrão. Tal variação configura um dado  
393 interessante sobre a espécie, uma vez que até então apenas este estudo e o de  
394 Swanson et al. [19] realizaram esta avaliação. Os autores também observaram alto  
395 desvio padrão na concentração  $7,2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1} (\pm 4,0)$  proveniente de 21 animais.  
396 Dessa forma, esses dois estudos indicam que a espécie em cativeiro apresenta  
397 naturalmente alta variação na concentração. Estudos com animais de vida livre  
398 somariam expressivamente ao conhecimento obtido em animais de cativeiro até  
399 então.

400 Os resultados da análise morfológica indicaram diferença estatística em  
401 relação à teratospermia entre CU e os grupos CU-EEJ e EEJ. Foi observado maior  
402 percentual de defeitos maiores (Tabela 2), diferente do estudo de Swanson et al.  
403 [19] e Madrigal-Valverde et al. [9]. Contudo, a diferença entre percentuais totais de  
404 defeitos maiores e menores aqui observados não foi significativa. O percentual total  
405 médio de teratospermia entre os três tipos de coleta 60,39% ( $\pm 8,8$ ), foi inferior aos

406 74,3% ( $\pm 4,6$ ) observados por Swanson et al. [19] e superior aos 31% de Madrigal-  
407 Valverde et al. [9].

408 Não foi observado nenhum animal teratospérmico em todas as coletas,  
409 apenas pontualmente oscilando próximo do limiar de 60% de anormalidades.  
410 Swanson et al. [19] relataram animais com tal condição, mas como foi realizada  
411 apenas uma coleta por indivíduo não se pode concluir que a condição era  
412 definitiva. Apesar disso, mesmo que animais com esta condição tenham menor  
413 chance de se reproduzir em condições naturais, o uso de técnicas de reprodução  
414 assistida pode contribuir para a geração de proles, que não necessariamente  
415 herdarão tal característica. A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)  
416 pode ser útil para tal finalidade, além do grande potencial de gerar vários embriões  
417 a partir de uma amostra congelada com baixa concentração.

418 Prochowska et al. [38] conduziram experimentos com ICSI em gatos-  
419 domésticos que possuíam expressivas anormalidades provenientes de CU e  
420 epididimais e os comparou a espermatozoides normais provenientes dos mesmos  
421 métodos de coleta. Os autores não observaram diferença significativa entre os  
422 grupos, demonstrando que mesmo espermatozoides com anormalidades podem ser  
423 úteis para a conservação de espécies, desde que estejam com material genético  
424 íntegro e sejam utilizadas ferramentas de reprodução assistida adequadas.

425 Outro dado interessante e inédito do deste estudo é a constatação da  
426 presença de células sanguíneas em amostras de eletroejaculação obtidas  
427 imediatamente após a realização da CU. Este fato havia sido relatado em gatos-  
428 domésticos no estudo de Cunto et al. [39], mesmo grupo de pesquisadores que  
429 propôs a técnica. Apesar disso, nos estudos publicados com CU em espécies de  
430 felídeos selvagens até o presente não foi analisada a presença de células  
431 sanguíneas com microscópio [8,9,11,12,13,14]. Apenas no estudo de Araujo et al.  
432 [13] foi analisada macroscopicamente a presença de sangue pela coloração da  
433 amostra de sêmen, contudo pequenas quantidades podem passar despercebidas  
434 sem o uso de microscopia.

435 A presença de células sanguíneas em amostras de sêmen obtidas por CU  
436 ou eletroejaculação imediatamente após CU sugere a presença de lesões na uretra  
437 causadas pela cateterização, mesmo este sendo de diâmetro adequado para o  
438 porte da espécie e tendo sido lubrificado, fato que merece novas investigações.  
439 Neste estudo, apesar de ter sido avaliada em apenas uma coleta de cada grupo, o

440 delineamento contendo CU-EEJ e ELL possibilitou verificar que: i) duas passagens  
441 do cateter não ocasionaram presença de células sanguíneas na amostra de CU  
442 (passagens adicionais do cateter ou um número amostral maior poderiam  
443 apresentar resultados diferentes); ii) parte das amostras de eletroejaculação após a  
444 CU continham tais células e; iii) a eletroejaculação exclusivamente não continha  
445 estas células.

446 A pequena amostragem com este objetivo (duas coletas em 6 animais,  
447 uma com cada técnica) conduzida neste estudo não é conclusiva, mas levanta para  
448 a necessidade de investigações que tenham o objetivo de compreender estas  
449 possíveis lesões. A cateterização uretral é uma alternativa promissora à  
450 eletroejaculação, contudo, a possibilidade de que ela cause lesões aos animais  
451 precisa ser compreendida, uma vez que tal dado é de grande relevância para a  
452 tomada de decisão sobre qual técnica usar.

453 A eletroejaculação foi recentemente avaliada do ponto de vista de  
454 possíveis lesões retais avaliadas por endoscopia e histologia em gatos domésticos  
455 e nenhum dano foi observado [4]. Estudos que avaliaram possíveis danos em  
456 ambas as técnicas são escassos e são encorajados para contribuir com a tomada  
457 de decisão do método de coleta a ser utilizado.

458

## 459 2.5 CONCLUSÃO

460

461 Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a técnica de CU foi  
462 eficaz na obtenção de sêmen em *P. yagouaroundi*. Entretanto, a qualidade do  
463 sêmen obtido por CU foi inviável para a criopreservação e inferior às duas  
464 modalidades de eletroejaculação testadas.

## 465 2.6 AGRADECIMENTOS

466

467 Os autores agradecem o apoio financeiro da Universidade Federal do  
468 Paraná (UFPR), via financiamento do Programa de Apoio à Pós-Graduação  
469 (PROAP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
470 (CAPES) pela bolsa concedida ao autor. Agradecemos também a colaboração com  
471 a Associação Mata Ciliar, que disponibilizou sua infraestrutura, colaboradores e  
472 reagentes para a realização deste estudo.

473

## 474 2.7 REFERÊNCIAS

475

476 [1] Amstislavsky SY, Kozhevnikova VV, Muzika VV, Kizilova EA. Reproductive  
477 biology and a genome resource bank of Felidae. Russ. J. Dev. Biol. 2017;48:81–92.  
478 <https://doi.org/10.1134/S1062360417020023>

479 [2] Kochan J, Nizański W, Moreira N, Silva ZC, Nowak A, Prochowska S, et al.  
480 ARTs in wild felid conservation programs in Poland and in the world. J. Vet. Res.  
481 2019;0;0. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0043>

482 [3] Jewgenow K, Zahmel J. Preservation of female genetic resources in feline  
483 species. Theriogenology 2020. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.040>

484 [4] Furthner E, Cordonnier N, Le Dudal M, Fontbonne A, Freiche V. Is  
485 electroejaculation a safe procedure in cats? An endoscopic and histological  
486 prospective blinded study. Theriogenology 2018;119:69–75.  
487 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.013>

488 [5] Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo B. Quality and in vitro fertilizing  
489 ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after  
490 medetomidine administration. Theriogenology 2008;69;4:485–90.  
491 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.019>

492 [6] Schepper M. A comparative study in morphological defects of semen from  
493 African Lions (*Panthera leo*) and Caracal (*Caracal caracal*): collected by urethral  
494 catheterization and electroejaculation. Thesis of dissertation (Faculty of Veterinary  
495 Medicine – Ghent University). 2016. Disponível em:  
496 [https://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/274/171/RUG01-](https://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/274/171/RUG01-002274171_2016_0001_AC.pdf)  
497 [002274171\\_2016\\_0001\\_AC.pdf](https://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/274/171/RUG01-002274171_2016_0001_AC.pdf). Acesso em: 12 dez. 2020.

- 498 [7] Lueders I, Ludwig C, Schroeder M, Mueller K, Zahmel J, Dehnhard M.  
499 "Successful nonsurgical artificial insemination and hormonal monitoring in an Asiatic  
500 golden cat (*Catopuma temmincki*). J Zoo Wildl Med 2014;45;2: 372-9.  
501 <https://doi.org/10.1638/2013-0269R.1>
- 502 [8] Araujo GR, Paula TAR, Deco-Souza T, Morato RG, Bergo LCF, Da-Silva LC, et  
503 al. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars  
504 (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. Anim  
505 Reprod Sci 2018;195:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.019>
- 506 [9] Madrigal-Valverde M, Bittencourt RF, de Lisboa Ribeiro Filho A, Lents MP, de  
507 Azevedo MC, Barreto RO, et al. Biometría testicular y características seminales en  
508 felinos neotropicales (Carnivora: Felidae) sometidos a cateterismo uretral. Rev.  
509 Biol. Trop. 2019;67;4: 975-88. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i4.36224>
- 510 [10] Lueders I, Luther I, Scheepers G, Van der Horst G. Improved semen collection  
511 method for wild felids: Urethral catheterization yields high sperm quality in African  
512 lions (*Panthera leo*). Theriogenology 2012;78;3: 696–701.  
513 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.026>
- 514 [11] Kheirhah MS, Sisakht MM, Mohammadsadegh M, Moslemi HR. Sperm  
515 evaluation of Jungle Cat (*Felis chaus*) obtained by urethral catheterization (CT) after  
516 medetomidine administration. Theriogenology 2017;91:17–20.  
517 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.034>
- 518 [12] Jeong DH, Kim JH, Na KJ. Characterization and cryopreservation of Amur  
519 leopard cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) semen collected by urethral  
520 catheterization. Theriogenology 2018;119:91–5.  
521 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.004>
- 522 [13] Araujo GR, Paula TAR, Deco-Souza T, Morato RG, Bergo LCF, Silva LC, et al.  
523 Colheita farmacológica de sêmen de onças-pardas (*Puma concolor*: Mammalia:  
524 Carnivora: Felidae). Arq Bras Med Vet Zootec 2020;72;2:437-42.  
525 <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11030>
- 526 [14] Iglesias GA, Bento HJ, Kuczmarski AH, Costa TLC, Ribeiro J, Pimentel S, et al.  
527 Coleta de sêmen em *Leopardus guttulus* pelo método do cateterismo uretral. Arq.  
528 Bras. Med. Vet. Zootec. 2020;72;3:836-842.
- 529 [15] Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2018. Livro  
530 Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos. In:

- 531 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (Org.). Livro Vermelho  
532 da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: ICMBio. 622p.
- 533 [16] Almeida LB, Queirolo D, Beisiegel BM, Oliveira TG. Avaliação do estado de  
534 conservação do Gato-mourisco *Puma yagouaroundi* (É. Geoffroy Saint-Hilaire,  
535 1803) no Brasil. *BioBrasil* 2013;3;1:99-106.
- 536 [17] Swanson W, Bateman H, Vansandt L. Urethral catheterization and sperm  
537 vitrification for simplified semen banking in felids. *Reprod Domest Anim*  
538 2016;52:255–60. <https://doi.org/10.1111/rda.12863>
- 539 [18] Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL. A simple staining method for evaluating  
540 acrosomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wildl Med* 1991;22;1:87-95.
- 541 [19] Swanson WF, Johnson WE, Cambre RC, Citino SB, Quigley KB, Brousset DM,  
542 et al. Reproductive Status of Endemic Felid Species in Latin American Zoos and  
543 Implications for Ex Situ Conservation. *Zoo Biology* 2003;22:421–41.  
544 <https://doi.org/10.1002/zoo.10093>
- 545 [20] Wildt DE, Bush M, O'Brien SJ. Training Manual: reproduction, genetics and  
546 veterinary medicine. Front Royal: Center for New Opportunities in Animal Health  
547 Sciences (NOAHS), Conservation and Research Center, National Zoo, Smithsonian  
548 Institution, 1993.
- 549 [21] Swanson EW, Bearden HJ. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and  
550 dead bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science* 1951;10;4:981–7.  
551 <https://doi.org/10.2527/jas1951.104981x>
- 552 [22] Pisu MC, Ponzio P, Rovella C, Baravalle M, Veronesi MC. Usefulness of an  
553 injectable anaesthetic protocol for semen collection through urethral catheterization  
554 in domestic cats. *J Feline Med Surg* 2016;19;10:1087–90.  
555 <https://doi.org/10.1177/1098612x16679589>
- 556 [23] Romagnoli N, Lambertini C, Zambelli D, Cunto M, Ballotta G, Barbarossa A.  
557 Plasma concentration rise after the intramuscular administration of high dose  
558 medetomidine (0.13 mg/kg) for semen collection in cats. *Vet. Sci.* 2020;7:17.
- 559 [24] Romagnoli N, Zambelli D, Cunto M, Lambertini C, Ventrella D, Baron M. Non-  
560 invasive evaluation of the haemodynamic effects of high-dose medetomidine in  
561 healthy cats for semen collection. *J Feline Med Surg* 2015;18;4: 337–43.  
562 <https://doi.org/10.1177/1098612x15583345>
- 563 [25] Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, Zambelli D, Anastasi P, Hoogewijs M,  
564 Van-Soom A. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of

- 565 two collection techniques. *Theriogenology* 2010;74;1:31–9.  
566 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.016>
- 567 [26] Zambelli D, Raccagni R, Cunto M, Andreani G, Isani G. Sperm evaluation and  
568 biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation  
569 and urethral catheterization. *Theriogenology* 2010;74;8:1396–1402.  
570 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.011>
- 571 [27] Prochowska S, Niżański W, Ochota M, Partyka A. Characteristics of urethral  
572 and epididymal semen collected from domestic cats—A retrospective study of 214  
573 cases. *Theriogenology* 2015;84;9:1565–71.  
574 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.08.005>
- 575 [28] Prochowska S, Niżański W, Partyka A. Comparative analysis of in vitro  
576 characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa  
577 from cats (*Felis domesticus*). *Theriogenology* 2016;86;8:2063–72.  
578 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.002>
- 579 [29] Kuusela E, Raekallio M, Anttila M, Falck I, Mölsä S, Vainio O. Clinical effects  
580 and pharmacokinetics of medetomidine and its enantiomers in dogs. *J Vet*  
581 *Pharmacol Ther* 2000;23;1:15-20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2000.00245.x>
- 582 [30] Granholm M, McKusick BC, Westerholm FC, Aspegrén JC. Evaluation of the  
583 clinical efficacy and safety of intramuscular and intravenous doses of  
584 dexmedetomidine and medetomidine in dogs and their reversal with atipamezole.  
585 *Vet. Rec.* 2007;160;26:891-7. <https://doi.org/10.1136/vr.160.26.891>
- 586 [31] Smuts GL, Robinson GA, Whyte IJ. Comparative growth of wild male and  
587 female lions (*Panthera leo*). *J Zoo* 1980;190;3:365–73.  
588 <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1980.tb01433.x>
- 589 [32] Altman JD, Gross KL, Lowry SR. Nutritional and Behavioral Effects of Gorge  
590 and Fast Feeding in Captive Lions. *J Appl Anim Welf Sci* 2005;8;1:47–57.  
591 [https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0801\\_4](https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0801_4)
- 592 [33] Kienzle B, Brugger N, Braun J, Otzdorff CH. Semen collection in the tomcat –  
593 review of literature and clinical data. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*  
594 2008;36;3:210-4. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1622680>
- 595 [34] Prochowska S, Niżański W. In vitro fertilizing potential of urethral and  
596 epididymal spermatozoa collected from domestic cats (*Felis catus*). *Pol J Vet Sci*  
597 2017;20;1:19–24. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2017-0003>

- 598 [35] Prochowska S, Niżański W, Partyka A. Low levels of apoptotic-like changes in  
599 fresh and cryopreserved feline spermatozoa collected from the urethra and  
600 epididymis. *Theriogenology* 2017;88:43–9.  
601 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.045>
- 602 [36] Prochowska S, Niżański W, Ochota M, Partyka A. Effect of dilution rate on  
603 feline urethral sperm motility, viability, and DNA integrity. *Theriogenology* 2014;82;9:  
604 1273–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.012>
- 605 [37] Jelinkova K, Vitasek R, Novotny R, Bartoskova A. A comparison of quality  
606 parameters of fresh feline ejaculates collected by three different collection  
607 techniques. *Reprod. Domest. Anim.* 2018. <https://doi.org/10.1111/rda.13205>
- 608 [38] Prochowska S, Niżański W, Partyka A, Kochan J, Młodawska W, Nowak A, et  
609 al. Influence of the type of semen and morphology of individual sperm cells on the  
610 results of ICSI in domestic cats. *Theriogenology* 2018.  
611 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.031>
- 612 [39] Cunto M, Küster D, Bini C, Cartolano C, Pietra M, Zambelli D. Influence of  
613 different protocols of Urethral Catheterization after Pharmacological Induction  
614 (Ur.Ca.P.I.) on semen quality in the domestic cat. *Reprod Domest Anim* 2015;50;6:  
615 999–1002. <https://doi.org/10.1111/rda.12626>  
616

**CAPÍTULO 3**  
**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E MORFOMETRIA ESPERMÁTICA DE**  
**ONÇA-PARDA (*Puma concolor*) E JAGUARUNDI (*Puma yagouaroundi*)**

Artigo formatado segundo as diretrizes do periódico *Animal Reproduction Science*.

1 **Criopreservação de sêmen e morfometria espermática de onça-parda (*Puma***  
2 ***concolor*) e jaguarundi (*Puma yagouaroundi*)**

3

4 Dieferson da Costa Estrela<sup>1</sup>, Bruna de Oliveira Mendes<sup>2</sup>, Guilherme  
5 Malafaia<sup>3</sup>, Antonio Campanha Martinez<sup>4</sup>, Jessica da Silva Paulinho<sup>5</sup>, Cristina  
6 Harumi Adania<sup>5</sup>, Nei Moreira<sup>6</sup>

7

8 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná,  
9 Paraná, Brasil. Instituto Federal Sul-rio-grandense – Campus Avançado Jaguarão,  
10 Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: [diefersonestrela@gmail.com](mailto:diefersonestrela@gmail.com)

11 <sup>2</sup>Mestre em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado.

12 <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado.  
13 Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, Goiás, Brasil.

14 <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal,  
15 Universidade Estadual de Maringá – Campus Regional de Umuarama, Paraná,  
16 Brasil.

17 <sup>5</sup>Associação Mata Ciliar, Jundiaí, São Paulo, Brasil.

18 <sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Biociências,  
19 Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil.

20

21 **Destaques**

22

23 - O dispositivo passivo BOTUBOX<sup>®</sup> foi tão eficiente quanto o refrigerador elétrico

24 - Os quatro extensores ocasionaram redução da qualidade seminal após o  
25 descongelamento

- 26 - Não houve diferença de danos ao DNA entre os extensores
- 27 - O extensor BotuBOV<sup>®</sup> foi o mais eficiente nas duas espécies
- 28 - A morfometria espermática é conservada no gênero *Puma*

29

## 30 RESUMO

31

32 O presente estudo objetivou avaliar a eficiência de quatro meios de  
33 criopreservação de sêmen em *Puma yagouaroundi* e *P. concolor*. Também foi  
34 descrita a morfometria espermática seminal e avaliada a eficiência de um caixa  
35 para resfriar o sêmen (BotuBOX<sup>®</sup>, Botupharma, Botucatu – SP, Brasil). Foi coletado  
36 sêmen por eletroejaculação em jaguarundis (n=8, 29 amostras) e onças-pardas  
37 (n=2, 3 amostras) e as amostras foram diluídas nos extensores BotuBOV<sup>®</sup>,  
38 BotuCRIO<sup>®</sup>, BotuDOG<sup>®</sup> (Botupharma, Brasil) e UEM *Cat* (UEM, Brasil), todos com  
39 4% de glicerol, resfriadas em BotuBOX<sup>®</sup> ou refrigerador elétrico e congeladas em  
40 nitrogênio. As amostras frescas apresentaram Índice de Motilidade Espermática  
41 (IME) médio ( $\pm$ DP) de  $63,22 \pm 6,52$  em jaguarundi e  $70,83 \pm 1,44$  na onça-parda.  
42 Os quatro meios apresentaram reduções do IME após o descongelamento em  
43 ambas as espécies, mas não houve diferença de danos ao DNA entre eles. O  
44 BotuBOV<sup>®</sup> provocou menor ( $p < 0,05$ ) redução do IME em jaguarundi, com 25,72%,  
45 e na onça-parda BotuBOV<sup>®</sup> e BotuDOG<sup>®</sup>, ambos com 35,83%. Não houve  
46 diferença entre a BotuBOX<sup>®</sup> e o refrigerador. A morfometria espermática (média  $\pm$   
47 DESVPAD) de jaguarundi e onça-parda, respectivamente, evidenciou que as  
48 cabeças possuem comprimento de  $5,56 \pm 0,29 \mu\text{m}$  e  $5,50 \pm 0,29 \mu\text{m}$ , largura de  
49  $3,27 \pm 0,41 \mu\text{m}$  e  $3,17 \pm 0,25 \mu\text{m}$ , perímetro de  $23,99 \pm 2,09 \mu\text{m}$  e  $23,57 \pm 0,70 \mu\text{m}$   
50 e área de  $14,42 \pm 2,25 \mu\text{m}^2$  e  $13,66 \pm 0,34 \mu\text{m}^2$ . Em conclusão, o BotuBOV<sup>®</sup> foi o

51 extensor mais eficiente nas duas espécies, sendo que o BotuDOG<sup>®</sup> foi igualmente  
52 eficiente na onça-parda.

53

54 Palavras-chave: Jaguarundi; Gato-mourisco; Puma; Morfometria espermática;  
55 BotuBox<sup>®</sup>.

56

### 57 3.1 INTRODUÇÃO

58

59 *Puma* é um gênero da família Felidae composto por duas espécies, onça-  
60 parda [*Puma concolor* (Linnaeus, 1771)] e jaguarundi [*Puma yagouaroundi* (É.  
61 Geoffroy Saint-Hilaire, 1803)], ambas com ampla distribuição no continente  
62 americano. A nível global as duas espécies estão em declínio populacional, mas  
63 são classificadas como menos preocupante (*Least concern*) pela *International*  
64 *Union for Conservation of Nature* – IUCN (Caso et al. 2015, Nielsen et al. 2015).  
65 Por outro lado, no território brasileiro essas espécies são consideradas ameaçadas  
66 de extinção na categoria Vulnerável (Brasil 2018).

67 Em meio aos vários esforços para conservar estas espécies, a reprodução  
68 assistida tem um importante papel, combinando criobancos de sêmen, embriões e  
69 oócitos e técnicas de inseminação ou fertilização assistida, possibilita armazenar  
70 recursos genéticos de indivíduos cativos ou de vida livre e a utilização destes  
71 recursos no manejo de populações ameaçadas (Kochan et al. 2019, Müller et al.  
72 2020). Contudo, apesar do grande potencial das técnicas de reprodução assistida  
73 (TRAs), uma série de limitações ainda permeiam sua utilização. Até o presente  
74 existem poucos estudos que avaliaram o processo de criopreservação de sêmen

75 em jaguarundi e onça-parda (Araujo et al. 2020<sup>a</sup>, Barone et al. 1994<sup>a,b</sup>, Deco-Souza  
76 et al. 2010 e 2013, Madrigal-Valverde 2019, Swanson et al. 2003, Wildt et al. 1988).

77 A maior parte desses estudos é com a onça-parda, sendo que apenas três  
78 envolveram o jaguarundi. Entre estes, Swanson et al. (2003) não relataram a  
79 qualidade do sêmen pós-descongelamento, Madrigal-Valverde (2019) avaliou um  
80 único indivíduo e no capítulo quatro desta tese, o congelamento não era o principal  
81 objetivo, sendo abordados poucos parâmetros. Em onça-parda, apesar de haver  
82 maior número de estudos, poucos meios de criopreservação foram avaliados  
83 (Swanson et al. 2003, Deco-Souza et al. 2013, capítulo quatro desta tese).

84 Em complemento, sabe-se que o sêmen criopreservado é inferior em  
85 comparação ao fresco, pois possui potencial limitado para fertilizar em inseminação  
86 vaginal não cirúrgica, plasma seminal ausente ou altamente diluído, interferência  
87 potencial dos ingredientes dos meios sob as propriedades naturais do  
88 espermatozoide e o trato genital feminino, além do tempo de sobrevivência  
89 diminuído do espermatozoide após a criopreservação (Müller et al. 2020). Estas  
90 limitações inerentes à criopreservação e os poucos estudos com jaguarundi e  
91 onça-parda indicam a necessidade de se avaliar diferentes meios de  
92 criopreservação, com variações em seus principais ingredientes e concentrações, a  
93 fim de se obter meios mais eficientes para ambas as espécies.

94 Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar a eficiência de quatro  
95 meios de criopreservação de sêmen em *P. yagouaroundi* e *P. concolor* e avaliada a  
96 eficiência de uma caixa térmica comercial usada para transporte de sêmen como  
97 refrigerador no processo de criopreservação de sêmen em ambas as espécies.  
98 Também foi descrita a morfometria espermática seminal.

99

## 100 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 101 3.2.1 Animais e questões éticas

102

103 Os animais estudados das espécies *P. yagouaroundi* e *P. concolor*  
104 possuíam idades médias de  $8,03 \pm 3,81$ , variando de 2 a 18 anos e  $6 \pm 1$ , variando  
105 de 6 a 8 anos, respectivamente, e eram provenientes da Associação Mata Ciliar,  
106 Jundiaí, estado de São Paulo, Brasil. Foram realizadas coletas (n=6) em indivíduos  
107 de jaguarundi (n=8) e onça-parda (n=2). Dos oito jaguarundis, sete já estavam  
108 cativos na instituição e um era proveniente de vida livre. Entre os cativos, quatro (A,  
109 B, D, E) estiveram em todas as coletas e os demais participaram de cinco (F),  
110 quatro (C) ou uma (G) coleta. O animal de vida livre participou de uma coleta do  
111 estudo, pois ele foi resgatado após atropelamento e permaneceu pouco tempo no  
112 Centro de Reabilitação de Animais Silvestres da Instituição (CRAS). Em relação a  
113 *P. concolor* um animal participou das duas coletas e outro de uma.

114 Ao longo do estudo foram realizadas seis coletas, em intervalos de no  
115 mínimo três meses, entre os anos de 2018 e 2021, das quais três foram no verão,  
116 duas na primavera e uma no inverno. O protocolo de coleta utilizado seguiu  
117 rigorosos preceitos éticos e foi aprovado, sob os protocolos n. 14/2018, 13/2020 e  
118 35/2020 pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal  
119 do Paraná, Setor Palotina (Palotina, Paraná, Brasil) e pelo Instituto Chico Mendes  
120 de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/Ministério do Meio Ambiente) por meio  
121 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), sob  
122 autorização n. 60832-2.

123

124

### 125 3.2.2 Coleta e criopreservação de sêmen

126

127 Os jaguarundis foram contidos com puçá e anestesiados via IM com  
128 dexmedetomidina (0,005 mg/kg - Dexdomitor®, Zoetis, Campinas, Brasil) associada  
129 à cetamina (10 mg/kg – Quetamina®, Vetnil, São José dos Campos, Brasil). Já as  
130 onças-pardas foram anestesiadas com uso de zarabatana e o mesmo protocolo  
131 anestésico descrito para o jaguarundi. No decorrer do procedimento, foi utilizado  
132 isoflurano inalatório com concentrações variando entre 0,2 e 2%, de acordo com a  
133 demanda do animal.

134 Foi realizada biometria dos testículos e avaliação peniana para definir o  
135 volume testicular e avaliar a presença de aderência, hematoma ou ferimento no  
136 pênis e bolsa escrotal, estado das espículas (tamanho padrão, pequenas ou  
137 ausentes) e consistência (1 - duro, 2 - padrão, 3 - flácido). As espécies estudadas  
138 apresentam diferentes padrões de consistência testicular sendo que,  
139 comparativamente, o jaguarundi apresenta testículos mais firmes que a onça-  
140 parda. Caso fossem abordados com a mesma escala, a categoria padrão de uma  
141 espécie seria equivalente a uma categoria distinta da outra. Dessa forma, foram  
142 normalizadas as escalas para cada espécie, de modo que a categoria 2 equivale à  
143 condição padrão em cada uma e a comparação direta dos resultados entre elas  
144 não pode ser realizada.

145 O volume testicular total foi obtido pela soma dos volumes de cada  
146 testículo, que foi determinado por meio das medidas comprimento (C) e largura (L),  
147 em cm com uso de paquímetro, e calculados pela fórmula  $V = C \times L^2 \times 0,524$   
148 proposta por Wildt et al. (1993), em que 0,524 é uma constante relativa ao formato  
149 tridimensional padrão do testículo felídeo. O sêmen foi obtido por eletroejaculação,

150 de acordo com protocolo proposto por Howard (1993), que consistiu em 80  
151 estímulos elétricos (2 a 5 V) aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos).

152 As amostras obtidas foram mantidas em microtubos esterilizados de 2 mL  
153 em banho-Maria e analisadas em lâminas pré-aquecidas no microscópio óptico,  
154 todos a 37°C. O sêmen fresco e pós-descongelamento foi avaliado com os  
155 seguintes parâmetros, com base em Howard et al. (1986), Pope et al. (1991) e  
156 Papa et al. (2014): volume, utilizando micropipetas graduadas; vigor espermático  
157 (variando de 0 = ausência de movimento até 5 = intenso movimento progressivo);  
158 motilidade espermática (%); pH com fitas indicadoras (Merck Chemical, São Paulo,  
159 Brasil); índice de motilidade espermática; concentração com câmara de Neubauer;  
160 e danos ao DNA.

161 A análise de danos ao DNA seguiu o mesmo protocolo para ensaio cometa  
162 alcalino descrito no Capítulo 4 desta tese, sendo usado o parâmetro percentual de  
163 DNA na cauda para comparar os diferentes extensores. O Índice de Motilidade  
164 Espermática (IME) foi calculado conforme proposto por Howard et al. (1986),  
165 utilizando a fórmula  $IME = [Motilidade (\%) + (vigor \times 20)]/2$ .

166 O sêmen foi criopreservado em quatro extensores, três comerciais  
167 BotuBOV<sup>®</sup>, BotuCRIO<sup>®</sup> e BotuDOG<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu, Brasil), e um em fase  
168 experimental, UEM *Cat*, fornecido pela Universidade Estadual de Maringá –  
169 Campus Regional de Umuarama, Paraná, Brasil. Todos os extensores possuíam  
170 4% de glicerol, variando os demais ingredientes entre si. As amostras foram  
171 diluídas para a concentração de  $1 \times 10^6$  spz/mL em jaguarundi e  $20 \times 10^6$  spz/mL  
172 em onça-parda, envasadas em palhetas de 0,25 mL, refrigeradas por 4 horas,  
173 expostas ao vapor de nitrogênio líquido a 4 cm de altura por 10 min e, por fim,

174 armazenadas imersas no mesmo por no mínimo 30 dias antes da avaliação pós-  
175 descongelamento.

176 A fim de buscar alternativas para realizar a criopreservação em campo ou  
177 locais com ausência de refrigeradores elétricos, foi avaliada a eficiência da caixa  
178 térmica BotuBOX<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu, Brasil) pra resfriar as palhetas de  
179 sêmen até atingir 4°C. A BotuBOX<sup>®</sup> foi desenvolvida com a finalidade de transporte  
180 de sêmen refrigerado, proporcionando um ambiente similar ao de um refrigerador  
181 por meio de barras de gelo reciclável. Dessa forma, palhetas de sêmen do mesmo  
182 animal e extensor foram refrigeradas em refrigerador elétrico e na BotuBOX<sup>®</sup> e  
183 suas eficiências comparadas.

184

### 185 3.2.3 Morfologia e morfometria espermática

186

187 A avaliação dos parâmetros vitalidade, morfologia e morfometria  
188 espermática foi realizada por meio da confecção de esfregaços em duplicata com  
189 amostras frescas de sêmen, corados com as diferentes colorações apresentadas a  
190 seguir e leitura em microscópio óptico. A avaliação da integridade da membrana  
191 espermática/vitalidade (% de células íntegras) foi realizada com coloração de  
192 eosina e nigrosina (1:1). Os parâmetros morfológicos (Tabela 2) e morfométricos  
193 (Tabela 3) foram avaliados com o corante rosa bengala (3%). Para análise de  
194 vitalidade e morfologia foram contadas 200 células e para morfometria, 100 células.  
195 A análise morfométrica foi realizada com auxílio de microscópio óptico calibrado  
196 com lâmina micrometrada e *software* (MicroCapture).

197

198

#### 199 3.2.4 Tratamento estatístico

200

201 Os dados obtidos nas coletas foram submetidos à análise de pressupostos  
202 por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e homoscedasticidade de  
203 Levene, seguidos por Teste t de *Student* e análise de variância (ANOVA *One way*  
204 ou de Medida Repetida) e teste *a posteriori* de Tukey. Todas as análises foram  
205 conduzidas com 5% de probabilidade e utilizando *software* específico (Statistica  
206 versão 7.0, VinceStatSoftware, Inc. Palo Alto CA).

207

### 208 3.3 RESULTADOS

#### 209 3.3.1 Exame andrológico e coleta de sêmen

210

211 O estudo teve duração de três anos, de modo que a idade média ( $\pm$ DP) dos  
212 jaguarundis foi de  $8,03 \pm 3,81$  anos e onças-pardas  $6,00 \pm 1,00$  ano, mas variaram  
213 entre 2 e 18 anos e 5 e 7 anos, respectivamente, para jaguarundi e onça-parda. O  
214 animal C, mais idoso, possuía entre 16 e 18 anos de idade ao longo do estudo e  
215 apresentou parâmetros seminais normais com níveis qualitativos elevados em  
216 todas as coletas que participou. Foi registrado o nascimento de um filhote desse  
217 jaguarundi nesse período, que integrou o estudo na última coleta (animal G). No  
218 momento da conclusão deste estudo o referido animal possuía 20 anos e seguia  
219 apresentando comportamento de corte junto a sua parceira.

220 No exame andrológico inicial foi observado que o jaguarundi e a onça-  
221 parda apresentavam, respectivamente: consistência testicular média de  $2,48 \pm 0,50$   
222 e  $1,83 \pm 0,41$ , espículas pequenas em 20% (n=7) e 0% dos animais/coleta, cauda  
223 dilatada do epidídimo em 22,86% (n=8) e 0% dos animais/coleta e volume

224 testicular de  $2,45 \pm 0,89 \text{ cm}^3$  e  $14,95 \pm 3,24 \text{ cm}^3$ . Em 8,57% (n=3) dos  
225 jaguarundis/coleta foi observada diferença no tónus testicular em duas partes do  
226 testículo, sendo flácido na metade próxima à cauda do epidídimo e padrão ou duro  
227 na outra metade. Esta variação não persistiu nos mesmos indivíduos, sendo  
228 observada uma vez em três indivíduos em duas coletas diferentes.

229 Em relação à consistência testicular, como descrito na seção Material e  
230 Métodos, foi realizada normalização das categorias para cada espécie, não sendo  
231 adequado comparar os resultados delas diretamente. De modo geral, ao se  
232 considerar estas variações observadas em jaguarundi, 58,33% (n=7) ocorreram em  
233 coletas realizadas no mês de outubro (primavera), sendo que as demais estiveram  
234 distribuídas entre outros meses de coleta.

235 O volume testicular de jaguarundi foi  $2,45 \pm 0,89 \text{ cm}^3$  e da onça-parda  
236  $14,95 \pm 3,24 \text{ cm}^3$  que representaram o índice gonadossomático de  $0,045 \pm 0,02\%$  e  
237  $0,035 \pm 0,01\%$ , respectivamente. Em jaguarundi o volume testicular dos indivíduos  
238 variou entre as coletas ao longo de três anos de monitoramento, sendo observadas  
239 flutuações em cada indivíduo (Figura 1), mas não houve diferença estatística  
240 ( $F_{(5,15)}=1,93$ ,  $p=0,14$ ). Em geral, o volume testicular possui correlação direta com a  
241 massa corporal, contudo, a massa dos jaguarundis apresentou pequena variação  
242 ao longo da amostragem, tendo em média  $5,46 \pm 0,75 \text{ kg}$ .

243 Ao longo da amostragem com eletroejaculação foram obtidas em  
244 jaguarundi (6 coletas, 29 amostras) e onça-parda (2 coletas, 3 amostras),  
245 respectivamente, amostras de sêmen em 85,71% (n=30) e 100% (n=3) das  
246 coletas/animal, sendo que em 20% (n=7) e 66,66% (n=2) das ocasiões ocorreu  
247 contaminação com urina. Apesar disso, foram obtidas amostras de sêmen antes da

248 contaminação por urina na maior parte dos casos, de modo que em apenas três  
249 eventos não houve obtenção de amostras sem urina.

250 As diferentes voltagens utilizadas resultaram em variações em alguns  
251 parâmetros. A ereção peniana ocorreu predominantemente na menor voltagem (2  
252 V) e no início da série de estímulos em 82,14% (n=23) dos jaguarundis e 100%  
253 (n=3) das onças-pardas. Foi obtido maior número de amostras de sêmen com 3 e 4  
254 V, que representaram, respectivamente, 24,13% (n=21) e 45,97% (n=40) em  
255 jaguarundi e 34,78% (n=3) em ambas as voltagens na onça-parda. As  
256 contaminações com urina ocorreram, predominantemente, nas voltagens mais  
257 altas, 4 e 5 V, em 85,57% (n=6) das ocasiões em jaguarundi e 50% (n=1) nas  
258 onças-pardas.

259 Ao longo de três coletas consecutivas, um jaguarundi com fertilidade  
260 comprovada anteriormente foi aspérmico, mas em coletas seguintes foram obtidas  
261 amostras de sêmen com características iguais aos demais animais. Apesar da  
262 qualidade das amostras nas demais coletas, o pequeno volume inviabilizou a  
263 criopreservação de sêmen nesse jaguarundi.

264 O sêmen obtido em jaguarundi e onça-parda, respectivamente, possuíam  
265 em média ( $\pm$  DP): volume de  $114,09 \pm 119,67 \mu\text{L}$  e  $1795,67 \pm 602,39 \mu\text{L}$ ;  
266 concentração de  $14,79 \pm 21,25 \times 10^6$  espermatozoides/mL e  $139,56 \pm 19,96 \times 10^6$   
267 espermatozoides/mL; pH  $8,53 \pm 0,92$  e  $8,75 \pm 0,35$ ; IME de  $43,92 \pm 27,49$  e  $70,83 \pm$   
268  $1,44$ ; e  $59,38 \pm 20,28 \%$  e  $79,67 \pm 2,08 \%$  de células vivas (Tabela 4). As amostras  
269 de sêmen em condições qualitativas e volumétricas adequadas à criopreservação  
270 foram congeladas, sendo obtidas 81 palhetas de jaguarundi e 28 de onça-parda,  
271 distribuídas entre os extensores BotuBOV<sup>®</sup>, BotuCRIO<sup>®</sup>, BotuDOG<sup>®</sup>, UEM Cat.

272

### 273 3.3.2 Criopreservação de sêmen

274

275 Em relação à refrigeração do sêmen, não houve diferença entre amostras  
276 em refrigerador elétrico e na BotuBOX<sup>®</sup>, sendo que ambos foram igualmente  
277 eficientes. Nas amostras criopreservadas, após o descongelamento, foram  
278 observadas diferenças significativas entre os quatro extensores avaliados (Tabela  
279 4). Houve grandes perdas de motilidade, que variaram de 44,91% a 61,78% em  
280 jaguarundi e 45% a 75% em onça-parda. Em jaguarundi, os espermatozoides  
281 preservados no meio BotuBOV<sup>®</sup> apresentaram o melhor vigor e IME, enquanto a  
282 maior vitalidade foi observada no UEM *Cat*. Na onça-parda os meios BotuBOV<sup>®</sup> e  
283 BotuDOG<sup>®</sup> apresentaram igual eficiência, com os maiores valores qualitativos.

284 Os diferentes extensores foram comparados por meio de ensaio cometa  
285 alcalino, a fim de evidenciar se a criopreservação ocasionou diferentes danos ao  
286 DNA em função do meio utilizado, conforme descrito no capítulo quatro desta tese.  
287 Os resultados não mostraram nenhuma diferença entre os quatro meios  
288 analisados.

289

### 290 3.3.3 Morfologia e morfometria espermática

291

292 A partir das amostras de sêmen obtidas foram realizadas análises  
293 morfológicas (Figuras 2 e 3 e Tabela 5) e morfométricas (Tabela 6) dos  
294 espermatozoides. Foram observadas diferentes anomalias nas duas espécies, mas  
295 o jaguarundi apresentou maior riqueza de anomalias, o que pode estar relacionado  
296 ao maior número amostral na espécie. Alguns animais foram considerados  
297 teratospérmicos pontualmente, com mais de 60% das células anormais. Contudo,

298 os percentuais de células anormais giraram próximos ao limiar de 60%, como as  
299 próprias médias de jaguarundi  $57,50 \pm 13,89 \%$  e onça-parda  $59,58 \pm 3,28 \%$   
300 demonstraram.

301 As principais anormalidades observadas nas duas espécies foram peça  
302 intermediária dobrada, cauda dobrada, cauda enrolada e cauda fortemente  
303 enrolada (Figuras 2 e 3) que, juntas representam 67,52% e 54,28% dos defeitos  
304 observados em jaguarundi e onça-parda, respectivamente (Tabela 5).

305

306

#### 307 3.4 DISCUSÃO

308

309 A longevidade reprodutiva de jaguarundi em cativeiro não foi relatada, mas  
310 para onça-parda é estimada em pelo menos 20 anos para os machos (Eaton e  
311 Verlander, 1977). Neste estudo, o jaguarundi com 18 anos acompanhado sugere  
312 que a longevidade para a espécie seja similar. Apesar disso, em vida livre é  
313 estimado que um macho de onça-parda de 12 anos seja idoso (Young e Goldman,  
314 1946) e indivíduos senis costumam ser transeunte, com poucas chances de  
315 reprodução (Hornocker 1969).

316 A não obtenção de sêmen em um indivíduo com fertilidade comprovada por  
317 três coletas consecutivas demonstra que alguns indivíduos podem ter baixa  
318 responsividade à eletroejaculação, o que dificulta definir sua fertilidade apenas por  
319 esse método. O estudo de Swanson et al. (2003) relatou a presença de jaguarundis  
320 aspérmicos, mas realizou apenas uma coleta em cada animal, o que pode não  
321 representar bem a fertilidade dos mesmos. Dessa forma, a constatação de  
322 aspermia permanente utilizando eletroejaculação demanda acompanhamento do

323 indivíduo ao longo de várias coletas e em pareamentos com fêmeas, a fim de evitar  
324 um diagnóstico errado com base em dados pontuais.

325 Ao se considerar o IME obtido em jaguarundi ao longo das coletas e suas  
326 respectivas estações climáticas foram observadas pequenas flutuações, sem  
327 diferença estatística, e não foi observada diferença entre animais pareados com  
328 fêmeas e isoladas. Estes dados reforçam o entendimento de que nos jaguarundis a  
329 reprodução pode ocorrer o ano todo, sem sazonalidade reprodutiva na região  
330 tropical (Bailey, 1905, Ewer, 1973; Weigel, 1975). Para a onça-parda as coletas  
331 deste estudo ocorreram apenas no verão, mas acredita-se que a reprodução  
332 também ocorra o ano todo nos trópicos (Maehr et al. 1991).

333 Apesar de se reproduzirem ao longo de todo o ano, há relatos de maior  
334 incidência de nascimentos de onça-parda em alguns meses do ano em regiões  
335 subtropicais, diferindo de acordo com a região, como na Flórida ocorrendo de  
336 março a julho (Maehr et al. 1991), Utah e Nevada entre junho e outubro (Lindzey et  
337 al. 1994, Robinette et al. 1961) e Alberta (Canadá) nos meses de verão (Ross &  
338 Jalkotzy 1992). Em jaguarundis tropicais a reprodução ocorre o ano todo (Bailey,  
339 1905, Ewer, 1973; Weigel, 1975), mas há relatos de reprodução em apenas dois  
340 períodos no México (Guggisberg, 1975; Leopold, 1959), e um período entre agosto  
341 e março na extremidade norte de sua distribuição geográfica nos EUA (Bailey,  
342 1905).

343 Após a obtenção do sêmen, os dispositivos utilizados para resfria-lo foram  
344 igualmente eficientes, o que demonstra o potencial da BotuBOX® para utilização  
345 em condições de campo ou similares. Alternativa parecida foi avaliada por Araujo et  
346 al. (2020<sup>b</sup>), no qual foram usadas caixas térmicas com barras de gelo previamente  
347 imersas em nitrogênio líquido em onça-parda e onça-pintada, sendo eficiente nas

348 duas espécies, contudo os autores não compararam a eficiência com  
349 refrigeradores que são os mais utilizados.

350 No congelamento e descongelamento, é normal que ocorra perda de  
351 motilidade espermática, não sendo diferente nos dados de jaguarundi ou onça-  
352 parda deste estudo. Do ponto de vista dos danos ao DNA, os quatro meios foram  
353 igualmente eficientes, de modo que a escolha do meio a ser utilizado deve se  
354 basear em outros parâmetros.

355 Em Deco-Souza et al. (2013) no descongelamento de sêmen de onça-  
356 parda a motilidade espermática variou de 40 a 42,5%, representando uma queda  
357 média de 33,75% em relação ao sêmen fresco. Os autores avaliaram a influência  
358 de duas concentrações de glicerol, 5 e 7,5%, mas não houve diferença entre elas  
359 (Deco-Souza et al. 2013). No presente estudo todos os extensores possuíam 4%  
360 de glicerol, de modo que as diferenças observadas entre eles devem ser fruto dos  
361 demais constituintes de cada um. Em novas investigações seria interessante  
362 avaliar maior teor de glicerol, bem como variar as concentrações de outros  
363 componentes dos extensores.

364 As principais anormalidades morfológicas observadas neste estudo  
365 também representam as mais observadas em onça-parda nos estudos de Wildt et  
366 al. (1988), Deco-Souza (2009) e Swanson et al. (2003). Em jaguarundi foi  
367 encontrado apenas o estudo de Swanson et al. (2003) com avaliação morfológica,  
368 que também observou como mais frequentes as principais anormalidades relatadas  
369 no presente estudo. Este conjunto de resultados suporta que elas são as principais  
370 anormalidades nas duas espécies.

371 Nesse estudo, foi realizada a descrição morfométrica espermática seminal  
372 de jaguarundi e onça-parda (Tabela 6). Foi encontrada apenas uma caracterização

373 espermática epididimária de onça-parda, realizada em um indivíduo (Cucho et al.  
374 2016). De modo geral, os valores observados nas duas espécies são muito  
375 próximos neste estudo e maiores que os espermatozoides epididimários descritos  
376 por Cucho et al. (2016). Em estudos futuros seria interessante avaliar no mesmo  
377 indivíduo se os espermatozoides seminais e epididimários possuem alguma  
378 diferença de tamanho ou se a diferença entre os estudos é fruto da casualidade.

379 Por fim, é possível realizar uma comparação entre os dados das duas  
380 espécies do gênero *Puma*. De modo geral os valores de muitos parâmetros foram  
381 semelhantes, indicando que o gênero possui características conservadas como as  
382 anormalidades espermáticas, morfometria da cabeça, vigor, IME, pH, vitalidade e  
383 percentual de danos ao DNA.

384 Por outro lado, a diferença de tamanho entre as espécies parece influenciar  
385 no volume testicular e volume de sêmen ejaculado. Estas diferenças são  
386 esperadas, uma vez que a produção de espermatozoides é diretamente ligada ao  
387 volume testicular, que é diferente em função da grande diferença de massa  
388 corporal das espécies. Apesar disso, os valores do índice gonadossomático  
389 também indicam que o percentual de massa corporal alocada nos testículos é  
390 conservado no gênero, com  $0,045 \pm 0,02$  % em jaguarundi e  $0,035 \pm 0,01$  % em  
391 onça-parda. Os estudos de Silva (2014) com jaguarundi e Swanson et al. (2003)  
392 com ambas as espécies observaram índices gonadossomáticos muito semelhantes  
393 ao presente estudo.

394

395

396

397

### 398 3.5 CONCLUSÕES

399

400 No presente estudo foi demonstrado que a BotuBOX<sup>®</sup> pode ser utilizada  
401 para refrigerar o sêmen de forma eficiente em jaguarundi e onça-parda. Foi descrita  
402 a morfometria espermática de ambas as espécies do gênero *Puma* e verificado  
403 que, com 4% de glicerol, o extensor BotuBOV<sup>®</sup> é mais eficiente que o BotuCRIO<sup>®</sup> e  
404 UEM *Cat* em jaguarundi e onça-parda. Na onça-parda, o meio BotuDOG<sup>®</sup> foi tão  
405 eficiente quanto o BotuBOV<sup>®</sup>.

406

### 407 3.6 AGRADECIMENTOS

408 Os autores agradecem a colaboração de todos os membros da Associação  
409 Mata Ciliar (Jundiaí, São Paulo, Brasil), que participaram diretamente do estudo.

410

### 411 3.7 FINANCIAMENTO

412

413 Este trabalho foi financiado pela Universidade Federal do Paraná (UFPR),  
414 via financiamento do Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP), pela  
415 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio  
416 da concessão de bolsa concedida ao primeiro autor e pela Associação Mata Ciliar  
417 que disponibilizou sua infraestrutura e reagentes para a realização deste estudo.

418

419

420

421

422

## 423 3.8 REFERÊNCIAS

424

425 Almeida, LB, Queirolo, D, Beisiegel, BM, Oliveira, TG, 2013. Avaliação do estado  
426 de conservação do Gato-mourisco *Puma yagouaroundi* (É. Geoffroy Saint-Hilaire,  
427 1803) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira* 3(1): 107-121.

428 Araujo, GR, Paula, TAR, Deco-Souza, T, Morato, RG, Bergo, LCF, Silva, LC, Jorge-  
429 Neto, PN, Sampaio, BFB, 2020<sup>a</sup>. Colheita farmacológica de sêmen de onças-  
430 pardas (*Puma concolor*: Mammalia: Carnivora: Felidae). *Arq. Bras. Med. Vet.*  
431 *Zootec.* 72 (02). <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11030>

432 Araujo, GR, Deco-Souza, T, Bergo, LCF, Silva, LC, Morato, RG, Jorge-Neto, PN,  
433 Silva, MCC, Macedo, GG, Paula, TAR, 2020<sup>b</sup>. Field friendly method for wild feline  
434 semen cryopreservation. *Journal of Threatened Taxa* 12(5): 15557–15564.  
435 <https://doi.org/10.11609/jott.5744.12.5.15557-15564>.

436 Azevedo, FC, Lemos, FG, Almeida, LB, Campos, CB, Beisiegel, BM, Paula, RC,  
437 Crawshaw-Junior, PG, Ferraz, KMPBM, Oliveira, TG, 2013. Avaliação do risco de  
438 extinção da onça-parda *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) no Brasil. *Biodiversidade*  
439 *Brasileira* 3(1): 107-121.

440 Bailey, V, 1905. Biological survey of Texas. *North American Fauna* 25:1-222.  
441 <https://doi.org/10.3996/nafa.25.0001>

442 Barone, MA, Roelke, ME, Howard, J, Brown, JL, Anderson, AE, Wildt, DE, 1994.  
443 Reproductive characteristics of male Florida panthers: Comparative studies from  
444 Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American Zoos. *Journal of*  
445 *Mammalogy* 75(1): 150–162. <https://doi.org/10.2307/1382247>

446 Caso, A, Oliveira, T, Carvajal, SV, 2015. *Herpailurus yagouaroundi*. The IUCN Red  
447 List of Threatened Species: e.T9948A50653167. Disponível em:

448 <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T9948A50653167>. Acesso em:  
449 16 fev. 2022.

450 Deco-Souza, T, Paula, TAR, Costa, DS, Araújo, GR, Garay, RM, Vasconcelos,  
451 GSC, Csermak-Junior, AC, Silva, LC, Barros, JBG, 2010. Coleta e avaliação de  
452 sêmen de pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos mantidos em cativeiro.  
453 *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 34(4): 252-259.

454 Deco-Souza, T, Paula, TAR, Costa, DS, Costa, EP, Barros, JBG, Araujo, GR,  
455 Carreta-Jr, M, 2013. Comparação entre duas concentrações de glicerol para a  
456 criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). *Animais Selvagens,*  
457 *Pesq. Vet. Bras.* 33(4). <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400015>

458 Eaton, RL, Verlander, KA, 1977. Reproduction in the puma: biology, behavior and  
459 ontogeny. Pp. 45-70, In: The world's cats (R. L. Eaton, ed.), Vol. 3, No.3. Carnivore  
460 Research Inst., Burke Museum, Univ. Washington, Seattle, 144 pp.

461 Ewer, RF, 1973. The carnivores. Cornell University Press, Ithaca, New York, 494  
462 pp. Disponível em: [https://www.cornellpress.cornell.edu/book/9780801407451/the-](https://www.cornellpress.cornell.edu/book/9780801407451/the-carnivores/#bookTabs=1)  
463 [carnivores/#bookTabs=1](https://www.cornellpress.cornell.edu/book/9780801407451/the-carnivores/#bookTabs=1) Acesso em: 15 jan. 2022.

464 Guggisberg, CAW, 1975. Wild cats of the world. Taplinger Publishing Company,  
465 New York, 328 pp.

466 Hornocker, MG, 1969. Winter Territoriality in Mountain Lions. *Journal of Wildlife*  
467 *Management* 33(3): 457-464.

468 Howard, JG, 1993. Semen collection and analysis in carnivores. In: Fowler ME. Zoo  
469 and wild animal medicine current therapy. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.  
470 390-399.

- 471 Howard, JG, Bush, M, Wildt, DE, 1986. Semen collection, analysis and  
472 cryopreservation in nondomestic mammals pp. 1047–1053. In: Morrow, D. (Ed.).  
473 Current therapy in theriogenology II. Philadelphia.
- 474 Kochan, J, Nizański, W, Moreira, N, Cubas, ZS, Nowak, A, Prochowska, S, Partyka,  
475 A, Młodawska, W, Skotnicki, J, 2019. ARTs in wild felid conservation programs in  
476 Poland and in the World. *J Vet Res.* 63(3):457-464. [https://doi.org/10.2478/jvetres-](https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0043)  
477 2019-0043.
- 478 Leopold, AS, 1959. Wildlife of Mexico. University of California Press, Berkeley, 568  
479 pp.
- 480 Lindzey, FG, Van Sickle, WD, Ackerman, BB, Barnhurst, D, Hemker, TP, Laing, SP,  
481 1994. Cougar Population Dynamics in Southern Utah. *The Journal of Wildlife*  
482 *Management* 58(4): 619-624.
- 483 Madrigal-Valverde, M, 2019. Criopreservação de espermatozoides de felídeos  
484 domésticos e silvestres. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência  
485 Animal nos Trópicos) Universidade Federal da Bahia. 136 p.
- 486 Maehr, DS, Land, ED, Roelke, ME, 1991. Mortality Patterns of Panthers in  
487 Southwest Florida. *Proc. Annu. Conf. Southeast. Fish and Wildl. Agencies* 45:201-  
488 207.
- 489 Müller, K, Eder, S, Jakop, U, Schiller, J, Müller, P, Bashawat, M, 2020. Assisted  
490 reproduction for felid species conservation-Sperm competences at risk. *Reprod*  
491 *Domest Anim.* 55(2):55-60. <https://doi.org/10.1111/rda.13581>.
- 492 Nielsen, C, Thompson, D, Kelly, M, Lopez-Gonzalez, CA, 2015. *Puma concolor*  
493 (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species:  
494 e.T18868A97216466. [https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-](https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T18868A50663436.en)  
495 4.RLTS.T18868A50663436.en.

- 496 Papa, FO, Alvarenga, MA, Dell'Aqua, JA, Monteiro, GA, Sancler-Silva, YFR,  
497 Ramires-Neto, C, 2018. Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino.  
498 Botupharma. Disponível em: <https://botupharma.com.br/arq/Andrologia.pdf>. Acesso  
499 em: 3 jan. 2018.
- 500 Pope, CE, Zhang, YZ, Dresser, BL, 1991. A simple staining method for evaluating  
501 acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22(1):  
502 87-95.
- 503 Robinette, WL, Gashwiler, JS, Morris, OW, 1961. Notes of cougar productivity and  
504 life history. *J. Mammal.* 42(2): 204-217. <https://doi.org/10.2307/1376830>
- 505 Ross, PI, Jalkotzy, MG, 1992. Characteristics of a hunted population of cougars in  
506 southwestern Alberta. *The Journal of Wildlife Management* 56(3): 417-426.
- 507 Silva, VHD, 2014. Avaliação do processo espermatogênico de gatos-mouriscos  
508 (*Puma yagouarundi*, Lacépède, 1809) adultos. Dissertação (Programa de Pós-  
509 Graduação em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Viçosa. 54 f.
- 510 Souza, TD, 2009. Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de pumas  
511 (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em  
512 Biotecnologia, diagnóstico e controle de doenças; Epidemiologia e controle de  
513 qualidade de prod. de) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- 514 Swanson, WF, Johnson, WE, Cambre, RC, Citino, SB, Quigley, KB, Brousset, DM,  
515 Morais, RN, Moreira, N, O'Brien, SJ, Wildt, DE, 2003. Reproductive status of  
516 endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ  
517 conservation. *Zoo Biology* 22(5): 421-441. <https://doi.org/10.1002/zoo.10093>
- 518 Weigel, I, 1975. Small felids and clouded leopards. Pp, 281-332, in Grzimek's  
519 animal life encyclopedia (R. Altevogt, R. Angermann, H. Dathe, B. Grzimek, K.

520 Herter, D. Muller-Using, U. Rahm, and E. Thenius, eds.), Van Nostrand Reinhold,  
521 New York, 12:1-657.

522 Wildt, DE, Phillips, LG, Simmons, LG, Chakraborty, PK, Brown, JL, Howard, JG,  
523 Teare, A, Bush, M, 1988. A comparative analysis of ejaculate and hormonal  
524 characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard and puma. *Biology of*  
525 *Reproduction* 38: 245-255. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.2.245>

526 Wildt, DE, Bush, M, O'Brien, SJ, 1993. Training Manual: reproduction, genetics and  
527 veterinary medicine. Front Royal: Center for New Opportunities in Animal Health  
528 Sciences (NOAHS), Conservation and Research Center, National Zoo, Smithsonian  
529 Institution.

530 Young, SP, Goldman, EA, 1946. The puma, mysterious American cat. The Amer.  
531 Wildl. Inst., Washington, D.C., 358. Disponível em:  
532 [https://archive.org/details/pumamysteriousam00youn/page/n5/mode/2up?view=thea](https://archive.org/details/pumamysteriousam00youn/page/n5/mode/2up?view=theater)  
533 [ter](https://archive.org/details/pumamysteriousam00youn/page/n5/mode/2up?view=theater) Acesso em: 13 jan. 2022.

534

535

536

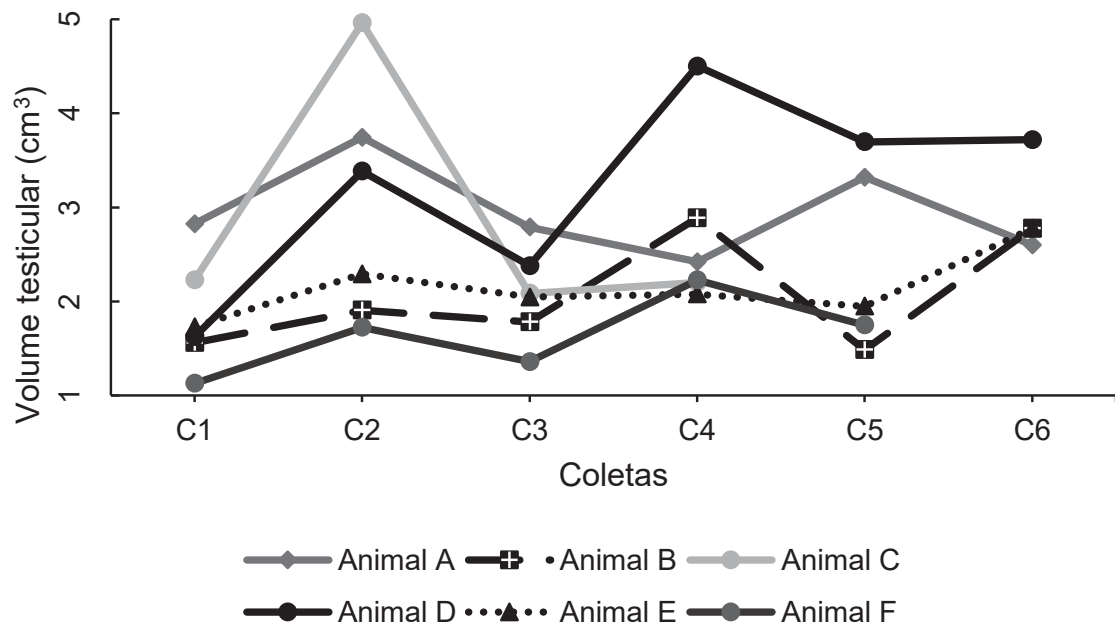


FIGURA 1 – Variação do volume testicular em  $\text{cm}^3$  de jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) ao longo de seis coletas (C1-C6). São apresentados os dados dos indivíduos ( $n=6$ ) que participaram do maior número de coletas.

538 TABELA 4 – Parâmetros seminais (média ± desvio padrão) de amostras frescas e pós-descongelamento de *Puma yagouaroundi* (n=7) e *Puma*  
 539 *concolor* (n=2), obtidas por eletroejaculação.

<b>Parâmetros</b>	<b>Sêmen fresco</b>	<b>BotuBOV®</b>	<b>BotuCRIO®</b>	<b>BotuDOG®</b>	<b>UEM Cat</b>	<b>Sumário estatístico#</b>
<i>P. yagouaroundi</i>						
Vigor (1-5)	3,23 ± 0,26 <sup>a</sup>	3 ± 0,29 <sup>*a</sup>	0,60 ± 0,55 <sup>bc</sup>	0 <sup>c</sup>	1 ± 1,07 <sup>b</sup>	F <sub>(4,31)</sub> = 46,35 p<0,001
Motilidade (%)	61,78 ± 9,56 <sup>*a</sup>	10,00 ± 2,45 <sup>*b</sup>	9,00 ± 11,94 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	16,87 ± 21,37 <sup>b</sup>	F <sub>(4,13)</sub> = 36,56 p<0,001
IME	63,22 ± 6,52 <sup>a</sup>	37,50 ± 3,13 <sup>b</sup>	10,50 ± 9,90 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	18,43 ± 19,81 <sup>bc</sup>	F <sub>(4,13)</sub> = 44,89 p<0,001
Vitalidade (%)	71,83 ± 7,06 <sup>*a</sup>	20,25 ± 2,50 <sup>*b</sup>	26,40 ± 13,96 <sup>b</sup>	10,68 ± 6,39 <sup>b</sup>	31,87 ± 4,51 <sup>b</sup>	F <sub>(4,13)</sub> =32,55 p<0,001
<i>P. concolor</i>						
Vigor (1-5)	3,33 ± 0,29 <sup>a</sup>	2 ± 0,25 <sup>*b</sup>	0 <sup>c</sup>	2 ± 0,32 <sup>*b</sup>	0 <sup>c</sup>	F <sub>(4,15)</sub> = 386,72 p<0,001
Motilidade (%)	75,00 ± 5 <sup>*a</sup>	30 ± 2,76 <sup>*b</sup>	0 <sup>c</sup>	30 ± 2,81 <sup>*b</sup>	0 <sup>c</sup>	F <sub>(4,15)</sub> = 468,75 p<0,001
IME	70,83 ± 1,44 <sup>a</sup>	35 ± 0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	35 ± 3,16 <sup>*b</sup>	0 <sup>c</sup>	F <sub>(4,15)</sub> = 1006,0 p<0,001
Vitalidade (%)	79,67 ± 2,82 <sup>*a</sup>	50 ± 5,29 <sup>*b</sup>	35 ± 3,15 <sup>c</sup>	50 ± 7,5 <sup>*b</sup>	5 ± 8,33 <sup>d</sup>	F <sub>(4,15)</sub> = 245,56 p<0,001

540 BotuBOV®, BotuCRIO®, BotuDOG® e UEM Cat são extensões para criopreservação; IME - Índice de Motilidade Espermiática = [Motilidade (%)  
 541 + (vigor X 20)]/2 (Howard et al. 1986); letras diferentes indicam diferença significativa entre os tipos de amostra. \*Indica diferença estatística  
 542 entre espécies. #Nas comparações estatísticas foram utilizados os dados de sêmen fresco apenas das amostras que foram congeladas.

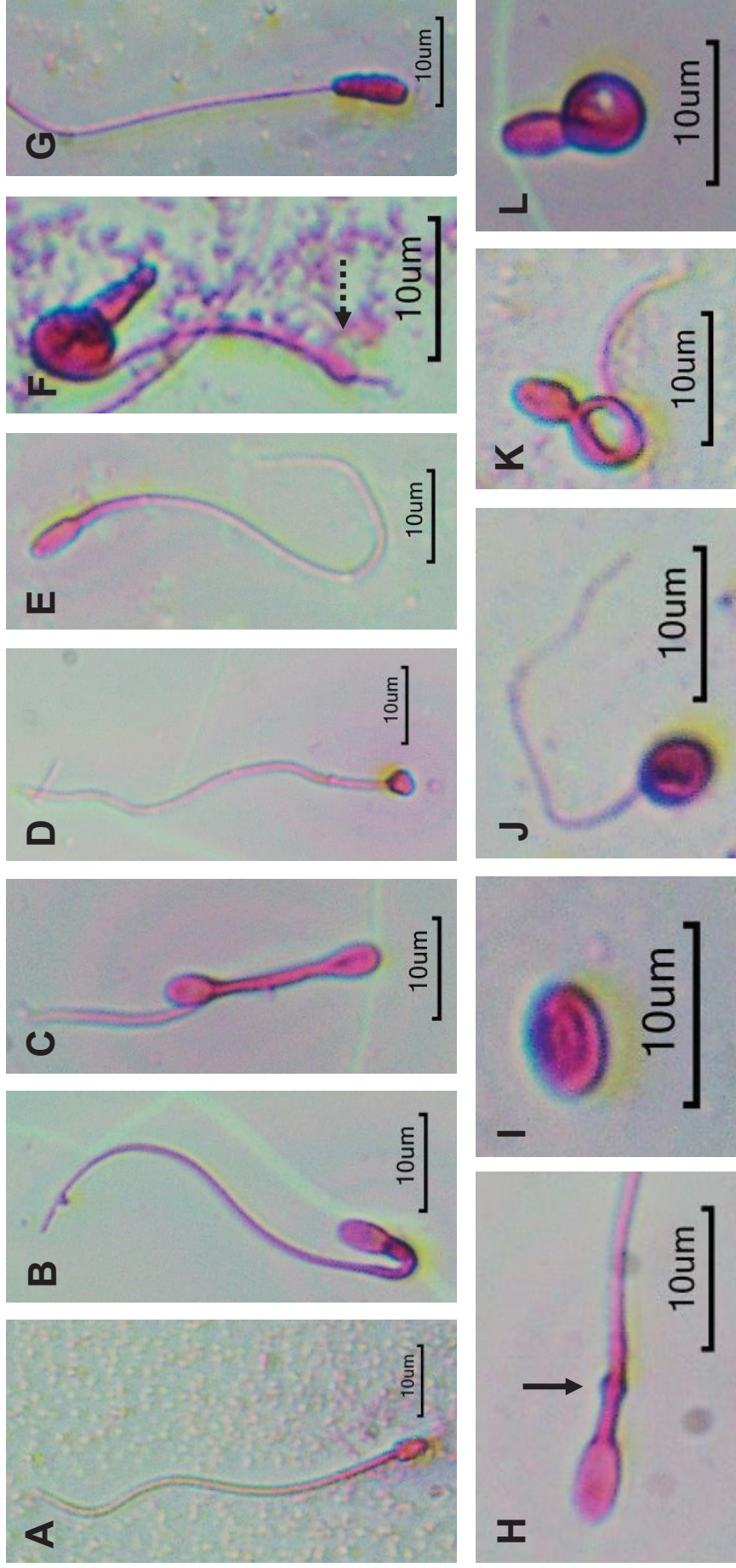


FIGURA 2 – Fotomicrografias de diferentes padrões morfológicos de espermatozoides seminais de *Puma yagouaroundi*. A – espermatozoide normal; B – peça intermediária dobrada; C – cauda dobrada; D – microcefalia; E – cabeça fusiforme; F – gota citoplasmática distal (seta pontilhada); G – cabeça piriforme; H – gota citoplasmática na peça intermediária (seta); I – espermatozoide decapitado; J – Cabeça arredondada; K – cauda enrolada; L – cauda fortemente enrolada.

543

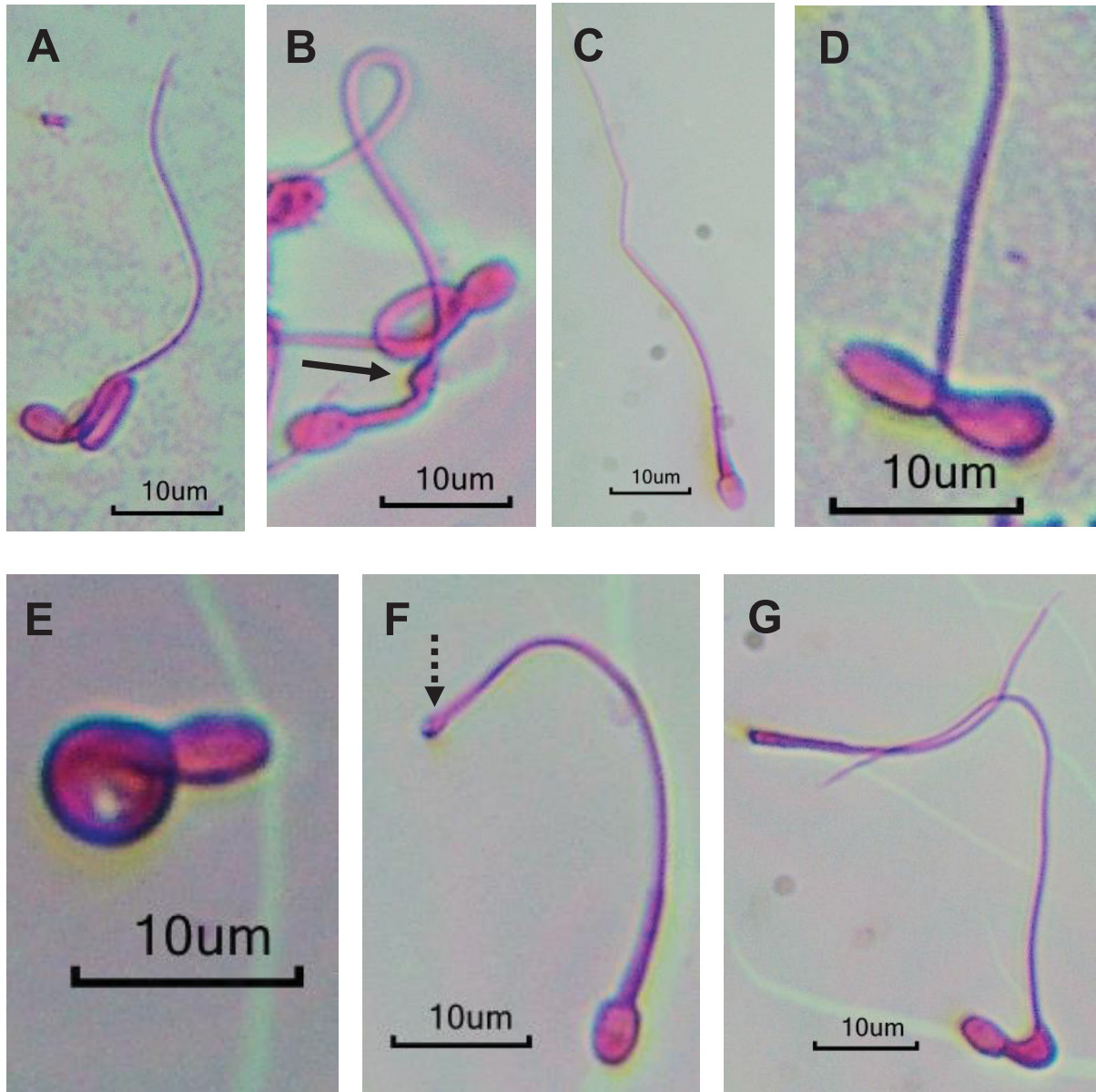


Figura 3 - Fotomicrografias de diferentes padrões morfológicos de espermatozoides seminais de *Puma concolor*. A – peça intermediária e cauda dobradas; B – gota citoplasmática distal (seta); C – cauda dobrada; D – duas cabeças; E – cauda fortemente enrolada; F – cauda dobrada na região terminal (seta pontilhada); G – peça intermediária dobrada com membrana da peça anormal.

544

545

546

547

548

549 TABELA 5 – Percentuais médios  $\pm$  DP de diferentes tipos de anormalidades espermáticas  
 550 observadas em *Puma yagouaroundi* e *Puma concolor*.

Parâmetros	<i>P. yagouaroundi</i> (%)	<i>P. concolor</i> (%)
Anormais	57,50 $\pm$ 13,89	59,58 $\pm$ 3,28
Defeitos Maiores	58,72 $\pm$ 11,95	56,29 $\pm$ 2,27
Defeitos menores	41,28 $\pm$ 11,95	43,71 $\pm$ 2,28
Cabeça piriforme	3,56 $\pm$ 5,56	0,00
Microcefálico	3,14 $\pm$ 3,09	0,00
Cabeça amorfa	1,27 $\pm$ 1,58	0,00
Decapitado	5,82 $\pm$ 3,30	14,50 $\pm$ 1,82
Cauda fortemente enrolada	11,08 $\pm$ 13,10	10,53 $\pm$ 0,70
Peça intermediária dobrada	26,48 $\pm$ 13,03	15,79 $\pm$ 1,30
Gota na peça intermediária	6,16 $\pm$ 5,92	12,72 $\pm$ 4,34
Duas cabeças	1,21 $\pm$ 2,15	2,75 $\pm$ 3,89
Cabeça fusiforme	1,49 $\pm$ 2,53	0,00
Cauda enrolada	12,35 $\pm$ 3,29	6,92 $\pm$ 2,34
Cabeça arredondada	4,26 $\pm$ 4,03	0,00
Cauda dobrada	17,61 $\pm$ 6,48	21,04 $\pm$ 3,57
Sem cauda, mas com peça intermediária	1,19 $\pm$ 1,58	0,00
Gota distal	2,20 $\pm$ 2,09	10,52 $\pm$ 1,83
Cauda curta	2,17 $\pm$ 2,59	5,23 $\pm$ 0,45

551

552

553 TABELA 6 – Descrição morfométrica da cabeça de espermatozoides do sêmen de *Puma*  
 554 *yagouaroundi* e *Puma concolor* comparados a espermatozoides epididimais de *P. concolor*  
 555 (Cucho et al. 2016).

Parâmetros	<i>P. yagouaroundi</i>	<i>P. concolor</i>	Cucho et al. (2016)*
<b>Comprimento da cabeça (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	5,56 $\pm$ 0,29 (2,68-8,72)	5,50 $\pm$ 0,29 (4,66-6,69)	4,85 (4,23 - 5,69)
<b>Largura da cabeça (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	3,27 $\pm$ 0,41 (2,23-5,30)	3,17 $\pm$ 0,25 (2,53-3,81)	2,58 (2,27 - 3,04)
<b>Perímetro da cabeça (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	23,99 $\pm$ 2,09 (11,09-36,80)	23,57 $\pm$ 0,70 (19,99-26,84)	13,35 (8,59 - 14,33)
<b>Área da cabeça (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	14,42 $\pm$ 2,25 (5,62-33,08)	13,66 $\pm$ 0,34 (10,01-17,72)	10,60 (11,69 - 15,84)

556 \*Dados de espermatozoides epididimais de *P. concolor* obtidos do estudo de Cucho et al.  
557 (2016) desenvolvido com um indivíduo proveniente de Cusco, Peru.

CAPÍTULO 4  
UTILIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA AVALIAÇÃO DO DNA DE  
SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO DE FELÍDEOS DO  
GÊNERO *Puma*

Capítulo formatado segundo as diretrizes do periódico *Theriogenology*.

1 **Utilização do ensaio cometa para avaliação do DNA de sêmen fresco e**  
2 **criopreservado de felídeos do gênero *Puma***

3  
4 Dieferson da Costa Estrela<sup>1</sup>, Guilherme Malafaia<sup>2</sup>, Bruna de Oliveira Mendes<sup>3</sup>,  
5 Marina Libonati de Azevedo<sup>4</sup>, Cristina Harumi Adania<sup>4</sup>, Amanda Rodrigues  
6 Tanamachi<sup>5</sup>, Daisy Maria Fávero Salvadori<sup>5</sup>, Nei Moreira<sup>6</sup>

7  
8 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná,  
9 Paraná, Brasil. Instituto Federal Sul-rio-grandense – Campus Avançado Jaguarão,  
10 Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: dieferonestrela@gmail.com

11 <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado.  
12 Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, Goiás, Brasil.

13 <sup>3</sup>Mestre em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado.

14 <sup>4</sup>Associação Mata Ciliar, Jundiaí, São Paulo, Brasil.

15 <sup>5</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, Botucatu, São  
16 Paulo, Brasil.

17 <sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná,  
18 Paraná, Brasil.

19  
20 **Destaques**

21 - Padronização do ensaio cometa neutro e alcalino em jaguarundi

22 - Padronização do ensaio cometa neutro e alcalino em onça-parda

23 - Ensaio alcalino foi mais sensível que o neutro

24 - Criopreservação aumentou a mortalidade espermática

25 - Não houve diferença na indução de danos entre os meios de criopreservação

26

## 27 RESUMO

28

29 O conjunto gênico de um espermatozoide é sua principal contribuição para a  
30 fertilização, sendo a integridade do DNA fundamental para o desenvolvimento do  
31 embrião. O ensaio cometa (*single cell gel electrophoresis*) é uma ferramenta  
32 sensível para avaliar lesões no DNA, mas, apesar de seu amplo uso em algumas  
33 espécies de mamíferos, não existia na literatura nenhum protocolo adaptado para  
34 os felídeos. Assim, o presente estudo objetivou padronizar protocolos do ensaio  
35 cometa, nas versões alcalina e neutra, para as espécies do gênero *Puma*, e avaliar  
36 se a criopreservação do sêmen *per se* ocasionaria alterações no DNA. Foram  
37 coletadas amostras de sêmen de animais cativos (*P. concolor* n=2; *P.*  
38 *yagouaroundi* n=7) na Associação Mata Ciliar, Jundiáí, Brasil, e conduzido o ensaio  
39 em amostras de sêmen frescas ou refrigeradas por cinco horas. Os achados  
40 mostraram que ambas as versões do ensaio foram eficazes para a detecção de  
41 danos na molécula do DNA das duas espécies, mas que a versão alcalina foi a  
42 mais sensível. Os níveis basais de danos nos indivíduos férteis das espécies  
43 foram, em média, de 24,43%  $\pm$  15,80 e 23,68%  $\pm$  9,37 pelo cometa alcalino e de  
44 1,91%  $\pm$  2,32 e 2,54%  $\pm$  0,70 pelo neutro, respectivamente, em *P. concolor* e *P.*  
45 *yagouaroundi*. A criopreservação das amostras de sêmen induziu aumento da  
46 mortalidade dos espermatozoides. Concluindo, os protocolos utilizados para o  
47 ensaio cometa e os dados obtidos podem contribuir para a avaliação da fertilidade  
48 de espécies do gênero *Puma* e para o desenvolvimento de técnicas de reprodução  
49 assistida.

50

51 Palavras-chave: Fertilidade animal; danos ao DNA; criopreservação de sêmen;  
52 eletroforese de célula única.

53

## 54 4.1 INTRODUÇÃO

55

56 A fertilidade masculina envolve vários aspectos complementares, de modo  
57 que a soma destes fatores possibilita ou não a reprodução. O espermatozoide  
58 possui o papel principal de transportar um conjunto gênico até o gameta feminino e,  
59 portanto, a integridade do DNA é fundamental. Diante disso, a análise de  
60 características básicas do sêmen, como concentração, motilidade e morfologia

61 possui capacidade limitada de predizer a fertilidade do indivíduo [1]. Em função  
62 dessas limitações, outras variáveis têm sido estudadas, sendo que a integridade do  
63 DNA tem despontado como um importante biomarcador [1].

64 As técnicas de análise de fragmentação do DNA são especialmente úteis  
65 para ampliar a avaliação sobre a fertilidade e têm indicado causas associadas a  
66 condições como varicocele, astenoteratozoospermia e  
67 oligoastenoteratozoospermia [2]. Recentemente, Muratori et al. [3] analisaram a  
68 correlação entre células viáveis e a fragmentação do DNA e concluíram que danos  
69 na molécula são eficientes biomarcadores para predizer a fertilidade masculina.  
70 Entre as técnicas mais utilizadas para avaliar os níveis de lesões no DNA está o  
71 ensaio cometa, técnica muito utilizada em células somáticas para avaliar  
72 genotoxicidade [4]. Sua utilização em espermatozoides teve início com o estudo de  
73 Haines et al. [5], envolvendo homens e camundongos.

74 Este ensaio é realizado em duas versões, a neutra, que detecta quebras de  
75 fitas duplas do DNA (dsDB), e a alcalina, que possibilita a detecção de quebras de  
76 fita simples (ssDB), dsDB, de sítios álcali-lábeis e ligações cruzadas no DNA  
77 [6,7,8]. O conhecimento sobre os níveis e perfil (dsDB e/ou ssDB) de danos no  
78 DNA de um indivíduo fornece a possibilidade de entender os mecanismos de ação  
79 do agente causador dos danos (genotoxina).

80 Diferente das células somáticas, os espermatozoides não possuem  
81 mecanismos de reparo do DNA e, caso ocorram danos, o reparo ficará a cargo do  
82 gameta feminino [8]. Após a penetração no oócito, os espermatozoides com  
83 extensos dsDB associados a processos apoptóticos excedem a capacidade de  
84 reparo do oócito, levando à interrupção do desenvolvimento embrionário [9]. De  
85 forma similar, ssDB não reparados também podem resultar em dsDB quando  
86 ocorre a replicação do DNA, levando a anormalidades cromossômicas estruturais  
87 que podem ocasionar perdas gestacionais [10].

88 Em homens, a utilização do ensaio cometa associado à fertilidade é mais  
89 frequente, mas em animais de produção e selvagens o cenário é diferente.  
90 Algumas espécies de mamíferos já possuem protocolos adaptados como é o caso  
91 do camundongo, cão, touro, suíno, équidna, coala, canguru-cinza-oriental e  
92 vombate [11,12,13,14,15]. Dentre estas, poucas são espécies selvagens, restando,  
93 portanto, uma lacuna sobre os níveis basais de lesões no DNA de cada espécie, os

94 possíveis danos causados pela criopreservação do sêmen e suas possíveis  
95 repercussões para a conservação de espécies ameaçadas de extinção.

96 Embora a utilização do ensaio cometa seja bastante promissora, as  
97 condições em que tradicionalmente o ensaio é realizado podem limitar as  
98 possibilidades de uso com material colhido no campo, longe de infraestrutura  
99 laboratorial adequada. Em geral, o ensaio demanda uma série de equipamentos e  
100 as amostras podem ser armazenadas apenas por curtos períodos de tempo, uma  
101 vez que o armazenamento pode induzir aumento dos níveis de fragmentação da  
102 molécula.

103 Assim sendo, são raros ou mesmo inexistentes, estudos utilizando o ensaio  
104 cometa em espermatozoides de felídeos (apesar da maioria das espécies estar  
105 ameaçada de extinção). Portanto, o presente estudo objetivou estabelecer  
106 protocolos do ensaio cometa nas versões alcalina e neutra, para investigar a  
107 frequência de danos no DNA nas espécies onça-parda (*Puma concolor*) e  
108 jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) e avaliar se a criopreservação poderia induzir  
109 danos à molécula, aumentando, artificialmente, a quantidade de lesões.

110

111

## 112 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 113 4.2.1 Animais e questões éticas

114

115 Foram avaliados animais das espécies *P. yagouaroundi* (n=7) e *P. concolor*  
116 (n=2), mantidos na Associação Mata Ciliar, Jundiá, estado de São Paulo, Brasil.  
117 Os felídeos possuíam em média ( $\pm$ DP) idade de 8 ( $\pm$ 2,49) anos. Foram realizadas  
118 duas coletas de sêmen e os métodos utilizados seguiram rigorosos preceitos éticos  
119 e foram aprovados (Protocolo nº 35/2020) pela Comissão de Ética no Uso Animal  
120 (CEUA) da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina (Palotina, Paraná,  
121 Brasil) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio;  
122 Autorização n. 60832-2).

123

124

#### 125 4.2.2. Coleta e criopreservação do sêmen

126

127 Os jaguarundis foram contidos com puçá e anestesiados via intramuscular  
128 com dexmedetomidina (0,005 mg/kg – Dexdomitor<sup>®</sup>, Zoetis, Campinas, Brasil)  
129 associada à cetamina (10 mg/kg – Quetamina<sup>®</sup>, Vetnil, São José dos Campos,  
130 Brasil). As onças-pardas foram anestesiadas por meio de dardo anestésico e  
131 zarabatana, com a mesma associação de anestésicos e dose descrita para  
132 jaguarundi. O sêmen foi obtido por eletroejaculação, de acordo com protocolo  
133 proposto por Howard [16], que consistiu em 80 estímulos elétricos (2 a 5 V)  
134 aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos).

135 A fim de tornar a técnica mais acessível às condições de campo, após a  
136 coleta do sêmen, as amostras foram divididas em duas alíquotas: a primeira foi  
137 utilizada imediatamente após a coleta, e a segunda foi diluída (1:1) em  
138 BotuSêmen<sup>®</sup> GOLD (Botupharma, Botucatu, Brasil) e armazenada sob refrigeração  
139 por cinco horas.

140 As amostras de sêmen fresco e pós-descongelamento foram submetidas  
141 às análises de: volume seminal, utilizando micropipetas graduadas; motilidade  
142 subjetiva (%); vigor espermático subjetivo (com categorias variando de 0 =  
143 ausência de movimento até 5 = intenso movimento progressivo); Índice de  
144 Motilidade Espermática (IME, Howard et al. [17], por meio da fórmula  $IME =$   
145  $[Motilidade (\%) + (vigor \times 20)]/2$ ; concentração do sêmen em câmara de Neubauer  
146 com a adição de 5  $\mu$ L de sêmen a 200  $\mu$ L de solução formalina; e vitalidade  
147 espermática, por meio da coloração de eosina e nigrosina (1:1).

148 O sêmen foi criopreservado em dois extensores comerciais, BotuBOV<sup>®</sup> e  
149 BotuCRIO<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu, Brasil), que foram ajustados para a  
150 concentração de 4% de glicerol. As amostras foram diluídas para a concentração  
151 de  $20 \times 10^6$  spz/mL, envasadas em palhetas de 0,25 mL, refrigeradas por 4 horas,  
152 expostas ao vapor de nitrogênio líquido por 10 min e, por fim, armazenadas em  
153 nitrogênio líquido por no mínimo 30 dias antes da avaliação pós-descongelamento.

154

155

156

157

## 158 4.2.3. Ensaio cometa

159

160 O protocolo e soluções utilizados para o ensaio cometa foram adaptados  
161 dos estudos de Enciso et al. [18] e Ribas-Maynou et al. [19]. Resumidamente,  
162 amostras de sêmen fresco foram diluídas em solução de agarose *Low Melting point*  
163 a 1% em tampão fosfato-salino (*Phosphate-buffered saline* – PBS) 1x na  
164 concentração de  $0,1 \times 10^6$  células/100  $\mu\text{L}$ , aplicadas sobre lâminas de vidro  
165 contendo uma camada de agarose a 2% em tampão PBS 1x e adicionada lamínula  
166 sobre a suspensão. O sêmen criopreservado foi descongelado por imersão em  
167 água a 37°C, centrifugado a 300 G em temperatura ambiente por 10 minutos,  
168 descartado o sobrenadante e o sedimento ressuspenso em 1 mL de tampão PBS  
169 1x. Foram realizados três ciclos de centrifugação e, em seguida, as lâminas foram  
170 feitas como descrito para o sêmen fresco.

171 As lâminas cobertas com lamínula foram refrigeradas por 10 minutos na  
172 ausência de luz, até a total solidificação da agarose. Em seguida, a lamínula foi  
173 cuidadosamente retirada e colocada nova camada de agarose LM. Após outro  
174 período para solidificação da agarose, a lamínula foi retirada e as amostras  
175 submetidas a dois processos de lise em sequência, ambos com duração de 30  
176 minutos. No primeiro, as lâminas foram mantidas na posição horizontal, na  
177 ausência de luz, e foi gotejado sobre elas 1 mL da solução de lise 1 [0,4 mol/L Tris-  
178 HCl, 0,04 mol/L ditioneitol (DTT), 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS = *sodium*  
179 *lauryl sulfate*), 1% de Triton X-100, pH 7,5]. Em seguida, foi retirado o excesso da  
180 solução de lise por meio de ligeira inclinação das lâminas e repetido o processo  
181 com a solução de lise 2 (0,4 mol/L Tris-HCl, 2 mol/L NaCl, 1% SDS, 0,05 mol/L  
182 EDTA, pH 7,5). Por fim, foi lavado o excesso de sais utilizando tampão TBE (0,09  
183 mol/L Tris-ácido bórico, 0,002 mol/L EDTA), por 10 minutos.

184 Tanto para a versão neutra como para a alcalina as etapas de confecção  
185 das lâminas e lise foram as mesmas. Para a versão neutra, após a lavagem com  
186 TBE, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese com tampão TBE gelado  
187 a 4° C e iniciada a corrida a 1 V/cm e 12 mA, por 12,5 minutos. Posteriormente, as  
188 lâminas foram lavadas sequencialmente com solução de NaCl 0,9% por 2 min,  
189 tampão de neutralização (0,4 mol/L Tris-HCl, pH 7,5) por 5 min, tampão TBE por 2  
190 min, desidratadas em álcool absoluto por 2 min e secas em temperatura ambiente.  
191 Na versão alcalina, após a lavagem com TBE, as lâminas foram submetidas a uma

192 solução alcalina (NaOH 0,03 mol/L, NaCl 1 mol/L) por 2,5 min e, então, realizada a  
193 eletroforese em tampão 0,03 mol/L NaOH por 8 minutos, a 1 V/cm e 12 mA. Ao fim  
194 da eletroforese, as lâminas foram lavadas sequencialmente com tampão de  
195 neutralização (0,4 mol/L Tris-HCl, pH 7,5) por 5 min, tampão TBE por 2 min,  
196 desidratadas em álcool absoluto por 2 min e secas em temperatura ambiente.

197 No momento da análise, as lâminas foram coradas com SYBR Gold  
198 (concentração 1:9999 em água ultrapura, Invitrogen, Thermo Fisher, São Paulo,  
199 Brasil) e analisadas em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de  
200 análise de imagens (*Comet Assay IV, Perceptive Instruments*, Inglaterra). Foram  
201 analisados 150 nucleoides por animal, utilizando-se filtro azul (330 a 385 nm) e  
202 aumento de 400X. Como parâmetro para a mensuração de danos no DNA foi  
203 utilizado o percentual de DNA na cauda do cometa (*tail intensity*).

204

#### 205 4.2.4 Análise estatística

206

207 Os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de  
208 Kolmogorov Smirnov e homoscedasticidade pelo teste de Levene. Atendidos os  
209 pressupostos, os dados foram analisados pelo modelo fatorial ANOVA (*two way*) de  
210 medida repetida, seguida do teste *a posteriori* de Tukey.  $P < 0,05$  foi utilizado como  
211 nível de significância. As análises foram conduzidas no *software* R versão 3.6.3  
212 [20].

213

214

### 215 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

216

217 As coletas do sêmen resultaram em amostras com concentração média de  
218  $139,56 (\pm 19,96) \times 10^6$  spz/mL e  $26,72 (\pm 18,49) \times 10^6$  spz/mL, respectivamente,  
219 para *P. concolor* (n = 2) e *P. yagouaroundi* (n = 7). Os parâmetros seminais  
220 analisados em amostras de sêmen fresco indicaram que todos os animais  
221 apresentavam valores compatíveis com a fertilidade (Tabela 7). Dos sete  
222 examinados, três jaguarundis tinham a fertilidade comprovada pela existência de  
223 prole. No entanto, para as amostras criopreservadas com os diluentes BotuBOV® e  
224 BotuCRIO® foi observada queda de qualidade após o descongelamento, com  
225 elevada mortalidade de espermatozoides (Tabela 7).

226

227 **TABELA 7** – Parâmetros seminais (média  $\pm$  desvio padrão) de amostras frescas e pós-  
 228 descongelamento de *Puma concolor* (n=2) e *Puma yagouaroundi* (n=7).

Parâmetros	Sêmen fresco	BotuBOV <sup>®</sup>	BotuCRIO <sup>®</sup>	
<i>P. concolor</i>				
Vigor (1-5)	3,30 $\pm$ 0,27	2 $\pm$ 0,25	0,00	
Motilidade (%)	75,00 $\pm$ 5	30 $\pm$ 2,76	0,00	
IME	70,83 $\pm$ 1,44	35 $\pm$ 1,16	0,00	
Vitalidade (%)	79,60 $\pm$ 2,19	50 $\pm$ 5,29	35 $\pm$ 3,15	
Parâmetros	Sêmen fresco	BotuBOV <sup>®</sup>	BotuCRIO <sup>®</sup>	Sumário estatístico
<i>P. yagouaroundi</i>				
Vigor (1-5)	3,23 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	3,25 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	0,60 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	F <sub>(2,13)</sub> =82,11 p<0,001
Motilidade (%)	61,78 $\pm$ 9,56 <sup>a</sup>	10,00 $\pm$ 2,45 <sup>b</sup>	9,00 $\pm$ 11,94 <sup>b</sup>	F <sub>(2,13)</sub> =74,40 p<0,001
IME	63,69 $\pm$ 6,52 <sup>a</sup>	37,50 $\pm$ 3,13 <sup>b</sup>	10,50 $\pm$ 9,90 <sup>c</sup>	F <sub>(2,13)</sub> =79,65 p<0,001
Vitalidade (%)	71,83 $\pm$ 7,06 <sup>a</sup>	20,25 $\pm$ 2,50 <sup>b</sup>	26,40 $\pm$ 13,96 <sup>b</sup>	F <sub>(2,13)</sub> =48,11 p<0,001

229 BotuBOV<sup>®</sup> e BotuCRIO<sup>®</sup>, diluentes de criopreservação; IME - Índice de Motilidade  
 230 Espermática = [Motilidade (%) + (vigor X 20)]/2; letras diferentes indicam diferença  
 231 significativa entre os tipos de amostra. Não foram realizadas comparações estatísticas  
 232 para a espécie *P. concolor* devido ao número amostral (n=2).

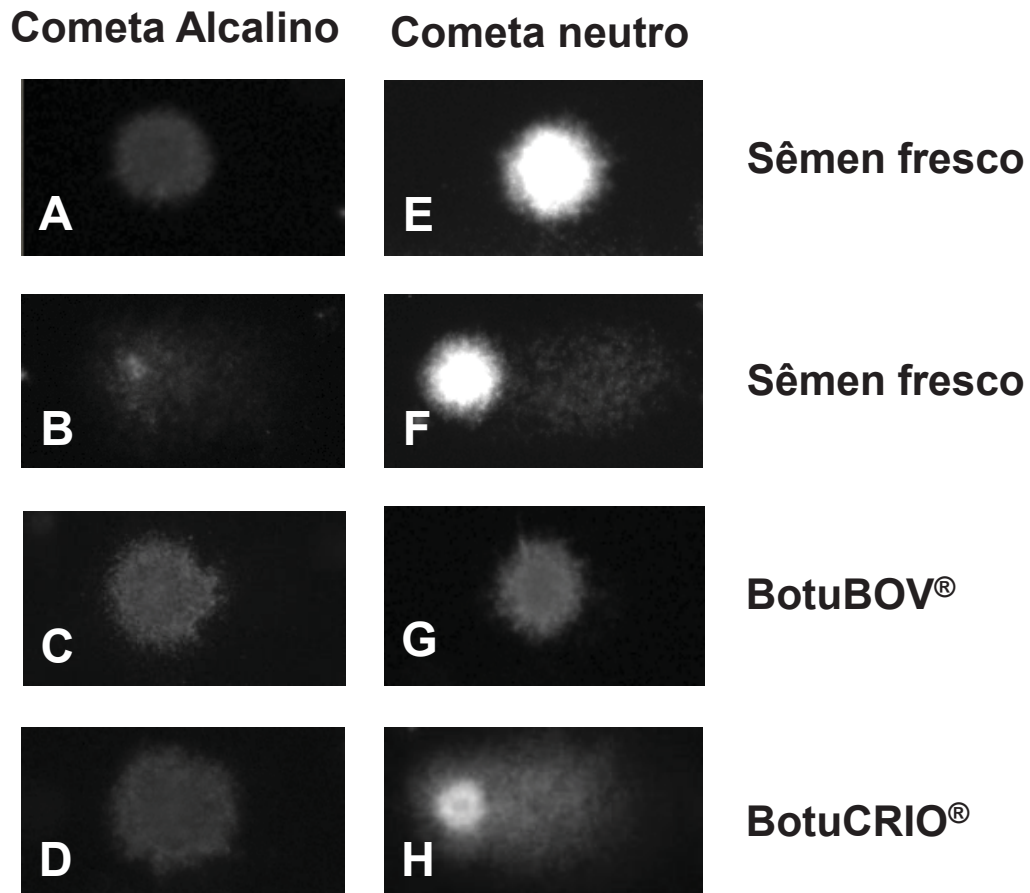
233

234 No homem, são observados níveis elevados de alterações no DNA nos  
 235 casos de subfertilidade e infertilidade, quando comparados a pacientes férteis  
 236 [21,18]. Em 2005, Sergierie et al. [22], investigando os níveis de fragmentação do  
 237 DNA pela técnica de TUNEL em amostras de sêmen de 112 homens, observaram  
 238 quantidades significativamente maiores nos participantes inférteis (40,9  $\pm$  14,3%)  
 239 do que nos férteis (13,1  $\pm$  7,3%).

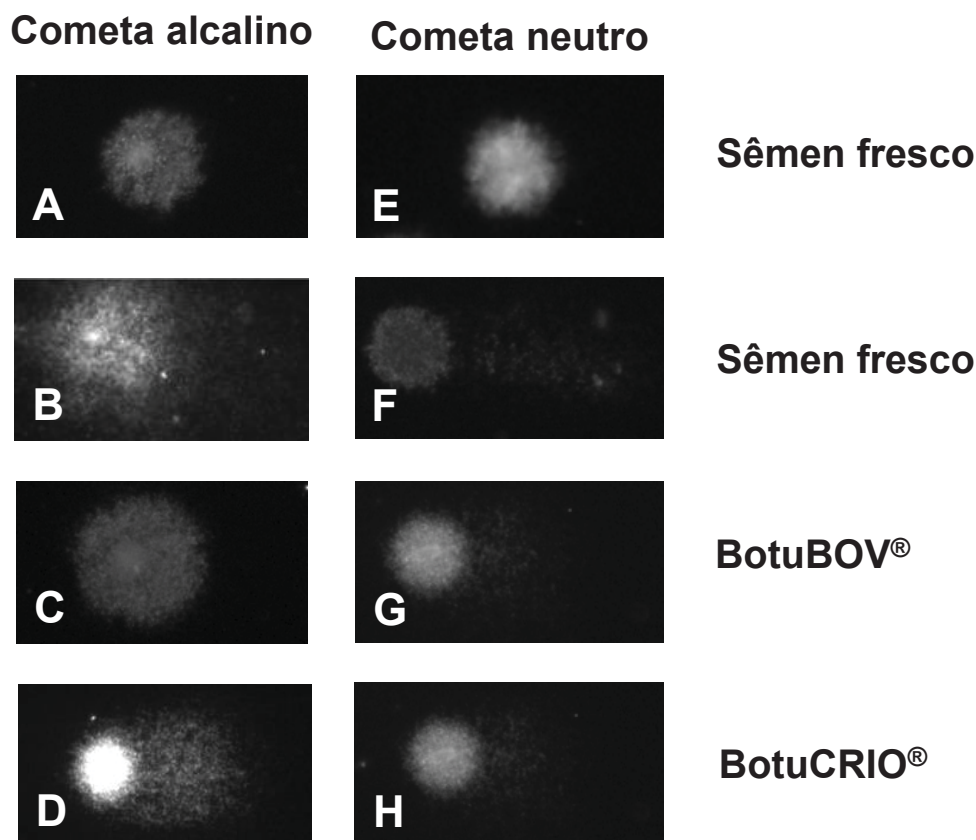
240

241 Da mesma forma, Ribas-Maynou et al. [2], utilizando o ensaio cometa  
 242 alcalino, detectaram níveis aumentados de lesões no DNA em sêmen de pacientes  
 243 com oligoastenoteratozoospermia (60,81  $\pm$  11,08%), astenoteratozoospermia  
 244 (60,52  $\pm$  11,05%) e astenoteratozoospermia e varicocele simultaneamente (78,98  $\pm$   
 245 8,49%), quando comparados ao de doadores férteis (21,10  $\pm$  5,91%). Esses  
 246 achados deixaram clara a necessidade de se estabelecer referências sobre a taxa  
 247 basal de alterações no DNA de machos férteis de cada espécie, a fim de identificar  
 os subférteis e inférteis e os possíveis fatores de risco.

248 O presente estudo apresenta os primeiros dados da frequência basal de  
249 danos no DNA de duas espécies de puma encontradas no Brasil, com parâmetros  
250 seminais convencionais normais (motilidade, vigor, concentração e vitalidade). Os  
251 dois protocolos do ensaio cometa, tanto a versão alcalina quando a neutra, foram  
252 eficazes para mensurar o nível de danos no DNA de espermatozoides das  
253 espécies *P. concolor* e *P. yagouarondi*. As Figuras 4 e 5 mostram nucleoides sem  
254 e com elevados níveis de danos em amostras de sêmen frescos (consideradas  
255 como referência de nível basal de danos no DNA) e criopreservadas. Os resultados  
256 da versão alcalina do ensaio cometa com sêmen fresco mostraram uma média de  
257 danos de  $24,43 \pm 15,80\%$  e  $23,68 \pm 9,37\%$ , respectivamente para espécies *P.*  
258 *concolor* e *P. yagouarondi* e de  $1,91 \pm 2,32\%$  e  $2,54 \pm 0,70\%$  na versão neutra  
259 (Tabela 8).  
260



**FIGURA 4** – Fotomicrografias de nucleoides obtidos de amostras de sêmen de *Puma concolor* e analisados pelo ensaio cometa (versões alcalina e neutra). Microscopia de fluorescência, coloração SYBR Gold<sup>®</sup>, filtro azul (330 a 385 nm), aumento de 400 X. A e E, células sem danos na molécula de DNA; B e F, células com danos; C, D, G e H diferentes níveis de danos no DNA amostras criopreservadas com os diluentes BotuBOV<sup>®</sup> e BotuCRIO<sup>®</sup>.



**FIGURA 5.** Fotomicrografias de nucleoides obtidos de amostras de sêmen de *Puma yagouaroundi* e analisados pelo ensaio cometa (versões alcalina e neutra). Microscopia de fluorescência, coloração SYBR Gold®, filtro azul (330 a 385 nm) e aumento de 400 x. A e E, células sem danos na molécula de DNA; B e F, células com danos; C, D, G e H diferentes níveis de danos no DNA amostras criopreservadas com os diluentes BotuBOV® e BotuCRIO®.

263

264

265 A realização simultânea do ensaio cometa nas versões neutra e alcalina  
 266 fornece um conjunto complementar de dados que podem contribuir para a  
 267 identificação dos mecanismos de ação dos fatores de risco para a infertilidade, uma  
 268 vez que permitem a detecção de diferentes tipos de danos no DNA [6, 7,8]. Os  
 269 resultados do presente estudo confirmaram a maior sensibilidade da versão  
 270 alcalina, pois esta permitiu a detecção de maior quantidade de danos em sêmen  
 fresco de *P. yagouaroundi* ( $23,68 \pm 9,37\%$  vs  $2,54 \pm 0,70\%$ ).

271

272

273

274

Apesar de não ser possível analisar estatisticamente os dados de *P. concolor* (n=2), a porcentagem de danos no DNA (*tail intensity*) para ambas as versões foram muito próximos da outra espécie, indicando que, com número amostral maior, poderia ser detectada diferença estatística. A ocorrência de

275 diferentes tipos de lesões no DNA pode ter implicações clínicas distintas para a  
 276 fertilidade masculina. De acordo com Ribas-Maynou et al. [19] as ssSDF estariam  
 277 associadas à fertilidade reduzida, enquanto as dsSDF a risco aumentado de aborto  
 278 espontâneo.

279

280 **TABELA 8.** Porcentagem de danos (*tail intensity*) no DNA (média  $\pm$  desvio padrão) em  
 281 amostras de sêmen frescas e criopreservadas de *Puma concolor* (n=2) e *Puma*  
 282 *yagouaroundi* (n=7).

Espécie	Tipo de amostra e versão do ensaio (% de DNA na cauda)					
	Fresca		BotuBOV®		BotuCRIO®	
	Alcalina	Neutra	Alcalina	Neutra	Alcalina	Neutra
<i>P. concolor</i>	24,43 $\pm 15,80$	1,91 $\pm 2,32$	8,70 $\pm 6,21$	18,81 $\pm 12,17$	9,02 $\pm 6,38$	9,31 $\pm 10,94$
<i>P. yagouaroundi</i>	23,68 <sup>*a</sup> $\pm 9,37$	2,54 <sup>*b</sup> $\pm 0,70$	11,55 <sup>b</sup> $\pm 6,48$	11,79 <sup>a</sup> $\pm 1,10$	10,96 <sup>b</sup> $\pm 6,70$	7,72 <sup>ab</sup> $\pm 4,95$
Sumário estatístico	$F_{(2,13)}=1405,00$ $p=0,004$					

283 \* diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as versões do teste para o mesmo tipo de amostra;  
 284 letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ente os tipos de amostra na  
 285 mesma versão do ensaio. Não foram realizadas comparações estatísticas para a espécie  
 286 *P. concolor* devido ao número amostral (n=2).

287

288 A partir destas duas versões do ensaio cometa, obtivemos dados sobre o  
 289 sêmen fresco que constituem o início do estabelecimento de uma referência de  
 290 níveis basais de fragmentação de DNA (ssDB e dsDB) para as duas espécies. Mais  
 291 estudos precisam ser feitos para aumentar a representatividade das amostras com  
 292 animais de diferentes regiões da área de ocorrência das espécies, bem como  
 293 indivíduos de vida livre. A partir deles podemos comparar outros indivíduos e  
 294 amostras criopreservadas, com o intuito de verificar se o processo elevou os níveis  
 295 de fragmentação.

296 Os resultados pós-descongelamento apresentaram diferença significativa em  
 297 relação ao sêmen fresco em ambas as versões, porém, o maior percentual de  
 298 danos foi observado no ensaio alcalino, tido como mais sensível. De forma  
 299 semelhante, em sêmen humano, foi observado aumento de cerca de 10% de danos  
 300 na versão alcalina e nenhum dano na versão neutra [19]. Contudo, ao se analisar a

301 vitalidade dos espermatozoides nas amostras descongeladas (Tabela 1) observa-  
302 se que a mortalidade foi elevada, restando apenas uma pequena fração de células  
303 vivas após a criopreservação. Dessa forma, como a maioria das células estava  
304 morta, os níveis de fragmentação do DNA detectados pelo ensaio cometa pode ser  
305 reflexo de um mecanismo de citotoxicidade e não do potencial genotóxico dos  
306 meios utilizados e da criopreservação.

307 Além dos efeitos da criopreservação sobre o DNA, testamos duas  
308 adaptações do protocolo, visando a tornar a aplicação do ensaio cometa menos  
309 dependente de equipamentos laboratoriais. Dentre os reagentes utilizados na  
310 solução de lise 1, o ditioneitol (DTT) é um composto altamente puro com  
311 capacidade redutora de tióis, sendo usado para quebra de ligações dissulfeto.  
312 Devido à sua composição, o DTT precisa ser mantido sob refrigeração e  
313 geralmente as soluções que o contêm são usadas em curto espaço de tempo.

314 Assim, foi testada a utilização das soluções de lise 1 e 2 congeladas por até  
315 duas semanas, não sendo observada qualquer alteração no ensaio cometa  
316 (alcalino e neutro), quando comparado às soluções frescas. Estes resultados  
317 demonstram que as soluções podem ser preparadas em laboratórios com  
318 antecedência de até duas semanas, sendo mantidas congeladas. Este ponto é  
319 importante para coletas em locais que não tenham equipamentos de precisão, bem  
320 como permite otimizar o tempo de processamento das amostras no local de coleta,  
321 uma vez que as soluções já podem estar prontas para uso. As demais soluções,  
322 além das de lise, já são comumente armazenadas em temperatura ambiente,  
323 facilitando a rotina de análise em campo.

324 Frente aos resultados encontrados, é possível vislumbrar o teste de outro  
325 agente redutor de tiol, o 2-mercaptoetanol, que é armazenado em temperatura  
326 ambiente, e isso poderia possibilitar armazenar todas as soluções de um protocolo  
327 para o ensaio cometa sem auxílio de refrigeração. A utilização de DTT ou 2-  
328 mercaptoetanol como substitutos já é rotina em ensaios como eletroforese em  
329 SDS-PAGE e inibição de enzimas, sendo que apresentam resultados muito  
330 semelhantes [23,24]. Neste estudo foram testadas até duas semanas de  
331 congelamento, mas seria interessante avaliar por maiores períodos de tempo se  
332 sua eficácia é mantida. Em possíveis testes com o 2-mercaptoetanol, também deve  
333 ser avaliado por quanto tempo as soluções mantêm sua eficácia.

334 A segunda adaptação avaliada neste estudo foi a utilização de um meio  
335 comercial de armazenamento e transporte de sêmen (BotuSêmen GOLD®) para  
336 manter amostras armazenadas por até cinco horas antes da realização do ensaio.  
337 Nessas condições, nossos resultados não evidenciaram diferença entre amostras  
338 frescas e refrigeradas, o que indica que o armazenamento por período curto de  
339 tempo é viável e não afeta os níveis de danos no DNA. Esta adaptação também é  
340 interessante para a rotina de coleta de sêmen em campo, pois o tempo para obter  
341 sêmen de animais sucessivos é considerável e a realização do ensaio cometa com  
342 poucas amostras não permite a utilização de testes estatísticos. Dessa forma,  
343 nossos resultados demonstram ser possível coletar amostras de sêmen de animais  
344 sucessivos, armazená-las por até cinco horas e realizar o ensaio com o conjunto de  
345 amostras. O tempo de cinco horas avaliado foi compatível com as características  
346 deste estudo, mas períodos maiores de tempo devem ser testados, a fim de  
347 entender a margem segura para armazenar tais amostras em cada espécie.

348 Finalizando, nosso estudo produziu dados sobre os níveis de danos no DNA  
349 de espermatozoides das espécies do gênero *Puma*. O conhecimento sobre outros  
350 gêneros de felídeos é encorajado, possibilitando conhecer os níveis basais de  
351 alterações genéticas e os impactos da criopreservação na família Felidae,  
352 contribuindo, assim, para a conservação de espécies de grande importância  
353 ecológica que vivem sob declínio populacional e ameaça de extinção.

354

#### 355 4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

356

357 O estudo resultou em protocolos eficazes do ensaio cometa para a avaliação  
358 de danos no DNA nas espécies *P. concolor* e *P. yagouaroundi*, e que podem ser  
359 utilizados com maior facilidade em estudos de campo. Além disso, o estudo  
360 demonstrou, de forma inédita os níveis basais de danos na molécula do DNA de  
361 animais férteis das duas espécies, indicando que estes são conservados no gênero  
362 *Puma*.

363

#### 364 4.5 AGRADECIMENTOS

365

366 Os autores agradecem o apoio financeiro da Universidade Federal do  
367 Paraná (UFPR), via financiamento do Programa de Apoio à Pós-Graduação  
368 (PROAP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
369 (CAPES) pela bolsa concedida ao autor. Agradecemos a colaboração com a  
370 Associação Mata Ciliar, que disponibilizou sua infraestrutura, colaboradores e  
371 reagentes para a realização deste estudo. Os autores agradecem a Dr. Renata  
372 Mazaro e Costa e Renata K. Carvalho da Universidade Federal de Goiás pela  
373 doação de um reagente utilizado e pelos apontamentos metodológicos iniciais.

374

#### 375 4.6. REFERÊNCIAS

376

- 377 [1] Gosálvez J, Holt WV, Johnston SD. Sperm DNA fragmentation and its role in  
378 wildlife conservation. Em: Holt W., Brown J., Comizzoli P. (eds) Reproductive  
379 Sciences in Animal Conservation. Advances in Experimental Medicine and Biology,  
380 vol 753. Springer, New York, NY, 2014. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-2_15)  
381 [2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-2_15)
- 382 [2] Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J.  
383 Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups,  
384 Human Reproduction 2012;27;3:652–8. <https://doi.org/10.1093/humrep/der461>
- 385 [3] Muratori M, Pellegrino G, Mangone G, Azzari C, Lotti F, Tarozzi N, et al. DNA  
386 Fragmentation in viable and non-viable spermatozoa discriminates fertile and  
387 subfertile subjects with similar accuracy. J Clin Med. 2020;4;9(5):1341.  
388 <https://doi.org/10.3390/jcm9051341>. PMID: 32375389
- 389 [4] Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the  
390 assessment of DNA damage in different models. Cell Biol Toxicol 2009;25:5–32.  
391 <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z>
- 392 [5] Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I. DNA damage in human and mouse  
393 spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. Adv Exp Med  
394 Biol. 1998;444:79-91. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0089-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0089-0_10)
- 395 [6] Pfuhler S, Wolf HU. Detection of DNA-cross-linking agents with the alkaline  
396 Comet assay. Environ. Mol. Mutagen. 1996;27:196-201.  
397 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1996\)27:3<196::AID-EM4>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)27:3<196::AID-EM4>3.0.CO;2-D)

- 398 [7] Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S. The ability of the  
399 Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins, *Mutagenesis*  
400 1998;13;1:89–94. <https://doi.org/10.1093/mutage/13.1.89>
- 401 [8] Cortés-Gutiérrez EI, López-Fernández C, Fernández JL, Dávila-Rodríguez MI,  
402 Johnston SD, Gosálvez J. Interpreting sperm DNA damage in a diverse range of  
403 mammalian sperm by means of the two-tailed comet assay. *Front Genet.*  
404 2014;27;5:404. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00404>
- 405 [9] Gawecka JE, Marh J, Ortega M, Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS. Mouse  
406 zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA  
407 replication and embryonic development. *PLoS ONE* 2013;8:e56385.  
408 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056385>
- 409 [10] Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek KJ. A interrupção do reparo do DNA  
410 aumenta as aberrações cromossômicas derivadas dos espermatozoides. *Proc.*  
411 *Natl. Acad. Sci.* 2007;104:17725–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705257104>
- 412 [11] Słowińska M, Karol H, Ciereszko A. Comet assay of fresh and cryopreserved  
413 bull spermatozoa. *Cryobiology* 2008; 56; 1: 100-2.  
414 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.10.176>
- 415 [12] Johnston SD, López-Fernández C, Gosálbez A, Holt WV, Gosálvez J.  
416 Directional mapping of DNA nicking in ejaculated and cauda epididymal  
417 spermatozoa of the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*: Monotremata).  
418 *Reprod Fertil Dev.* 2009;21;8:1008-14. <https://doi.org/10.1071/RD09079>
- 419 [13] Zee YP, López-Fernández C, Arroyo F, Johnston SD, Holt WV, Gosálvez J.  
420 Evidence that single-stranded DNA breaks are a normal feature of koala sperm  
421 chromatin, while double-stranded DNA breaks are indicative of DNA damage.  
422 *Reproduction* 2009;138;2:267-78. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0021>.
- 423 [14] Enciso M, Johnston SD, Gosálvez J. Differential resistance of mammalian  
424 sperm chromatin to oxidative stress as assessed by a two-tailed comet assay.  
425 *Reprod Fertil Dev.* 2011;23;5:633-7. <https://doi.org/10.1071/RD10269>
- 426 [15] Pereira AF, Borges P, Fontbonne A, Cardoso L, Gaivão I, Martins-Bessa A.  
427 The Comet assay for detection of DNA damage in canine sperm. *Reprod Domest*  
428 *Anim.* 2017;52;6:1149-52. <https://doi.org/10.1111/rda.13042>
- 429 [16] Howard JG. Semen collection and analysis in carnivores. In: Fowler ME. *Zoo*  
430 *and wild animal medicine current therapy.* 3th ed. Philadelphia: W.B. Saunders,  
431 1993 p. 390-9.

- 432 [17] Howard JG, Bush M, Wildt DE. Semen collection, analysis and  
433 cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow D (Ed.). Current therapy in  
434 theriogenology II. Philadelphia, 1986, p. 1047–1053.
- 435 [18] Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL, Gosálvez J. A two-tailed Comet  
436 assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online*  
437 2009;18;5:609-16. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60003-x](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60003-x)
- 438 [19] Ribas-Maynou J, Fernández-Encinas A, García-Peiró A, Prada E, Abad C,  
439 Amengual MJ, et al. Human semen cryopreservation: a sperm DNA fragmentation  
440 study with alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2014;2;1:83-7.  
441 <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00158.x>
- 442 [20] R Core Team. R versão 3.6.3. 2020. Disponível em: [https://cran.r-](https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.6.3/)  
443 [project.org/bin/windows/base/old/3.6.3/](https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.6.3/). Acesso em: 10 jul. 2019.
- 444 [21] Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, et al. Nuclear  
445 staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation  
446 extent and relationship with semen parameters. *Hum Reprod.* 2008;23;5:1035-43.  
447 <https://doi.org/10.1093/humrep/den058>.
- 448 [22] Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA  
449 fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod.* 2005;20;12:3446-51.  
450 <https://doi.org/10.1093/humrep/dei231>
- 451 [23] Yang Y, Wang HR, Zhou HM. Kinetics of inhibition of aminoacylase activity by  
452 dithiothreitol or 2-mercaptoethanol. *Int J Pept Protein Res.* 1996;48;6;:532-8.  
453 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1996.tb00872.x>
- 454 [24] Zhang RQ, Chen QX, Zheng WZ, Lin JY, Zhuang ZL, Zhou HM. Inhibition  
455 kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase activity by dithiothreitol  
456 or 2-mercaptoethanol. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32;8:865-72.  
457 [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(00\)00030-3](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(00)00030-3)
- 458

**CAPÍTULO 5**  
**MICROBIOMA SEMINAL E URETRAL DO JAGUARUNDI (*Puma yagouaroundi*):**  
**UMA NOVA ABORDAGEM REPRODUTIVA**

Formatado segundo as diretrizes do periódico *Journal of Applied Microbiology*

1 **Microbioma seminal e uretral do jaguarundi (*Puma yagouarundi*): uma nova**  
2 **abordagem reprodutiva**

3

4 Dieferson da Costa Estrela<sup>1</sup>, Wemerson de Castro Oliveira<sup>2</sup>, Hans Froder<sup>3</sup>, Bruna de  
5 Oliveira Mendes<sup>4</sup>, Marina Libonati de Azevedo<sup>5</sup>, Cristina Harumi Adania<sup>5</sup>, Nei  
6 Moreira<sup>6</sup>

7

8 <sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná,  
9 Curitiba, Brasil. Instituto Federal do Triângulo Mineiro – Campus Uberlândia,  
10 Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. E-mail: dieferonestrela@gmail.com

11 <sup>2</sup> Instituto Federal Sul-Rio-Grandense – Campus Lajeado, Lajeado, Brasil.

12 <sup>3</sup> Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, Brasil.

13 <sup>4</sup> Programa de Pós Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado.  
14 Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí.

15 <sup>5</sup> Associação Mata Ciliar, Jundiaí, Brasil.

16 <sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Biociências,  
17 Universidade Federal do Paraná, Palotina, Brasil.

18

19 Local de realização do estudo: Associação Mata Ciliar, Jundiaí, São Paulo, Brasil.

20

21 Autor de correspondência: Dieferson da Costa Estrela, Instituto Federal do Triângulo  
22 Mineiro – Campus Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. E-mail:  
23 dieferonestrela@gmail.com

24

25 Título abreviado: Microbioma seminal de jaguarundi

26

## 27 RESUMO

28

29 A presença de microrganismos comensais e patogênicos no sistema urogenital é  
30 conhecida para algumas espécies de mamíferos, podendo influenciar na fertilidade.  
31 Apesar disso, não foi encontrado nenhum estudo com microbioma urogenital de  
32 felídeos silvestres. O presente estudo objetivou caracterizar o microbioma bacteriano  
33 e fúngico da uretra e sêmen de jaguarundi (*Puma yagouaroundi*). Foram coletadas  
34 amostras de lavado uretral (LU, n=5) e sêmen (n=5) de jaguarundi (n=5) na  
35 Associação Mata Ciliar, Jundiaí, Brasil. As amostras foram enriquecidas em caldo  
36 *Brain Heart Infusion* por 12h a 37°C, congeladas e enviadas para análise  
37 metagenômica em um laboratório certificado (Neoprosecta, Florianópolis, Brasil).  
38 Foram construídas bibliotecas de *amplicons* a partir dos genes 16S rRNA (regiões  
39 V3 e V4) para bactérias e ITS para fungos e sequenciados em MiSeq (Illumina,  
40 EUA). Também foi realizado hemograma automatizado simultaneamente à coleta de  
41 sêmen e LU. Foram detectados 33 *taxa* bacterianos, representantes de 5 filos e 11  
42 famílias, e 8 fúngicos distribuídos em 2 filos e 6 famílias. Não foi observada  
43 leucocitose em nenhum indivíduo, indicando que os microrganismos observados  
44 são, provavelmente, comensais. Os filos Proteobacteria e Firmicutes foram os mais  
45 abundantes e os gêneros com maior número de *taxa* foram *Enterococcus* com 7 e  
46 *Shigella* com 4, ambos presentes apenas no sêmen, com exceção de um  
47 *Enterococcus sp.* presente no LU. O sêmen foi a amostra mais rica em bactérias,  
48 mas o LU foi mais rico em fungos. O LU apresentou seis espécies bacterianas e três  
49 fúngicas exclusivas, indicando a necessidade de se compreender de qual parte do  
50 sistema urogenital é proveniente cada espécie microbiana observada no sêmen. A  
51 presença de determinadas espécies em etapas cruciais da maturação do

52 espermatozoide pode ser prejudicial, sendo necessário compreender a distribuição  
53 diferencial de microrganismos no sistema urogenital e os impactos das interações  
54 resultantes nesses locais.

55

56 Palavras-chave: microbiota urogenital; disbiose; microbioma comensal; reprodução  
57 assistida, criopreservação de sêmen.

58

## 59 5.1 INTRODUÇÃO

60

61 Historicamente, acreditava-se que vários órgãos e sistemas do corpo  
62 humano e de outros animais eram estéreis, porém hoje se sabe que tais órgãos  
63 contêm uma população residente de bactérias, arqueas, protozoários, fungos e vírus  
64 conhecidos coletivamente como microbioma (Lundy et al. 2020). O mesmo  
65 desempenha funções na simbiose homeostática e também na disbiose em uma  
66 ampla gama de doenças (Lundy et al. 2020). As espécies não patogênicas são  
67 conhecidas como microbioma comensal, desempenhando papéis importantes como  
68 a defesa contra patógenos, uma vez que ocupa a superfície sem causar dano ao  
69 animal e compete ativamente com os patógenos, diminuindo as chances de  
70 infecções patológicas (McLaren & Callahan 2020).

71 Com o advento de ferramentas de sequenciamento de nova geração (NGS)  
72 e análises metagenômicas, estudos têm apresentado caracterizações  
73 microbiológicas do sistema geniturinário como do sêmen, vagina, útero, bexiga  
74 urinária, urina, líquido amniótico e mecônio (Weng et al. 2014, Verstraelen et al.  
75 2016, Buchta 2018, Ackerman e Chai 2019, He et al. 2020, Brown et al. 2021). Além  
76 disso, é importante atentar-se para o compartilhamento da microbiota entre os

77 parceiros, sendo necessário o estudo conjunto destes para inferir sobre a fertilidade  
78 individual e/ou do casal (Mandar et al. 2015). De modo complementar, levanta-se a  
79 hipótese de que ocorra a transferência de microrganismos dos genitores para a  
80 prole, podendo impactar diretamente na fertilidade dos descendentes (Altmäe et al.  
81 2019).

82 O conhecimento sobre o rico microbioma presente no sêmen, bem como das  
83 correlações entre *taxa* microbianos e indivíduos saudáveis ou inférteis, está  
84 começando a ser estabelecido. Weng et al. (2014) observaram correlações entre  
85 amostras de sêmen normais de homens e dominância dos gêneros *Lactobacillus* e  
86 *Gardnerella*, enquanto o gênero *Prevotella* estava em maior proporção em amostras  
87 de menor qualidade. Também foi confirmada a diferença na diversidade beta  
88 (diferença entre indivíduos) de microrganismos entre homens com astenospermia ou  
89 oligoastenospermia e controles saudáveis (Yang et al. 2020). A hiperviscosidade  
90 seminal e oligoastenoferatozoospermia humana foram parcialmente correlacionadas  
91 com a presença de espécies dos gêneros *Neisseria*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*  
92 (Monteiro et al. 2018).

93 Ao se considerar uma análise em nível de saúde do casal, a comparação  
94 entre comunidades microbianas seminais e vaginais humanas, revelou que o sêmen  
95 era mais diversificado, mas com concentrações totais menores que a vagina  
96 (Mandar et al. 2015). No estudo de Mandar et al. (2015), a espécie *Gardnerella*  
97 *vaginalis* foi predominante em metade das mulheres (n=3) cujos parceiros tinham  
98 leucospermia significativa, mas apenas em uma das 17 mulheres que tinham um  
99 parceiro sem leucocitospermia.

100 O conhecimento sobre a gama de microrganismos presente no sêmen leva a  
101 inevitáveis questionamentos sobre suas possíveis interferências em técnicas de

102 reprodução assistida (TRAs), como nas condições em que ocorre a fertilização *in*  
103 *vitro* (FIV) e se a mesma é afetada pela diversidade microbiana. O estudo de  
104 Štšepetova et al. (2020) confirmou que a FIV em humanos não ocorre em um  
105 ambiente estéril, bem como, os próprios meios de cultura usados no processo  
106 possuíam microrganismos. Neste mesmo estudo, os autores observaram que a  
107 dominância de microrganismos da classe Alphaproteobacteria estava negativamente  
108 correlacionada com a obtenção de embriões de maior qualidade (Štšepetova et al.  
109 2020).

110 Estes resultados e observações em humanos, apesar de serem iniciais,  
111 despertaram olhares para estudos em outras espécies animais. Até o momento,  
112 alguns estudos apresentaram microbiomas do sistema urogenital de cavalo, gato-  
113 doméstico, touro, percevejo, camundongo selvagem e suíno, evidenciando que suas  
114 comunidades são consideravelmente distintas das já observadas em humanos  
115 (Quiñones-Pérez et al. 2021, Kim et al. 2021, Moore et al. 2017, Bellinvia et al. 2020,  
116 Javurek et al. 2016, Gòdia et al. 2020). Em comparação com sêmen de equinos, as  
117 famílias mais encontradas em humanos como Lactobacillaceae, Staphylococcaceae  
118 e Streptococcaceae representaram apenas 0,00%, 0,17% e 0,22% de abundância  
119 nas amostras do estudo de Quiñones-Pérez et al. (2021), respectivamente.

120 Dessa forma, a literatura até o presente fornece suporte para a existência de  
121 influência do microbioma sobre a fertilidade animal, bem como uma constituição  
122 diferencial entre espécies de mamíferos, demandando estudos espécie-específicos.  
123 Em espécies ameaçadas de extinção, a fertilidade é um tema importante e sensível  
124 para sua conservação, de modo que o conhecimento da presença ou ausência de  
125 uma microbiota benéfica ou maléfica no sêmen pode contribuir para o sucesso das  
126 técnicas de reprodução assistida.

127 De modo similar, os estudos investigaram no sêmen principalmente a  
128 comunidade bacteriana, sendo menos conhecida a presença e diversidade de  
129 fungos, protozoários, arqueas e vírus. Os impactos destes outros microrganismos na  
130 manutenção do equilíbrio do microbioma, bem como sobre a saúde e doença já são  
131 conhecidos ou hipotetizados em outros órgãos como bexiga urinária, boca e  
132 intestino (Ackerman e Underhill 2017; Galloway-Peña e Kontoyiannis 2020; Santus  
133 et al. 2021).

134 A fim de suprir esta carência de conhecimento, é necessário que estudos  
135 complementares busquem conhecer a ecologia microbiana seminal, a fim de que  
136 sejam compreendidas as relações e influências dos microrganismos sobre a saúde  
137 reprodutiva e fertilidade. Diante das lacunas apresentadas, este estudo visa a  
138 apresentar o perfil de bactérias e fungos presentes no sêmen e uretra da espécie  
139 *Puma yagouaroundi*, considerada vulnerável no território brasileiro (Brasil 2018).

140

## 141 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 142 5.2.1 Animais e questões éticas

143

144 Os machos (n=5) eram da espécie *P. yagouaroundi*, provenientes da  
145 Associação Mata Ciliar, Jundiá, São Paulo, Brasil. Os indivíduos denominados de 1  
146 a 5 nesse estudo possuíam idade de 2, 10, 10, 10 e 8 anos, respectivamente. O  
147 método utilizado seguiu rigorosos preceitos éticos e foi aprovado, sob protocolo n.  
148 35/2020, pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do  
149 Paraná, Setor Palotina (Palotina, Paraná, Brasil) e pelo Instituto Chico Mendes de  
150 Conservação da Biodiversidade (ICMBio), por meio da autorização n. 60832-2.

151

## 152 5.2.2 Lavagem uretral e coleta de sêmen

153

154 Os animais foram contidos com puçá e anestesiados via intramuscular com  
155 dexmedetomidina (0,005 mg/kg – Dexdomitor®, Zoetis, Campinas, Brasil) associada  
156 à cetamina (10 mg/kg – Quetamina®, Vetnil, São José dos Campos, Brasil).  
157 Posteriormente, foi realizada antissepsia com iodo na região peniana, incluindo a  
158 bolsa escrotal e região perianal. Para minimizar as chances de contaminação foi  
159 criado um ambiente estéril com lamparina e utilizados materiais comerciais já  
160 esterilizados.

161 Em seguida, foi realizada a lavagem uretral por meio da introdução de uma  
162 sonda uretral do tipo *Tom cat*. A sonda foi lubrificada com vaselina autoclavada,  
163 inserida até a profundidade de 7 cm e injetado 1 mL de solução salina (0,85% p/v)  
164 com auxílio de uma seringa. Após dez segundos, a solução foi aspirada com  
165 seringa, sem que ocorresse a movimentação da sonda dentro da uretra e retirada.

166 O sêmen foi obtido por eletroejaculação de acordo com o protocolo proposto  
167 por Howard (1993), que consistiu em 80 estímulos elétricos que variaram de 2 a 5 V  
168 aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos). Foram utilizados tubos estéreis  
169 para a obtenção e armazenamento do sêmen até a inoculação em meio de cultivo.

170

## 171 5.2.3 Sequenciamento de alto desempenho (*Next-Generation Sequencing* - NGS)

172

173 As amostras de lavado uretral e sêmen foram inoculadas em 5 mL de caldo  
174 *Brain Heart Infusion* - BHI (Laborclin®, Pinhais, Brasil) e incubadas por 12 horas a  
175 37°C. Após verificação de crescimento microbiano, os meios foram congelados e  
176 armazenados até o momento de envio para o sequenciamento. As amostras foram

177 descongeladas e uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi congelada novamente e  
178 enviada, sob refrigeração, para realização do NGS, dos genes 16S rRNA - região  
179 V3-V4 e ITS (*Internal Transcribed Spacer*) em um laboratório certificado  
180 (Neoprospecta, Florianópolis, Brasil).

181 A preparação das bibliotecas para sequenciamento de *amplicons* de  
182 bactérias foi realizada utilizando os oligonucleotídeos 341F  
183 (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), específicos  
184 para a região V3/V4 do gene 16S rRNA (Wang e Qian 2009, Caporaso et al. 2012).  
185 Para a detecção de fungos foi realizada amplificação da região ITS rRNA utilizando  
186 os *primers* ITS1F 5'-GAACCGGCGGARGGATCA-3' e ITS2R 5'-  
187 GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3', conforme previamente descrito (Schmidt et al.  
188 2013, White et al. 1990).

189 Em ambos os grupos foi conduzido um protocolo de PCR de duas etapas,  
190 sendo que na primeira além das regiões alvo foi utilizado um adaptador parcial,  
191 baseado na estrutura TruSeq (Illumina, EUA). A presença deste adaptador permite  
192 uma segunda PCR que adiciona as sequências de indexação conforme descrito por  
193 Fuhrman (2012). A indexação é feita com índices duplos exclusivos para cada  
194 amostra na segunda PCR.

195 As reações de PCR foram realizadas utilizando Platinum Taq (Invitrogen,  
196 EUA) com as condições: 95°C por 5 min, 25 ciclos de 95°C por 45s, 55°C por 30s e  
197 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C por 2 min para PCR 1. Na PCR 2 as  
198 condições foram 95°C por 5 min, 15 ciclos de 95°C por 45s, 66°C por 30s e 72°C por  
199 45s e uma extensão final de 72°C por 2 min. Todas as reações de PCR foram  
200 realizadas em triplicata. As reações finais de PCR foram purificadas utilizando  
201 Neobeads® (*Beads* magnéticas a base de Sera-Mag™) e um volume equivalente de

202 cada amostra foi adicionado ao *pool* de sequenciamento. Em cada rodada de PCR,  
203 um controle negativo de reação foi incluído e também incluído um controle negativo  
204 de extração ao conjunto de amostras.

205 A concentração final de DNA do *pool* de bibliotecas foi estimada através de  
206 ensaios utilizando Picogreen dsDNA (Invitrogen, EUA), e em seguida foi diluída para  
207 quantificação por qPCR utilizando um *Kit* de Quantificação de Biblioteca (Collibri™,  
208 Invitrogen, EUA) já otimizado para bibliotecas Illumina. O *pool* de sequenciamento foi  
209 ajustado para uma concentração final de 17,5 pM para o *kit* V3 e sequenciado no  
210 sistema MiSeq (Illumina, EUA), empregando os *primers* de sequenciamento,  
211 fornecidos com o *kit* do fabricante (Illumina, EUA). As corridas *paired-end* foram  
212 realizadas utilizando *kit* de sequenciamento V3x600 (Illumina, EUA) com 10 mil  
213 *reads* de cobertura por amostra.

214 Os dados obtidos foram avaliados quanto à qualidade Phred (QP), usando o  
215 programa FastQC v.0.11.8 (Andrews 2010), e submetidos à triagem de *primers* e  
216 sequências com menor qualidade (Phred < 20). O *software* proprietário utilizado para  
217 tal finalidade foi construído em Python v.3.6, sendo este inspirado nas  
218 funcionalidades do projeto BioPython (Cock et al. 2009).

219 Para dados *paired-end*, antes da etapa de triagem, dois pares de arquivos  
220 (R1 e R2) foram unidos em só arquivo usando Pandaseq v.2.11 (Masella et al.  
221 2012). *Clusters* com abundância menor do que 2 são removidos das análises, pois  
222 tais estruturas normalmente são relacionadas a sequências quimeras (Smyth et al.  
223 2010). As identificações taxonômicas foram realizadas com Blastn v.2.6.0+ (Altschul  
224 et al. 1990), usando como referência um banco de dados proprietário.

225 Quanto à definição de uma espécie, dentre os 20 hits retornados para cada  
226 *cluster*, uma instrução em Python avaliou se um dos três quesitos seriam atendidos

227 pelos *hits*: 1) maior *bit-score*; 2) menor *evaluate*; e 3) taxonomias com maior  
228 representação. Os *hits* que atenderam um dos itens anteriores foram escolhidos  
229 como espécie representante, essas análises foram realizadas na plataforma  
230 computacional da Amazon, onde a estrutura de bioinformática da Neoprosecta está  
231 hospedada.

232

#### 233 5.2.4 Análises seminais

234

235 As amostras de sêmen foram submetidas às análises de: volume seminal  
236 utilizando micropipetas ajustáveis; motilidade subjetiva (%); vigor espermático  
237 subjetivo (0 - 5); Índice de Motilidade Espermática (IME, Howard et al. 1986) por  
238 meio da fórmula  $IME = [Motilidade (\%) + (vigor \times 20)]/2$ ; determinada a concentração  
239 do sêmen em câmara de Neubauer com a adição de 5  $\mu$ l de sêmen a 200  $\mu$ l de  
240 solução formalina; vitalidade espermática por meio da coloração de eosina e  
241 nigrosina (1:1); e morfologia utilizando coloração rosa bengala (1:1).

242

#### 243 5.2.5 Tratamento estatístico

244

245 Os dados foram analisados por meio de correlação de Spearman entre  
246 variáveis qualitativas ordinais e quantitativas do sêmen *versus* o número total de  
247 espécies de bactérias e fungos por animal, bem como de bactérias do sêmen. As  
248 análises foram conduzidas em *software* (Statistica versão 7.1 VinceStatSoftware)  
249 com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

250

251

## 252 5.3 RESULTADOS

253

254 Foram obtidas amostras de lavado uretral (LU) e sêmen de todos os  
255 animais avaliados. As análises seminais revelaram que os animais apresentaram  
256 motilidade espermática  $42,55 \pm 19 \%$  e vitalidade  $52,00 \pm 20 \%$ , sendo que dois  
257 foram considerados teratospérmicos nessa coleta (Tabela 9). No macho 1 ocorreu  
258 contaminação com urina em uma amostra, de modo que para esse indivíduo foi  
259 analisado o microbioma do sêmen, LU e sêmen com urina.

260 Os resultados do hemograma realizado simultaneamente à coleta de  
261 amostras urogenitais não indicaram leucocitose em nenhum dos animais. Dessa  
262 forma, não há evidência de que as espécies microbianas identificadas sejam fruto de  
263 infecções patogênicas sendo, provavelmente, comensais.

264 De modo geral, foram detectados 33 *taxa* bacterianos representantes de 5  
265 filos e 11 famílias (Tabela 10). Os 8 *taxa* fúngicos representam 2 filos e 6 famílias.  
266 Os estudos com abordagens metagenômicas do microbioma seminal encontrados  
267 até o presente não avaliaram a comunidade fúngica, sendo que a análise do  
268 presente estudo confirma a presença de uma considerável riqueza de espécies. Este  
269 é o primeiro estudo, do conhecimento dos autores, metagenômico sobre microbioma  
270 de sêmen e uretra na família Felidae, indicando uma diversidade de espécies que  
271 deve ser investigada nos demais felídeos e em indivíduos de vida livre.

272 O sêmen foi a amostra com maior riqueza de bactérias com 81,81% (n=27)  
273 dos *taxa* observados. Os dois gêneros com maior número de *taxa* foram  
274 *Enterococcus* com 7 e *Shigella* com 4 espécies, ambos presentes apenas no sêmen,  
275 com exceção de um *Enterococcus* sp. presente no LU. Contudo, apesar de  
276 *Enterococcus* apresentar maior número de *taxa* registrados, seis dos sete foram

277 detectados no sêmen de apenas um indivíduo. *Shigella* estava presente em 3 dos 5  
278 animais, sendo o gênero mais frequente com 3/4 de suas espécies presentes nos  
279 três machos.

280 O LU representou 33,33% (n=11) da riqueza total de bactérias, das quais  
281 seis espécies só foram observadas nesse tipo de amostra *Arthrobacter arilaitensis*,  
282 *Bacillus cereus*, *Corynebacterium simulans*, *Staphylococcus equorum*,  
283 *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus*. De forma semelhante,  
284 *Arcobacter cryaerophilus* foi identificada no LU de todos os animais, mas no sêmen  
285 em apenas um animal.

286 A riqueza de fungos foi maior no LU 87,50% (n=7) que no sêmen, sendo que  
287 três espécies (37,50%) só foram encontradas neste tipo de amostra, *Candida*  
288 *palmioleophila*, *Cyberlindnera jadinii* e *Saccharomyces cerevisiae*. Por outro lado,  
289 *Candida sake* só foi identificada no sêmen. As demais espécies estavam presentes  
290 em ambos os tipos de amostra, mas um padrão curioso foi observado, em nenhum  
291 animal foi detectada a presença da mesma espécie no sêmen e LU  
292 simultaneamente. *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie mais frequente, estando  
293 no LU de 3/5 dos animais.

294 De forma complementar, foi obtida uma amostra de sêmen contaminada  
295 com urina do Macho 1, a qual apresentou a bactéria *Enterobacter cloacae* que não  
296 foi detectada nas amostras de lavado uretral (LU) e sêmen do mesmo indivíduo. A  
297 presença exclusiva desta bactéria na amostra com urina indica que ela  
298 provavelmente é oriunda da bexiga urinária. As demais espécies bacterianas  
299 encontradas na mesma amostra também estavam presentes no sêmen e/ou no LU,  
300 não sendo possível determinar se elas também estavam presentes na urina ou são

301 provenientes do sêmen e/ou uretra. As espécies fúngicas observadas nesta amostra  
302 foram as mesmas do LU.

303 A relação entre a qualidade do sêmen e o número de espécies bacterianas  
304 observadas foi analisada por meio de um teste de correlação que indicou forte  
305 correlação negativa  $R=-0,76$  entre o número de espécies e o índice de motilidade  
306 espermática, um parâmetro que reflete a qualidade do movimento dos  
307 espermatozoides. Contudo, esta correlação não foi significativa.

308

#### 309 5.4 DISCUSSÃO

310

311 O grupo de microrganismos registrados na uretra e sêmen de jaguarundi  
312 provavelmente são comensais, uma vez que não houve leucocitose nos animais.  
313 Bactérias comensais também têm sido relatadas em avaliações seminais em outras  
314 espécies (Mandar et al. 2015, Bellinvia et al. 2020, Santos et al. 2020, Quiñones-  
315 Pérez et al. 2021, Kim et al. 2021). Não foi encontrado nenhum estudo sobre fungos  
316 do sêmen, não sendo possível realizar comparações.

317 Os filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes foram  
318 identificados no sêmen deste estudo e em outros mamíferos (Javurek et al. 2016,  
319 Mandar et al. 2017, Moore et al. 2017, Gòdia et al. 2020, Quiñones-Pérez et al.  
320 2021), indicando um possível padrão coevolutivo. Contudo, a ordem de abundância  
321 entre tais filos varia entre os estudos, de modo que Proteobacteria foi o mais  
322 abundante em camundongos, porcos e jaguarundis (Javurek et al. 2016, Gòdia et al.  
323 2020, presente estudo), mas em bovinos foi o menos representativo (Moore et al.  
324 2017).

325 Proteobacteria também foi o filo mais abundante na bexiga urinária de gatos-  
326 domésticos (Kim et al. 2021). Firmicutes foi o mais abundante em humanos e  
327 bovinos (Weng et al. 2014, Moore et al. 2017) e o segundo mais abundante em  
328 outros estudos (Gòdia et al. 2020, Quiñones-Pérez et al. 2021). Dessa forma, o  
329 conjunto de estudos com metagenômica de sêmen e bexiga urinária indica que  
330 Proteobacteria e Firmicutes são os filos mais frequentes no sistema urogenital de  
331 mamíferos.

332 Não foi encontrado nenhum estudo que avaliou o microbioma fúngico  
333 (“micobioma”) uretral, mas estudos com urina apresentaram composições  
334 semelhantes de *taxa*. Em uma análise de mulheres sintomáticas e assintomáticas de  
335 infecções urinárias, sem a utilização de abordagem metagenômica, também foram  
336 encontrados os gêneros *Candida*, *Saccharomyces* e *Cladosporium* (Nickel et al.  
337 2020). Ackerman & Underhill (2017) caracterizaram o microbioma urinário de  
338 mulheres assintomáticas e observaram 16 classes fúngicas com grande variação  
339 individual, assim como observado no presente estudo.

340 As três classes observadas na uretra de jaguarundi também foram  
341 encontradas na urina humana, sendo que Dothideomycetes e Saccharomycetes  
342 foram as mais abundantes e Tremellomycetes pouco abundante (Ackerman &  
343 Underhill 2017). A presença dos mesmos gêneros e classes na urina humana e  
344 uretra felídea indica que as espécies devem ser compartilhadas entre bexiga urinária  
345 e uretra, podendo existir exceções. A grande diluição dos microrganismos na urina  
346 pode dificultar a detecção de espécies com pequenas populações. Na uretra o  
347 volume utilizado para lavado pode ser pequeno, sendo importante considerar um  
348 volume que possibilite uma amostragem desejável da uretra e, simultaneamente,  
349 forneça concentrações detectáveis de populações menos abundantes.

350 Somados os dados de bactérias e fungos fica evidente a presença de uma  
351 comunidade microbiana exclusiva da uretra em jaguarundi, que pode ter relação com  
352 o microbioma urinário, um achado interessante. Os estudos com microbioma de  
353 sêmen em outras espécies encontrados na literatura não analisaram a uretra  
354 isoladamente, não sendo possível compreender se as espécies uretrais foram  
355 consideradas como seminais (Weng et al. 2014, Mandar et al. 2015, Javurek et al.  
356 2016, Moore et al. 2017, Gòdia et al. 2020, Quiñones-Pérez et al. 2021). No  
357 presente estudo, apesar da uretra ter sido lavada, o delineamento utilizado não  
358 permite inferir se os *taxa* que foram encontrados tanto no sêmen quanto em LU  
359 estavam presentes nos órgãos produtores do sêmen ou representam contaminações  
360 ocorridas durante a passagem do sêmen pela uretra na ejaculação.

361 O local do sistema urogenital em que os microrganismos encontrados no  
362 sêmen residem é um tópico pouco explorado ainda, mas que deve ser crucial para  
363 compreender os efeitos do microbioma sobre a qualidade seminal e os mecanismos  
364 de ação associados. Em estudos distintos foi demonstrada a presença de  
365 microrganismos no testículo humano (Alfano et al. 2018, Molina et al. 2021),  
366 glândulas vesiculares de camundongos (Javurek et al. 2016) e uretra de humanos  
367 (Kermes et al., 2003) e jaguarundi neste estudo, todos sendo reunidos no sêmen  
368 que foi a única amostra analisada em grande parte dos estudos com microbioma  
369 reprodutivo masculino até então.

370 Entretanto, o contato do espermatozoide, em diferentes fases de maturação,  
371 com microrganismos e seus metabólitos em cada parte do sistema urogenital  
372 seguramente resulta em interferências diferentes. Ao se considerar possíveis  
373 anomalias causadas pelo microbioma, excluindo outras causas, hipoteticamente  
374 espera-se que alterações estruturais do espermatozoide tenham maior relação com

375 interações no testículo e epidídimo, enquanto limitações metabólicas ligadas à  
376 motilidade e capacitação possam estar relacionadas com um plasma seminal  
377 alterado e/ou carente de compostos necessários para tais processos. Até o  
378 presente, algumas correlações foram feitas entre alterações reprodutivas e a  
379 presença de alguns gêneros de bactérias no sêmen humano (Weng et al. 2014,  
380 Mandar et al. 2015, Monteiro et al. 2018), suportando algumas hipóteses, como as  
381 levantadas nesse estudo.

382 Contudo, a comprovação destas influências e elucidação dos mecanismos  
383 de ação demandam estudos que considerem cada microambiente em que ocorrem  
384 as interações entre microrganismos, espermatozoides e constituintes do plasma  
385 seminal (Molina et al. 2021). A análise apenas do sêmen, que é o resultado final de  
386 complexas interações, mostra-se insuficiente para compreender as possíveis  
387 influências microbianas sobre a fertilidade animal. Nesse sentido, é possível que  
388 comunidades microbianas seminais descritas anteriormente possuam espécies que  
389 são exclusivas da uretra, mas incorporaram-se ao sêmen durante a ejaculação.  
390 Estudos futuros poderão contribuir para separar a microbiota presente nos diferentes  
391 órgãos do sistema urogenital e compreender os possíveis efeitos da exposição do  
392 sêmen a microrganismos uretrais durante a ejaculação.

393 O número de espécies foi negativamente correlacionado com o IME,  
394 apesar de não ter sido significativa, o que pode ser devido ao pequeno número  
395 amostral deste estudo. Estudo com felídeos ameaçados de extinção costumam  
396 possuir pequeno número de animais, uma vez que existem poucos representantes  
397 em cativeiro. Contudo, este resultado demanda novas investigações para identificar  
398 se a maior diversidade de bactérias pode ter efeito negativo sobre a qualidade do  
399 sêmen em jaguarundis. Também é necessário que seja realizada análise

400 metagenômica sem enriquecimento em meios de cultura, a fim de se obter os  
401 padrões de dominância entre espécies, um dado que pode estar mais diretamente  
402 correlacionado à qualidade do sêmen, como observado em Weng et al. (2014).

403 Até o presente, o conjunto de estudos com análise metagenômica do sêmen  
404 em diferentes espécies sustentam a presença de uma rica microbiota comensal  
405 (Weng et al. 2014, Mandar et al. 2015, Javurek et al. 2016, Moore et al. 2017,  
406 Bellinvia et al. 2020, Gòdia et al. 2020, Quiñones-Pérez et al. 2021). Contudo, alguns  
407 estudos indicaram que a dominância de alguns gêneros esteve correlacionada a pior  
408 ou melhor qualidade de sêmen, indicando que apesar de serem comensais, alguns  
409 gêneros podem ter influência sobre a qualidade seminal (Weng et al. 2014, Yang et  
410 al. 2020, Monteiro et al. 2018).

411 A seguir, são apresentadas algumas correlações observadas entre  
412 microrganismos e patologias reprodutivas humanas, bem como a vantagem  
413 conhecida da simbiose intestinal. Na reprodução o conhecimento ainda é superficial  
414 e apresenta controvérsias, sendo que algumas podem ser fruto da análise exclusiva  
415 do sêmen, sem considerar o microbioma de cada órgão separadamente e seus  
416 impactos sobre os diferentes componentes do sêmen, como discutido anteriormente.  
417 A carência de estudos com fungos, vírus, arqueas e protozoários urogenitais  
418 também deve contribuir para as controvérsias observadas até então.

419 Menor diversidade alfa (dentro do indivíduo) de bactérias foi observada em  
420 amostras de homens com morfologia espermática anormal, enquanto a diversidade  
421 beta (entre indivíduos) aumentou em pacientes com contagem espermática anormal  
422 (Gachet et al. 2022). A dominância dos gêneros *Lactobacillus*, *Gardnerella* e  
423 *Staphylococcus* foi observada em amostras normais de sêmen humano (Weng et al.  
424 2014, Mandar et al. 2017, Baud 2019), enquanto *Prevotella* e *Haemophilus* foram

425 dominantes no sêmen de baixa qualidade, com morfologia, motilidade e  
426 concentrações anormais (Weng et al. 2014, Baud et al. 2019, Gachet et al. 2022). O  
427 sêmen de homens com prostatite crônica continha menos *Lactobacillus*, que  
428 contribuem para a saúde, e apresentava maior riqueza de espécies do que o de  
429 pacientes saudáveis (Mandar et al. 2017).

430 Em oposição aos poucos *taxa* que apresentaram correlação com patologias,  
431 a maioria das espécies do microbioma parecem ser comensais. Estes  
432 microrganismos proporcionam muitas vantagens aos hospedeiros como acesso a  
433 nutrientes que não conseguiriam sozinhos, produção de vitaminas, modula a  
434 permeabilidade do órgão, fornece barreira contra patógenos, auxilia no metabolismo,  
435 contribui para melhoria da resposta imune, dentre outros (Xu & Gordon 2003,  
436 Bäckhed et al. 2005, Wu et al. 2010).

437 Entre tais vantagens, análises de coevolução sugerem que a principal seria  
438 a resistência contra patógenos (McLaren & Callahan 2020). As diversas superfícies  
439 corporais expõem tecidos ricos em nutrientes ao contato com microrganismos que  
440 podem colonizá-las de forma neutra (comensais), causar infecções enquanto se  
441 alimentam destes tecidos (parasitas), ou proporcionar benefícios diretos aos  
442 hospedeiros simbiotes (McLaren & Callahan 2020).

443 A evolução do microbioma comensal parece ter a resistência contra  
444 patógenos como a principal função selecionada (McLaren & Callahan 2020). A  
445 competição entre microrganismos comensais e patogênicos pelo espaço levou a  
446 seleção de uma diversa microbiota comensal que reveste os tecidos expostos e  
447 impede o contato dos patógenos com eles, sendo ao mesmo tempo neutra para o  
448 hospedeiro (McLaren & Callahan 2020). Tal competição envolve barreiras físicas e  
449 requintados mecanismos bioquímicos em uma verdadeira “guerra microbiana”, na

450 qual os patógenos são minoria e os comensais costumam proporcionar uma defesa  
451 natural contra ações patogênicas sobre os hospedeiros (McLaren & Callahan 2020).

452 Neste cenário, como a maior parte dos micróbios é imunologicamente neutra  
453 para os hospedeiros não parece haver uma forte pressão para selecionar espécies  
454 específicas, isso pode explicar porque a diversidade observada entre espécies e  
455 indivíduos proporciona resistências parecidas, desde que as espécies presentes  
456 possuam papéis ecológicos semelhantes (McLaren & Callahan 2020). Por outro  
457 lado, como a diversidade de microrganismos é grande entre indivíduos, é provável  
458 que algumas espécies proporcionem defesas contra patógenos, mas  
459 simultaneamente, possam impactar positiva ou negativamente na qualidade do  
460 sêmen, como as correlações relatadas por Weng et al. (2014), Yang et al. (2020) e  
461 Monteiro et al. (2018) sugeriram. Os mecanismos subjacentes a tais efeitos sobre a  
462 qualidade seminal ainda não são conhecidos, mas abordagens metagenômicas,  
463 metaproteômicas e metabolômicas podem contribuir para tal compreensão.

464 O presente estudo evidenciou uma diferença entre as comunidades  
465 presentes no sêmen e na uretra, dado que aponta a necessidade de uma melhor  
466 compreensão da localização do microbioma no hospedeiro, uma vez que o contato  
467 dos espermatozoides em diferentes estágios de sua maturação com diferentes  
468 microrganismos pode estar diretamente ligado aos efeitos sobre a qualidade do  
469 sêmen relatados. O sêmen é uma mistura complexa composta por produtos de  
470 diferentes órgãos e glândulas do animal e não se sabe ainda em quais desses estão  
471 presentes os microrganismos identificados na mistura final.

472 A presença de microrganismos em estágios cruciais da produção de  
473 espermatozoides pode impactar no sucesso de tal processo. Por outro lado, os  
474 dados aqui apresentados sustentam que o sêmen pode ser contaminado com

475 microrganismos exclusivos da uretra, no momento da ejaculação, e estes podem vir  
476 a interferir na qualidade do sêmen pós-ejaculação, bem como no trato reprodutor  
477 feminino. Por fim, o microbioma urogenital de jaguarundis e outros mamíferos  
478 precisa ser caracterizado e suas potenciais influências sobre a reprodução precisam  
479 ser compreendidas, a fim de ampliar o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva e  
480 auxiliar na mitigação de casos de infertilidade que possam estar associados aos  
481 microrganismos urogenitais.

482

## 483 5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

484

485 O microbioma fúngico e bacteriano presente na uretra e sêmen de  
486 jaguarundi foi caracterizado pela primeira vez e revelou uma grande riqueza de  
487 espécies. A análise inédita do microbioma fúngico (micobioma) e a riqueza  
488 observada em jaguarundis alerta para a importância de avaliar quais espécies estão  
489 presentes nos animais e suas influências sobre a homeostase urogenital. A  
490 presença de um microbioma exclusivo da uretra, aqui apresentada, evidencia a  
491 necessidade de se analisar as espécies que residem nos diferentes órgãos do  
492 sistema urogenital, bem como de que forma ocorre a colonização dos mesmos, a fim  
493 de compreender as complexas interações que podem ocorrer em cada um deles e  
494 como afetam a qualidade seminal.

495

496

497

498

499

## 500 5.6 REFERÊNCIAS

501

502 Ackerman, A.L. e Chai, T.C. (2019) The bladder is not sterile: an update on the  
503 urinary microbiome. *Curr Bladder Dysfunct Rep.* 14(4):331-341. Doi:  
504 10.1007/s11884-019-00543-6

505 Ackerman, A.L. e Underhill, D.M. (2017) The mycobiome of the human urinary tract:  
506 potential roles for fungi in urology. *Ann Transl Med.* 5(2):31. Doi:  
507 10.21037/atm.2016.12.69

508 Alfano, M., Ferrarese, R., Locatelli, I., Ventimiglia, E., Ippolito, S., Gallina, P.,  
509 Cesana, D., Canducci, F., Pagliardini, L., Viganò, P., Clementi, M., Nebuloni, M.,  
510 Montorsi, F. e Salonia, A. (2018) Testicular microbiome in azoospermic men-first  
511 evidence of the impact of an altered microenvironment. *Hum. Reprod.* 33: 1212-  
512 1217. Doi: 10.1093/humrep/dey116

513 Altmäe, S., Franasiak, J.M. e Mändar R. (2019) The seminal microbiome in health  
514 and disease. *Nat Rev Urol.* 16(12): 703-721. Doi: 10.1038/s41585-019-0250-y

515 Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. e Lipman, D.J. (1990) Basic local  
516 alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-410. Doi: 10.1016/S0022-  
517 2836(05)80360-2

518 Andrews S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.  
519 Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acesso  
520 em: 13 abr. 2022.

521 Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A. e Gordon, J.I. (2005) Host-  
522 bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307(5717): 1915-20. Doi:  
523 10.1126/science.1104816.

- 524 Baud, D., Pattaroni, C., Vulliamoz, N., Castella, V., Marsland, B.J. e Stojanov M.  
525 (2019) Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.*  
526 10:234. Doi: 10.3389/fmicb.2019.00234.
- 527 Bellinvia, S., Johnston, P.R., Mbedi, S. e Otti O. (2020) Mating changes the genital  
528 microbiome in both sexes of the common bedbug *Cimex lectularius* across  
529 populations. *Proc Biol Sci.* 287(1926): 20200302. Doi: 10.1098/rspb.2020.0302.
- 530 Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2018). Livro  
531 Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos. In  
532 Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção ed. Instituto Chico  
533 Mendes de Conservação da Biodiversidade. Brasília: ICMBio. 622p.
- 534 Brown, S.E., Robinson, C.K., Shardell, M.D., Holm, J.B., Ravel, J., Ghanem, K. G. e  
535 Brotman, R.M. (2021) Assessing the concordance between urogenital and vaginal  
536 microbiota: can urine specimens be used as a proxy for vaginal samples? *Front Cell*  
537 *Infect Microbiol.* 11:671413. Doi: 10.3389/fcimb.2021.671413.
- 538 Buchta, V. (2018) Vaginal microbiome. *Ceska Gynekol.* 83(5): 371-379.
- 539 Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N.,  
540 Owens, S.O., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert J.A., Smith, G. e  
541 Knight, R. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina  
542 HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6: 1621–1624. Doi: 10.1038/ismej.2012.8
- 543 Cock, P.J., Antao, T., Chang, J.T., Chapman, B.A., Cox, C.J., Dalke, A., Friedberg, I.,  
544 Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B. e Hoon, M. J. (2009) Biopython: freely  
545 available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics.  
546 *Bioinformatics* 25(11): 1422-3. Doi: 10.1093/bioinformatics/btp163
- 547 Fuhrman, J. (2012) Faculty opinions recommendation of global patterns 16S rRNA  
548 diversity at a depth of millions of sequences sample. Faculty Opinions – Post-

- 549 Publication Peer Review of the Biomedical Literature. Doi:  
550 10.3410/f.717949632.793454841
- 551 Gachet, C., Prat, M., Burucoa, C., Grivard, P. e Pichon, M. (2022) Spermatic  
552 Microbiome Characteristics in Infertile Patients: Impact on Sperm Count, Mobility,  
553 and Morphology. *Journal of Clinical Medicine* 11(6): 1505. Doi:  
554 10.3390/jcm11061505
- 555 Galloway-Peña, J.R. e Kontoyiannis, D.P. (2020) The gut mycobiome: The  
556 overlooked constituent of clinical outcomes and treatment complications in patients  
557 with cancer and other immunosuppressive conditions. *PLoS Pathog.* 16(4):  
558 e1008353. Doi: 10.1371/journal.ppat.1008353
- 559 Gòdia, M., Ramayo-Caldas, Y., Zingaretti, L.M., Darwich, L., López, S., Rodriguez-  
560 Gil, J.E. e Clop, À. (2020) A pilot RNA-seq study in 40 Pietrain ejaculates to  
561 characterize the porcine sperm microbiome. *Theriogenology*. Doi:  
562 10.1016/j.theriogenology.2020
- 563 Howard, J.G. (1993) Semen collection and analysis in carnivores. In Zoo and wild  
564 animal medicine current therapy ed. Fowler M.E. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders,  
565 p. 390-399.
- 566 Howard, J.G., Bush, M. e Wildt, D.E. (1986) Semen collection, analysis and  
567 cryopreservation in nondomestic mammals pp. 1047–1053. In: Morrow, D. (Ed.).  
568 Current therapy in theriogenology II. Philadelphia.
- 569 Javurek, A.B., Spollen, W.G., Ali, A.M., Johnson, S.A., Lubahn, D.B, Bivens, N.J.,  
570 Bromert, K.H., Eilersieck, M.R., Givan, S.A. e Rosenfeld, C.S. (2016) Discovery of a  
571 novel seminal fluid microbiome and influence of estrogen receptor Alpha genetic  
572 status. *Sci Rep.* 6: 23027. Doi: 10.1038/srep23027. Erratum in: *Sci Rep.* 6:25216,  
573 2016.

- 574 Kermes, K., Punab, M., Lõivukene, K. e Mändar, R. (2003) Anaerobic seminal fluid  
575 micro-flora in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome patients. *Anaerobe* 9:  
576 117-123. Doi: 10.1016/S1075-9964(03)00085-4
- 577 Kim, Y., Carrai, M., Leung, M.H.Y., Chin, J., Li, J., Lee, P.K.H., Beatty, J.A., Pfeiffer,  
578 D.U. e Barrs, V.R. (2021) Dysbiosis of the urinary bladder microbiome in cats with  
579 chronic kidney disease. *mSystems* 6(4): e0051021. Doi: 10.1128/mSystems.00510-  
580 21
- 581 Levin, B.R. e Antia, R. (2001) Why we don't get sick: the within-host population  
582 dynamics of bacterial infections. *Science* 292(5519): 1112-5. Doi:  
583 10.1126/science.1058879
- 584 Lundy, S.D., Vij, S.C., Rezk, A.H., Cohen, J.A., Bajic, P. e Ramasamy, R. (2020) The  
585 microbiome of the infertile male. *Curr Opin Urol.* 30(3): 355-362. Doi:  
586 10.1097/MOU.0000000000000742
- 587 Mändar, R., Punab, M., Borovkova, N., Lapp, E., Kiiker, R., Korrovits, P. e Truu, J.  
588 (2015) Complementary seminovaginal microbiome in couples. *Research in*  
589 *Microbiology* 166(5): 440–447. Doi: 10.1016/j.resmic.2015.03.009
- 590 Mändar, R., Punab, M., Korrovits, P., Türk, S., Ausmees, K., Lapp, E., Preem, J.K.,  
591 Oopkaup, K., Salumets, A. e Truu, J. (2017) Seminal microbiome in men with and  
592 without prostatitis. *Int J Urol.* 24(3): 211-216, 2017. Doi: 10.1111/iju.13286.
- 593 Masella, A.P., Bartram, A.K., Truszkowski, J.M., Brown, D.G. e Neufeld, J.D. (2012)  
594 PANDAseq: paired-end assembler for Illumina sequences. *BMC Bioinformatics*  
595 13:31. Doi: 10.1186/1471-2105-13-31
- 596 McLaren, M.R. e Callahan, B.J. (2020) Pathogen resistance may be the principal  
597 evolutionary advantage provided by the microbiome. *Phil. Trans. R. Soc.*  
598 B3752019059220190592. Doi: <http://doi.org/10.1098/rstb.2019.0592>

- 599 Molina, N.M., Plaza-Díaz, J., Vilchez-Vargas, R., Sola-Leyva, A., Vargas, E.,  
600 Mendoza-Tesarik, R., Galán-Lázaro, M., Guevara, N.M.L., Tesarik, J. e Altmäe, S.  
601 (2021) Assessing the testicular sperm microbiome: a low-biomass site with abundant  
602 contamination. *Reproductive BioMedicine Online*. Doi: 10.1016/j.rbmo.2021.06.021
- 603 Monteiro, C., Marques, P.I., Cavadas, B., Damião, I., Almeida, V., Barros, N., Barros,  
604 A., Carvalho, F., Gomes, S. e Seixas, S. (2018) Characterization of microbiota in  
605 male infertility cases uncovers differences in seminal hyperviscosity and  
606 oligoasthenoteratozoospermia possibly correlated with increased prevalence of  
607 infectious bacteria. *Am J Reprod Immunol*. 79(6): e12838. Doi: 10.1111/aji.12838.
- 608 Moore, S.G., Ericsson, A.C., Poock, S.E., Melendez, P., Lucy M.C. (2017) Hot topic:  
609 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant  
610 bovine uterus. *J Dairy Sci*. 100(6): 4953-4960. Doi: 10.3168/jds.2017-12592.
- 611 Nickel, J.C., Stephens, A., Landis, J.R., Mullins, C., Van Bokhoven, A., Anger, J.T.,  
612 Ackerman, A.L., Kim, J., Sutcliffe, S., Krol, J.E., Sen, B., Hammond, J. e Ehrlich, G.D.  
613 (2020) Multidisciplinary approach to the study of chronic pelvic pain (MAPP) research  
614 network. Urinary fungi associated with urinary symptom severity among women with  
615 interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS). *World J Urol*. 38(2): 433-446. Doi:  
616 10.1007/s00345-019-02764-0.
- 617 Qiuwen, H., Lai-Yu, K., Xiaoxia, X., Zhi, Z., Teng, M., Haiyan, X., Haixia, M.,  
618 Fangqing, Z. e Heping, Z. (2020) *Micróbios intestinais* 12: 1. Doi:  
619 10.1080/19490976.2020.1794266
- 620 Quiñones-Pérez, C., Hidalgo, M., Ortiz, I., Crespo, F., Vega-Pla, J.L. (2021)  
621 Characterization of the seminal bacterial microbiome of healthy, fertile stallions using  
622 next-generation sequencing. *Anim Reprod*. 18(2): e20200052. Doi: 10.1590/1984-  
623 3143-AR2020-0052

- 624 Santos, C.S., Silva, A.M., Maia, K.M., Rodrigues, G.S.O., Feijó, F.M.C., Alves, N.D.,  
625 Oliveira, M.F. e Silva A.R. (2020) Composition of semen and foreskin mucosa  
626 aerobic microbiota and its impact on sperm parameters of captive collared peccaries  
627 (*Pecari tajacu*). *Journal of Applied Microbiology*. Doi:10.1111/jam.14663
- 628 Santus, W., Devlin, J.R. e Behnsen, J. (2021) Crossing Kingdoms: How the  
629 mycobiota and fungal-bacterial interactions impact host health and disease. *Infect*  
630 *Immun.* 89(4): e00648-20. Doi: 10.1128/IAI.00648-20.
- 631 Schmidt, P.A., Bálint, M., Greshake, B., Bandow, C., Römbke, J. e Schmitt, I. (2013)  
632 Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry*:  
633 128–132. Doi: 10.1016/j.soilbio.2013.05.014
- 634 Štšepetova, J., Baranova, J. e Simm, J. (2020) The complex microbiome from native  
635 semen to embryo culture environment in human *in vitro* fertilization procedure.  
636 *Reprod Biol Endocrinol* 18: 3. Doi: 10.1186/s12958-019-0562-z
- 637 Verstraelen, H., Vilchez-Vargas, R., Desimpel, F., Jauregui, R., Vankeirsbilck, N.,  
638 Weyers, S., Verhelst, R., De Sutter, P., Pieper, D.H. e Van De Wiele, T. (2016)  
639 Characterization of the human uterine microbiome in non-pregnant women through  
640 deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ*. 4:e1602. Doi:  
641 10.7717/peerj.1602
- 642 Wang, Y. e Qian, P.Y. (2009) Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes  
643 and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies.  
644 *PLoS ONE* 4(10): e7401. Doi: 10.1371/journal.pone.0007401
- 645 Xu, J. e Gordon, J.I. (2003) Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(18):  
646 10452-9. Doi: 10.1073/pnas.1734063100.
- 647 Weng, S.L., Chiu, C.M., Lin, F.M., Huang, W.C., Liang, C. e Yang, T. (2014) Bacterial  
648 communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing

649 reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS ONE* 9(10):  
650 e110152. Doi: 10.1371/journal.pone.0110152

651 White, T.J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing  
652 of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*: 315–322. Doi:  
653 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1

654 Wu, G.D., Lewis, J.D., Hoffmann, C., Chen, Y.Y., Knight, R., Bittinger, K., Hwang, J.,  
655 Chen, J., Berkowsky, R., Nessel, L., Li, H. e Bushman, F.D. (2010) Sampling and  
656 pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut  
657 using 16S sequence tags. *BMC microbiology* 10: 206. Doi: 10.1186/1471-2180-10-  
658 206

659 Yang, H., Zhang, J., Xue, Z., Zhao, C., Lei, L., Wen, Y., Dong, Y., Yang, J. e Zhang,  
660 L. (2020) Potential pathogenic bacteria in seminal microbiota of patients with different  
661 types of dysspermatism. *Sci Rep.* 10(1): 6876. Doi: 10.1038/s41598-020-63787-x

662

663

664 **TABELA 9** – Parâmetros andrológicos e número de taxa bacterianos e fúngicos detectados  
665 em indivíduos de *Puma yagouaroundi* (n=5). Resultados expressos em média ± desvio  
666 padrão (DP).

Parâmetros	Machos					Média ± DP
	1	2	3	4	5	
Volume testicular (cm <sup>3</sup> )	1,89	2,78	2,60	3,72	2,78	2,75 ± 0,70
Volume (µL)	102	67	70	550	83	174,40 ± 210
Vigor (1-5)	2	1,67	2	3,5	2,67	2,37 ± 0,7
Motilidade (%)*	17,5	40	50	68,57	36,67	42,55 ± 19
IME (%)	28,75	36,67	45,00	69,29	45	44,94 ± 15

Vitalidade (%)	20	45	50	75	40	52 ± 20
Espermatozoides anormais (%)	73,17	84,62	46,15	50,00	55,74	61,94 ± 16,36
Defeitos maiores (%)	65,96	76,47	75,00	81,82	40,71	67,99 ± 16,28
Defeitos menores (%)	34,04	23,53	25,00	18,18	34,78	27,11 ± 7,14
Bactérias totais (n)	15	12	11	11	8	11,4 ± 2,51
Fungos totais (n)	3	3	2	5	2	3 ± 1,23
Bactérias no sêmen (n)	14	10	7	7	6	8,8 ± 3,28

667 \* A motilidade média entre diferentes alíquotas obtidas na coleta em cada indivíduo, quando  
668 foram obtidas mais de uma. n – número de espécies.

669 **Tabela 10** – Espécies detectadas em amostras de lavado uretral, sêmen, e sêmen contaminado com urina da espécie *Puma yagouaroundi*  
 670 (n=5).

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	Amostra	Animal
Actinobacteria	Actinomycetia	Actinomycetales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium simulans</i>	L	3
		Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Glutamibacter</i>	<i>Glutamibacter arilaitensis</i>	L	3
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	S, SU	1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Thauera</i>	<i>Thauera linaloolentis</i>	S, L	1,2
		Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	-	<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	L, S	1,2,3,4,5
				<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	S, SU	1
					<i>C. werkmanii</i>	S	1
				<i>Cronobacter</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>	S, SU	1
				<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	S, SU	4,5
				<i>Kluyvera</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	S, SU	1
					<i>K. cryocrescens</i>	S, SU	1
				<i>Raoultella</i>	<i>Raoultella planticola</i>	S	1
				<i>Shigella</i>	<i>Shigella boydii</i>	S, SU	1,5
					<i>S. dysenteriae</i>	S, SU	1,4,5
					<i>S. flexneri</i>	S, SU	1,4,5

				<i>S. sonnei</i>	S	1,4,5
		Morganellaceae	<i>Proteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	S	3
	Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	L, S 1,2,3,4,5
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus durans</i>	S 2
					<i>E. faecium</i>	S 2
					<i>E. hirae</i>	S 1
					<i>E. lactis</i>	S 1
					<i>E. sp.</i>	S, L 1,2,3,4,5
					<i>E. thailandicus</i>	S 1
					<i>E. villorum</i>	S 1
	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>	L	3
					<i>S. felis</i>	S 2,3,4
					<i>S. saprophyticus</i>	L 4
					<i>S. sciuri</i>	S 2,3
					<i>S. simulans</i>	S, L 3
					<i>S. xylosus</i>	L 4
		Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	L	3
Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	<i>Fusobacterium varium</i>	S, SU 1
Basidiomycota	Tremellomycetes	Trichosporonales	Trichosporonaceae	<i>Apiotrichum</i>	<i>Apiotrichum montevidense</i>	S, L 2,3

Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Debaryomycetaceae	<i>Candida</i>	<i>Candida palmioleophila</i>	L	3
					<i>C. sake</i>	S	4
				<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	S, L, SU	1,2
		Dipodascaceae		<i>Galactomyces</i>	<i>Galactomyces sp.</i>	S, L, SU	1,4,5
		Phaffomycetaceae		<i>Cyberlindnera</i>	<i>Cyberlindnera jadinii</i>	L	4
		Saccharomycetaceae		<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L	2,4,5
	Dothideomycetes	Cladosporiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i>	S, L	1,4
					<i>sphaerospermum</i>		

671 Legenda: L – Lavado uretral; S – Sêmen; SU – Sêmen contaminado com urina.

## EPÍLOGO

A riqueza de análises andrológicas e seminais realizadas neste estudo permitiram obter resultados complementares, fruto da associação de análises clássicas da reprodução assistida e novas abordagens que podem ampliar a compreensão sobre os parâmetros que afetam a qualidade seminal e a fertilidade dos machos de jaguarundi e onça-parda. Este estudo avaliou variáveis desde a anestesia e coleta de sêmen via cateterização uretral e eletroejaculação até análise do perfil das amostras descongeladas e alguns impactos da criopreservação.

Os resultados dos diferentes capítulos demonstraram que a técnica de cateterização uretral foi eficaz na obtenção de sêmen em jaguarundi, entretanto, a qualidade do sêmen não possibilitou a criopreservação. Quando comparada à eletroejaculação apresentou resultados inferiores. Apesar disso, como discutido nesta tese, é importante avaliar novos protocolos que utilizem doses diferentes de medetomidina ou dexmedetomidina, em prol de conseguir um método que seja mais eficiente e que seja mais seguro aos animais.

No processo de criopreservação de sêmen e no ensaio cometa foram avaliadas duas formas alternativas, com o intuito de tornar tais técnicas mais acessíveis para sua utilização em campo e/ou locais com infraestrutura reduzida. A caixa térmica avaliada (BotuBOX<sup>®</sup>, Botupharma, Brasil) mostrou-se tão eficiente quanto o refrigerador elétrico comum para refrigerar e armazenar amostras de sêmen a 4°C. No ensaio cometa, foi demonstrado o sêmen pode ser armazenado refrigerado por até cinco horas e que as soluções de lise podem ser preparadas com antecedência e mantidas congeladas por duas semanas até sua utilização. Isso elimina a necessidade de alguns equipamentos para o preparo das soluções junto à coleta de sêmen, além de poupar o tempo gasto para prepará-las *in loco*.

A manutenção das amostras de sêmen refrigeradas por algumas horas sem que haja prejuízo ao DNA possibilita coletar amostras de alguns animais em sequência e depois realizar o ensaio cometa de todos conjuntamente, otimizando os recursos e tempo. Apesar de não ter sido avaliado no estudo, a eficiência da caixa térmica (BotuBOX<sup>®</sup>) em manter as amostras refrigeradas por longos períodos, podendo ser agregada ao ensaio cometa, mantendo as amostras refrigeradas sem a necessidade de um refrigerador elétrico ao longo da coleta, até que seja realizado o ensaio. A partir disso, novas avaliações devem testar maiores períodos de tempo de

refrigeração do sêmen e congelamento das soluções de lise, de modo que se conheça os intervalos máximos tidos como seguros para realização do ensaio.

O ensaio cometa foi padronizado em jaguarundi e onça-parda tanto na forma neutra quanto na alcalina, que se mostrou mais sensível aos danos observados nas espécies. Por meio dele, foram conhecidos os níveis basais de danos nos animais amostrados, gerando uma referência para comparação com amostras criopreservadas ou de machos subférteis e inférteis. Em estudos futuros, é necessário aumentar o número de animais cativos e de vida livre avaliados pelo ensaio cometa, a fim de se obter uma referência mais representativa das espécies e avaliar machos subférteis e inférteis, a fim de se verificar se existe correlação com tais condições e danos ao DNA.

Em relação à criopreservação de sêmen, foram avaliadas quatro formulações diferentes, mas que possuíam a mesma concentração de glicerol (4%). Entre os extensores avaliados, o BotuBOV<sup>®</sup> foi mais eficiente que os demais em jaguarundi. Na onça-parda, os meios BotuDOG<sup>®</sup> e BotuBOV<sup>®</sup> foram igualmente eficientes e ambos, superiores aos demais. Dessa forma, estes dois meios comerciais se tornam alternativas disponíveis para a criopreservação de sêmen destes felídeos. Contudo, o declínio de motilidade e a elevada mortalidade observada demanda que novas avaliações sejam feitas, por exemplo, com maior concentração de glicerol, de modo que possam ser obtidos melhores resultados com estes extensores nestas espécies.

O microbioma fúngico e bacteriano presente na uretra e sêmen de jaguarundi foi caracterizado pela primeira vez e revelou uma grande riqueza de espécies. A análise do microbioma fúngico e a riqueza observada em jaguarundis alerta para a importância de avaliar quais espécies estão presentes nos animais e suas influências sobre a homeostase urogenital. A presença de um microbioma exclusivo da uretra foi apresentada, evidenciando a necessidade de se analisar as espécies que residem nas diferentes partes do sistema urogenital, a fim de compreender como as complexas interações que podem ocorrer em cada um deles afetam a qualidade seminal.

Por fim, este estudo avaliou parâmetros andrológicos e técnicas de criopreservação de sêmen sob diferentes perspectivas, permeando análises clássicas e introduzindo novidades analíticas, que se somam para a obtenção de conhecimento sobre a biologia reprodutiva de jaguarundi e onça-parda, podendo

contribuir para a melhoria de TRAs. Estes dados podem ser utilizados para subsidiar estratégias de conservação destas espécies, *in situ* e *ex situ*, e lançam luz sobre aspectos da biologia reprodutiva ainda pouco estudados e que podem fornecer novas possibilidades no manejo e conservação de jaguarundi e onça-parda.

## REFERÊNCIAS

- Ackerman, A.L. e Chai, T.C. (2019) The bladder is not sterile: an update on the urinary microbiome. *Curr Bladder Dysfunct Rep.* 14(4):331-341. Doi: 10.1007/s11884-019-00543-6
- Ackerman, A.L. e Underhill, D.M. (2017) The mycobiome of the human urinary tract: potential roles for fungi in urology. *Ann Transl Med.* 5(2):31. Doi: 10.21037/atm.2016.12.69
- Alfano, M., Ferrarese, R., Locatelli, I., Ventimiglia, E., Ippolito, S., Gallina, P., Cesana, D., Canducci, F., Pagliardini, L., Viganò, P., Clementi, M., Nebuloni, M., Montorsi, F. e Salonia, A. (2018) Testicular microbiome in azoospermic men—first evidence of the impact of an altered microenvironment. *Hum. Reprod.* 33: 1212-1217. Doi: 10.1093/humrep/dey116
- Almeida, LB, Queirolo, D, Beisiegel, BM, Oliveira, TG, 2013. Avaliação do estado de conservação do Gato-mourisco *Puma yagouaroundi* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira* 3(1): 107-121.
- Altmäe, S., Franasiak, J.M. e Mändar R. (2019) The seminal microbiome in health and disease. *Nat Rev Urol.* 16(12): 703-721. Doi: 10.1038/s41585-019-0250-y
- Altman JD, Gross KL, Lowry SR. Nutritional and Behavioral Effects of Gorge and Fast Feeding in Captive Lions. *J Appl Anim Welf Sci* 2005;8;1:47–57. [https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0801\\_4](https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0801_4)
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. e Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-410. Doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Amstislavsky SY, Kozhevnikova VV, Muzika VV, Kizilova EA. Reproductive biology and a genome resource bank of Felidae. *Russ. J. Dev. Biol.* 2017;48:81–92. <https://doi.org/10.1134/S1062360417020023>
- Andrews S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acesso em: 13 abr. 2022.
- Angelieri, CCS, Adams-Hosking, C, Ferraz, KMPMB, Souza, MP, McAlpine, CA, 2016. Using species distribution models to predict potential landscape restoration effects on puma conservation. *PLoS ONE* 11(1): e0145232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145232>

- Angle, MJ, Tom, R, Jarvi, K, McClure, RD, 1993. Effect of platelet activating factor (PAF) on human spermatozoa-oocyte interactions. *J Reprod Fertil* 98:541–548. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0980541>
- Araujo GR, Paula TAR, Deco-Souza T, Morato RG, Bergo LCF, Da-Silva LC, et al. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. *Anim Reprod Sci* 2018;195:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.019>
- Araujo, GR, Deco-Souza, T, Bergo, LCF, Silva, LC, Morato, RG, Jorge-Neto, PN, Silva, MCC, Macedo, GG, Paula, TAR, 2020<sup>b</sup>. Field friendly method for wild feline semen cryopreservation. *Journal of Threatened Taxa* 12(5): 15557–15564. <https://doi.org/10.11609/jott.5744.12.5.15557-15564>.
- Araujo, GR, Paula, TAR, Deco-Souza, T, Morato, RG, Bergo, LCF, Silva, LC, Jorge-Neto, PN, Sampaio, BFB, 2020<sup>a</sup>. Colheita farmacológica de sêmen de onças-pardas (*Puma concolor*: Mammalia: Carnivora: Felidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 72(02). <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11030>
- Azevedo, FC, Lemos, FG, Almeida, LB, Campos, CB, Beisiegel, BM, Paula, RC, Crawshaw-Junior, PG, Ferraz, KMPBM, Oliveira, TG, 2013. Avaliação do risco de extinção da onça-parda *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira* 3(1): 107-121.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A. e Gordon, J.I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307(5717): 1915-20. Doi: 10.1126/science.1104816.
- Bailey, V., 1905. Biological survey of Texas. *North American Fauna*, 25:1-222. <https://doi.org/10.3996/nafa.25.0001>
- Barone, MA, Roelke, ME, Howard, J, Brown, JL, Anderson, AE, Wildt, DE, 1994<sup>a</sup>. Reproductive characteristics of male Florida panthers: Comparative Studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American Zoos. *Journal of Mammalogy* 75(1), 150–162. <https://doi.org/10.2307/1382247>
- Barone, MA, Wildt, DE, Byers, AP, Roelke, ME, Glass, CM, Howard, JG, 1994<sup>b</sup>. Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). *Reproduction* 101(1): 103–108. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010103>
- Barrett, SP, Salzman, J, 2016. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development* 143(11): 1838-47. <https://doi.org/10.1242/dev.128074>

- Baud, D., Pattaroni, C., Vulliamoz, N., Castella, V., Marsland, B.J. e Stojanov M. (2019) Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.* 10:234. Doi: 10.3389/fmicb.2019.00234.
- Bellinvia, S., Johnston, P.R., Mbedi, S. e Otti O. (2020) Mating changes the genital microbiome in both sexes of the common bedbug *Cimex lectularius* across populations. *Proc Biol Sci.* 287(1926): 20200302. Doi: 10.1098/rspb.2020.0302.
- Benveniste, J, Henson, PM, Cochrane, CG, 1972. Leukocyte dependent histamine release from rabbit platelets: the role of Ig-E, basophils, and platelet-activating factor. *J Exp Med* 136:1356–1376. <https://doi.org/10.1084/jem.136.6.1356>.
- Bilder, RM, Sabb, FW, Cannon, TD, London, ED, Jentsch, JD, Parker, DS, Poldrack, RA, Evans, C, Freimer, NB, 2009. Phenomics: the systematic study of phenotypes on a genome-wide scale. *Neuroscience* 164(1): 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.027>
- Blakeley-Ruiz, JA, Kleiner, M, 2022. Considerations for constructing a protein sequence database for metaproteomics. *Comput Struct Biotechnol J.* 20:937-952. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.01.018>.
- Boks, MP, Derks, EM, Weisenberger, DJ, Strengman, E, Janson, E, Sommer, IE, Kahn, RS, Ophoff, RA, 2009. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One* 4(8):e6767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006767>
- Braquet, P, Touqui, L, Shen, TY, Vargaftig, BB, 1987. Perspectives in platelet activating factor research. *Pharmacol Rev*;39: 97–144.
- Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2018). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos. In Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção ed. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Brasília: ICMBio. 622p.
- Brown, JL, Comizzoli, P, 2018. Female Cat Reproduction. *Encyclopedia of Reproduction*: 692–701. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20638-9>
- Brown, JL, Terio, KA, Graham, LH, 1996. Fecal androgen metabolite analysis for noninvasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. *Zoo Biology* 15(4): 425–434. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2361\(1996\)15:4<425:aid-zoo7>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2361(1996)15:4<425:aid-zoo7>3.0.co;2-d)
- Brown, S.E., Robinson, C.K., Shardell, M.D., Holm, J.B., Ravel, J., Ghanem, K. G. e Brotman, R.M. (2021) Assessing the concordance between urogenital and vaginal

microbiota: can urine specimens be used as a proxy for vaginal samples? *Front Cell Infect Microbiol.* 11:671413. Doi: 10.3389/fcimb.2021.671413.

Buchta, V. (2018) Vaginal microbiome. *Ceska Gynekol.* 83(5): 371-379.

Butt, RH, Lee, MW, Pirshahid, SA, Backlund, PS, Wood, S, Coorsen, JR, 2006. An initial proteomic analysis of human preterm labor: placental membranes. *J Proteome Res.*(11):3161-72. <https://doi.org/10.1021/pr060282n>.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.O., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert J.A., Smith, G. e Knight, R. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6: 1621–1624. Doi: 10.1038/ismej.2012.8

Caragiulo, A, Dias-Freedman, I, Clark, JA, Rabinowitz, S, Amato, G, 2013. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography of Neotropic pumas (*Puma concolor*). *Mitochondrial DNA*, 25(4), 304–312. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.800486>

Caso, A, Oliveira, T, Carvajal, SV, 2015. *Herpailurus yagouaroundi*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T9948A50653167. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T9948A50653167> Acesso em: 16 fev. 2022.

Chatdarong, K, 2016. Retained fertilizing capability in cryopreserved feline spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 261–264. <https://doi.org/10.1111/rda.12855>

Chatdarong, K, Thuwanut, P, Morrell, JM, 2010. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology* Jun;73(9):1284-92. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.009>.

Chen, W, Peng, Y, Ma, X, Kong, S, Tan, S, Wei, Y, Qiao, J, 2020. Integrated multi-omics reveal epigenomic disturbance of assisted reproductive technologies in human offspring. *EBioMedicine* 61: 103076. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103076>

Cho, Y, Hu, L, Hou, H, Lee, H, Xu, J, Kwon, S, Oh, S, Kim, HM, Jho, S, Kim, S, Shin, Y, Kim, BC, Kim, H, Kim, C, Luo, S, Johnson, WE, Koepfli, KP, Schmidt-Küntzel, A, Turner, JA, Marker, L, 2013. The tiger genome and comparative analysis with lion and snow leopard genomes. *Nat Commun* 4: 2433. <https://doi.org/10.1038/ncomms3433>

Cock, P.J., Antao, T., Chang, J.T., Chapman, B.A., Cox, C.J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B. e Hoon, M. J. (2009) Biopython: freely

- available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* 25(11): 1422-3. Doi: 10.1093/bioinformatics/btp163
- Corona, G, Jannini, EA, Vignozzi, L, Rastrelli, G, Maggi, M, 2012. The hormonal control of ejaculation. *Nat Rev Urol.* (9):508-19. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.147>
- Cortés-Gutiérrez EI, López-Fernández C, Fernández JL, Dávila-Rodríguez MI, Johnston SD, Gosálvez J. Interpreting sperm DNA damage in a diverse range of mammalian sperm by means of the two-tailed comet assay. *Front Genet.* 2014;27;5:404. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00404>
- Cucho, H, Alarcón, V, Ordóñez, C, Ampuero, E, Meza, A, Soler, C, 2016. Puma (*Puma concolor*) epididymal sperm morphometry. *Asian J Androl.* 18(6):879-881. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187584>
- Culver, M, Johnson, WE, Pecon-Slattey, J, O'Brien, SJ, 2000. Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). *Journal of Heredity* 91(3):186–197. <https://doi.org/10.1093/jhered/91.3.186>
- Cunto M, Küster D, Bini C, Cartolano C, Pietra M, Zambelli D. Influence of different protocols of Urethral Catheterization after Pharmacological Induction (Ur.Ca.P.I.) on semen quality in the domestic cat. *Reprod Domest Anim* 2015;50;6: 999–1002. <https://doi.org/10.1111/rda.12626>
- Currier, MJP, 1983. *Felis concolor*. *Mammalian species* 200: 1-7.
- D’Alexandri, FL, Scolari, S, Ferreira, CR, 2010. Reproductive biology in the “omics” era: what can be done? *Anim. Reprod* 7(3): 177-186.
- Deco-Souza, T, Paula, TAR, Costa, DS, Araújo, GR, Garay, RM, Vasconcelos, GSC, Csermak-Junior, AC, Silva, LC, Barros, JBG, 2010. Coleta e avaliação de sêmen de pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos mantidos em cativeiro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 34(4): 252-259.
- Deco-Souza, T, Paula, TAR, Costa, DS, Costa, EP, Barros, JBG, Araujo, GR, Carreta-Jr, M, 2013. Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). *Animais Selvagens, Pesq. Vet. Bras.* 33 (4). <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400015>
- DeMatteo, KE, Rinas, MA, Zurano, JP, Selleski, N, Schneider, RG, Argüelles, CF, 2017. Using niche-modelling and species-specific cost analyses to determine a multispecies corridor in a fragmented landscape. *PLoS ONE* 12(8): e0183648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183648>

- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol* 2009;25:5–32. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z>
- Dickson, BG, Roemer, GW, McRae, BH, Rundall, JM, 2013. Models of Regional Habitat Quality and Connectivity for Pumas (*Puma concolor*) in the Southwestern United States. *PLoS ONE* 8(12): e81898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081898>
- Eaton, RL, Verlander, KA, 1977. Reproduction in the puma: biology, behavior and ontogeny. Pp. 45-70, In: The world's cats (R. L. Eaton, ed.), Vol. 3, No.3. Carnivore Research Inst., Burke Museum, Univ. Washington, Seattle, 144 pp.
- Eaton, RL, Verlander, KA, 1977. Reproduction in the puma: biology, behavior and ontogeny. Pp. 45-70, In: The world's cats (R. L. Eaton, ed.), Vol. 3, No.3. Carnivore Research Inst., Burke Museum, Univ. Washington, Seattle, 144 pp.
- Enciso M, Johnston SD, Gosálvez J. Differential resistance of mammalian sperm chromatin to oxidative stress as assessed by a two-tailed comet assay. *Reprod Fertil Dev.* 2011;23;5:633-7. <https://doi.org/10.1071/RD10269>
- Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL, Gosálvez J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2009;18;5:609-16. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60003-x](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60003-x)
- Erdmann, RH, Blank, MH, Ribeiro, RN, Oliveira, MJ, Cubas, ZS, Pradiee, J, Goularte, KL, Moreira, N, 2020. Cryopreservation of margay (*Leopardus wiedii*) spermatozoa: effects of different extenders and frozen protocols. *Theriogenology* 143: 27-34.
- Ernest, HB, Boyce, WM, Bleich, VC, May, B, Stiver, SJ, Torres, SG, 2003. Genetic structure of mountain lion (*Puma concolor*) populations in California. *Conservation Genetics* 4: 353–366. <https://doi.org/10.1023/A:1024069014911>
- Ernest, HB, Vickers, TW, Morrison, SA, Buchalski, MR, Boyce, WM, 2014. Fractured genetic connectivity threatens a southern California Puma (*Puma concolor*) population. *PLoS ONE* 9(10): e107985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107985>
- Ewer, RF, 1973. The carnivores. Cornell University Press, Ithaca, New York, 494 pp. Disponível em: <https://www.cornellpress.cornell.edu/book/9780801407451/the-carnivores/#bookTabs=1> Acesso em: 15 jan. 2022.
- Facemire, CF, Gross, TS, Guillette-Jr, LJ, 1995. Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environ Health Perspect.* 103(4):79-86. <https://doi.org/10.1289/ehp.103-1519283>.

Fazio, JM, Freeman, EW, Bauer, E, Rockwood, L, Brown, JL, Hope, K, Siegal-Willott, J, Parsons, ECM, 2020. Longitudinal fecal hormone monitoring of adrenocortical function in zoo housed fishing cats (*Prionailurus viverrinus*) during institutional transfers and breeding introductions. *PLoS One* 15(3): e0230239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230239>

Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, Zambelli D, Anastasi P, Hoogewijs M, Van-Soom A. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of two collection techniques. *Theriogenology* 2010;74;1:31–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.016>

Fuhrman, J. (2012) Faculty opinions recommendation of global patterns 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences sample. Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature. Doi: 10.3410/f.717949632.793454841

Fukuda, A, Roudebush, WE, Thatcher, SS, 1994. Platelet activating factor enhances the acrosome reaction, fertilization in vitro by subzonal sperm injection and resulting embryonic development in the rabbit. *Hum Reprod.* 9(1):94-9. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138330>

Furthner E, Cordonnier N, Le Dudal M, Fontbonne A, Freiche V. Is electroejaculation a safe procedure in cats? An endoscopic and histological prospective blinded study. *Theriogenology* 2018;119:69–75. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.013>

Gachet, C., Prat, M., Burucoa, C., Grivard, P. e Pichon, M. (2022) Spermatic Microbiome Characteristics in Infertile Patients: Impact on Sperm Count, Mobility, and Morphology. *Journal of Clinical Medicine* 11(6): 1505. Doi: 10.3390/jcm11061505

Galloway-Peña, J.R. e Kontoyiannis, D.P. (2020) The gut mycobiome: The overlooked constituent of clinical outcomes and treatment complications in patients with cancer and other immunosuppressive conditions. *PLoS Pathog.* 16(4): e1008353. Doi: 10.1371/journal.ppat.1008353

Gawecka JE, Marh J, Ortega M, Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS. Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. *PLoS ONE* 2013;8:e56385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056385>

Ghaemi, MS, DiGiulio, DB, Contrepois, K, Callahan, B, Ngo, TTM, Lee-McMullen, B, Lehallier, B, Robaczewska, A, McIlwain, D, Rosenberg-Hasson, Y, Wong, RJ, Quaintance, C, Culos, A, Stanley, N, Tanada, A, Tsai, A, Gaudilliere, D, Aghaeepour, N, 2019. Multiomics modeling of the immunome, transcriptome, microbiome, proteome and metabolome adaptations during human pregnancy. *Bioinformatics*. 35(1):95-103. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty537>.

Gòdia, M., Ramayo-Caldas, Y., Zingaretti, L.M., Darwich, L., López, S., Rodriguez-Gil, J.E. e Clop, À. (2020) A pilot RNA-seq study in 40 Pietrain ejaculates to characterize the porcine sperm microbiome. *Theriogenology*. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2020

Gosálvez J, Holt WV, Johnston SD. Sperm DNA fragmentation and its role in wildlife conservation. Em: Holt W., Brown J., Comizzoli P. (eds) Reproductive Sciences in Animal Conservation. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 753. Springer, New York, NY, 2014. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-2_15)

Granhölm M, McKusick BC, Westerholm FC, Aspegrén JC. Evaluation of the clinical efficacy and safety of intramuscular and intravenous doses of dexmedetomidine and medetomidine in dogs and their reversal with atipamezole. *Vet. Rec.* 2007;160;26:891-7. <https://doi.org/10.1136/vr.160.26.891>

Guggisberg, CAW, 1975. Wild cats of the world. Taplinger Publishing Company, New York, 328 pp.

Güngör, BH, Cinkara, SD, Acısu, TC, Arkalı, G, Koca, RH, Akarsu, SA, Can, C, Kaya, Türk, G, 2021. Effect of hydrated carbon 60 fullerene on frozen ram semen quality. *Biopreservation and biobanking, ahead of print*. <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0001>

Gustafson, KD, Gagne, RB, Vickers, TW, Riley, SPD, Wilmers, CC, Bleich, VC, Pierce, BM, Kenyon, M, Drazenovich, TL, Sikich, JA, Boyce, WM, Ernest, HB, 2019. Genetic source–sink dynamics among naturally structured and anthropogenically fragmented puma populations. *Conserv Genet* 20: 215–227. <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1125-0>

Haider, S, Pal, R, 2013. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. *Current genomics* 14(2): 91–110. <https://doi.org/10.2174/1389202911314020003>

Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Adv Exp Med Biol.* 1998;444:79-91. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0089-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0089-0_10)

- Hanahan, DJ, 1986. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem* 55:483–509.
- Hasin, Y, Seldin, M, Lusic, A, 2017. Multi-omics approaches to disease. *Genoma Biol* 18, 83. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>
- Hellstrom, WJG, Wang, R, Sikka, SC, 1991. Platelet-activating factor stimulates motion parameters of cryopreserved human sperm. *Fertil Steril* 56:768–770. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)54613-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)54613-5)
- Henault, MA, Killian, GJ, 1996. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 108(2):199-204. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1080199>.
- Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins, *Mutagenesis* 1998;13;1:89–94. <https://doi.org/10.1093/mutage/13.1.89>
- Hernández-Vargas, P, Muñoz, M, Domínguez, F, 2020. Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes. *Human Reproduction Update* 26(2): 264–301. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz042>
- Hibben, FC, 1937. A preliminary study of the mountain lion (*Felis oregonensis* sp.). *Univ. New Mexico Bull., Biol. Ser.* 5(3):1-59.
- Holbrook, JD, Caso, A, Deyoung, RW, Tewes, ME, 2013. Population genetics of jaguarundis in Mexico: Implications for future research and conservation. *Wildlife Society Bulletin* 37(2): 336–341. <https://doi.org/10.1002/wsb.246>
- Holbrook, JD, DeYoung, RW, Janecka, JE, Tewes, ME, Honeycutt, RL, Young, JH, 2012. Genetic diversity, population structure, and movements of mountain lions (*Puma concolor*) in Texas. *Journal of Mammalogy* 93(4): 989–1000. <https://doi.org/10.1644/11-mamm-a-326.2>
- Horgan, R, Clancy, O, Myers, J, Baker, P, 2008. An overview of proteomic and metabolomic technologies and their application to pregnancy research. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 116(2): 173–181. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01997.x>
- Hornocker, MG, 1969. Winter territoriality in mountain lions. *Journal of Wildlife Management* 33(3): 457-464.

- Hornocker, MG, 1970. An analysis of mountain lion predation upon mule deer and elk in the Idaho primitive area. *Wildl. Monogr.*, 21:1-39.
- Howard JG, Bush M, Wildt DE. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow D (Ed.). *Current therapy in theriogenology II*. Philadelphia, 1986, p. 1047–1053.
- Howard, JG, 1993. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In: *Zoo and Wildlife Animal Medicine: Current Therapy III*. Fowler, M. E. and Miller, R. E., editors. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co, 390–399.
- Howard, JG, Bush, M, Wildt, DE, 1986. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals pp. 1047–1053. In: Morrow, D. (Ed.). *Current therapy in theriogenology II*. Philadelphia.
- Hulley, JT, 1976. Maintenance and breeding of captive jaguarundis *Felis yagouaroundi* at Chester Zoo and Toronto. *International Zoo Yearbook* 16: 120-122.
- Hunter, JS, 1921. The control of the mountain lion in California. *Calif. Fish and Game* 7: 99-101.
- Iglesias GA, Bento HJ, Kuczarski AH, Costa TLC, Ribeiro J, Pimentel S, *et al.* Coleta de sêmen em *Leopardus guttulus* pelo método do cateterismo uretral. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2020;72;3:836-842.
- Javurek, A.B., Spollen, W.G., Ali, A.M., Johnson, S.A., Lubahn, D.B, Bivens, N.J., Bromert, K.H., Eilersieck, M.R., Givan, S.A. e Rosenfeld, C.S. (2016) Discovery of a novel seminal fluid microbiome and influence of estrogen receptor Alpha genetic status. *Sci Rep.* 6: 23027. Doi: 10.1038/srep23027. Erratum in: *Sci Rep.* 6:25216, 2016.
- Jayaraman, V, Ghosh, S, Sengupta, A, Srivastava, S, Sonawat, HM, Narayan, PK, 2014. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *J Assist Reprod Genet* 31: 1195–1204. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0282-4>
- Jelinkova K, Vitasek R, Novotny R, Bartoskova A. A comparison of quality parameters of fresh feline ejaculates collected by three different collection techniques. *Reprod. Domest. Anim.* 2018. <https://doi.org/10.1111/rda.13205>
- Jeong DH, Kim JH, Na KJ. Characterization and cryopreservation of Amur leopard cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) semen collected by urethral catheterization. *Theriogenology* 2018;119:91–5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.004>

- Jewgenow K, Zahmel J. Preservation of female genetic resources in feline species. *Theriogenology* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.040>
- Johnson, L, Petty, CS, Neves, WB, 1981. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 25: 217-226.
- Johnson, WE, Eizirik, E, Pecon-Slattery, J, Murphy, WJ, Antunes, A, Teeling, E, O'Brien, SJ, 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science* 311(5757): 73-7. <https://doi.org/10.1126/science.1122277>
- Johnson, WE, Onorato, DP, Roelke, ME, Land, ED, Cunningham, M, Belden, RC, McBride, R, Jansen, D, Lotz, M, Shindle, D, Howard, J, Wildt, DE, Penfold, LM, Hostetler, JA, Oli, MK, O'Brien, SJ, 2010. Genetic Restoration of the Florida Panther. *Science* 329(5999): 1641–1645. <https://doi.org/10.1126/science.1192891>
- Johnston SD, López-Fernández C, Gosálbez A, Holt WV, Gosálvez J. Directional mapping of DNA nicking in ejaculated and cauda epididymal spermatozoa of the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*: Monotremata). *Reprod Fertil Dev.* 2009;21;8:1008-14. <https://doi.org/10.1071/RD09079>
- Kenny, LC, Dunn, WB, Ellis, DI, Myers, J, Baker, PN, Kell, DB, 2005. Novel biomarkers for pre-eclampsia detected using metabolomics and machine learning. *Metabolomics* 1, 227. <https://doi.org/10.1007/s11306-005-0003-1>.
- Kermes, K., Punab, M., Lõivukene, K. e Mändar, R. (2003) Anaerobic seminal fluid micro-flora in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome patients. *Anaerobe* 9: 117-123. Doi: 10.1016/S1075-9964(03)00085-4
- Kheirkhah MS, Sisakht MM, Mohammadsadegh M, Moslemi HR. Sperm evaluation of Jungle Cat (*Felis chaus*) obtained by urethral catheterization (CT) after medetomidine administration. *Theriogenology* 2017;91:17–20. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.034>
- Kienzle B, Brugger N, Braun J, Otdorff CH. Semen collection in the tomcat – review of literature and clinical data. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2008;36;3:210-4. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1622680>
- Kim, Y., Carrai, M., Leung, M.H.Y., Chin, J., Li, J., Lee, P.K.H., Beatty, J.A., Pfeiffer, D.U. e Barrs, V.R. (2021) Dysbiosis of the urinary bladder microbiome in cats with chronic kidney disease. *mSystems* 6(4): e0051021. Doi: 10.1128/mSystems.00510-21

- Kitchener, AC, Breitenmoser-Würsten, CH, Eizirik, E, Gentry, A, Werdelin, L, Wilting, A, Yamaguchi, N, Abramov, AV, Tobe, S, 2017. A revised taxonomy of the Felidae. The final report of the Cat Classification Task Force of the IUCN/SSC Cat Specialist Group. *Cat News Special Issue* 11, 80 pp.
- Koboldt, DC, Steinberg, KM, Larson, DE, Wilson, RK, Mardis, ER, 2013. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 155(1):27-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.006>.
- Kochan J, Niżański W, Moreira N, Silva ZC, Nowak A, Prochowska S, et al. ARTs in wild felid conservation programs in Poland and in the world. *J. Vet. Res.* 2019;0;0. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0043>
- Kuusela E, Raekallio M, Anttila M, Falck I, Mölsä S, Vainio O. Clinical effects and pharmacokinetics of medetomidine and its enantiomers in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2000;23;1:15-20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2000.00245.x>
- Leite, FLG, Paula, TAR, Matta, SLP, Fonseca, CC, Neves, MTD, Barros, JBG, 2006. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Animal Reproduction Science* 91(3-4): 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.003>
- Leopold, AS, 1959. *Wildlife of Mexico*. University of California Press, Berkeley, 568 pp.
- Levin, B.R. e Antia, R. (2001) Why we don't get sick: the within-host population dynamics of bacterial infections. *Science* 292(5519): 1112-5. Doi: 10.1126/science.1058879
- Lindzey, FG, Van Sickle, WD, Ackerman, BB, Barnhurst, D, Hemker, TP, Laing, SP, 1994. Cougar population dynamics in southern Utah. *The Journal of Wildlife Management* 58(4): 619-624.
- Lópes-Gonzales, CA, Gonzáles-Romero, A, 1998. A synthesis of current literature and knowledge about the ecology of the puma (*Puma concolor* Linnaeus). *Acta Zoológica Mexicana* (75): 171-190. <https://doi.org/10.21829/azm.1998.75751713>
- Lordan, R, Tsoupras, A, Zabetakis, I, Demopoulos, CA, 2019. Forty years since the structural elucidation of platelet-activating factor (PAF): historical, current, and future research perspectives. *Molecules* 24(23):4414. <https://doi.org/10.3390/molecules24234414>

- Loxterman, JL, 2011. Fine scale population genetic structure of pumas in the Intermountain West. *Conservation Genetics* 12: 1049–1059. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0208-y>
- Lueders I, Ludwig C, Schroeder M, Mueller K, Zahmel J, Dehnhard M. "Successful nonsurgical artificial insemination and hormonal monitoring in an Asiatic golden cat (*Catopuma temmincki*). *J Zoo Wildl Med* 2014;45;2: 372-9. <https://doi.org/10.1638/2013-0269R.1>
- 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* 2012;78;3: 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.026>
- Lundy, S.D., Vij, S.C., Rezk, A.H., Cohen, J.A., Bajic, P. e Ramasamy, R. (2020) The microbiome of the infertile male. *Curr Opin Urol.* 30(3): 355-362. Doi: 10.1097/MOU.0000000000000742
- Madrigal-Valverde, M, 2019. Criopreservação de espermatozoides de felídeos domésticos e silvestres. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos) Universidade Federal da Bahia. 136 p.
- Maehr, DS, Land, ED, Roelke, ME, 1991. Mortality patterns of panthers in Southwest Florida. *Proc. Annu. Conl. Southeast. Fish and Wildl. Agencies* 45:201-207.
- Maehr, DS, Land, ED, Shindle, DB, Bass, OL, Hoctor, TS, 2002. Florida panther dispersal and conservation. *Biological Conservation* 106(2): 187–197. [https://doi.org/10.1016/s0006-3207\(01\)00245-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3207(01)00245-2)
- Maehr, DS, Roof, JC, Land, ED, McCown, JW, 1989. First reproduction of a panther (*Felis concolor coryi*) in southwestern Florida, U.S.A. *Mammalia* 53(1): 129-131.
- Mändar, R., Punab, M., Borovkova, N., Lapp, E., Kiiker, R., Korrovits, P. e Truu, J. (2015) Complementary seminovaginal microbiome in couples. *Research in Microbiology* 166(5): 440–447. Doi: 10.1016/j.resmic.2015.03.009
- Mändar, R., Punab, M., Korrovits, P., Türk, S., Ausmees, K., Lapp, E., Preem, J.K., Oopkaup, K., Salumets, A. e Truu, J. (2017) Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol.* 24(3): 211-216, 2017. Doi: 10.1111/iju.13286.
- Mansfield, KG, Land, ED, 2002. Cryptorchidism in Florida panthers: prevalence, features, and influence of genetic restoration. *J Wildl Dis.* 38(4):693-8. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.4.693>.

- Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek KJ. A interrupção do reparo do DNA aumenta as aberrações cromossômicas derivadas dos espermatozoides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104:17725–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705257104>
- Masella, A.P., Bartram, A.K., Truszkowski, J.M., Brown, D.G. e Neufeld, J.D. (2012) PANDAseq: paired-end assembler for Illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 13:31. Doi: 10.1186/1471-2105-13-31
- Maturana, LE, Alonso, L, Alarcón, P, Martín-Antoniano, IA, Pineda, S, Piorno, L, Calle, ML, Malats, N, 2019. Challenges in the integration of omics and non-omics data. *Genes*; 10(3):238. <https://doi.org/10.3390/genes10030238>
- McLaren, M.R. e Callahan, B.J. (2020) Pathogen resistance may be the principal evolutionary advantage provided by the microbiome. *Phil. Trans. R. Soc.* B3752019059220190592. Doi: <http://doi.org/10.1098/rstb.2019.0592>
- Molina, N.M., Plaza-Díaz, J., Vilchez-Vargas, R., Sola-Leyva, A., Vargas, E., Mendoza-Tesarik, R., Galán-Lázaro, M., Guevara, N.M.L., Tesarik, J. e Altmäe, S. (2021) Assessing the testicular sperm microbiome: a low-biomass site with abundant contamination. *Reproductive BioMedicine Online*. Doi: 10.1016/j.rbmo.2021.06.021
- Monteiro, C., Marques, P.I., Cavadas, B., Damião, I., Almeida, V., Barros, N., Barros, A., Carvalho, F., Gomes, S. e Seixas, S. (2018) Characterization of microbiota in male infertility cases uncovers differences in seminal hyperviscosity and oligoasthenoteratozoospermia possibly correlated with increased prevalence of infectious bacteria. *Am J Reprod Immunol.* 79(6): e12838. Doi: 10.1111/aji.12838.
- Moore, S.G., Ericsson, A.C., Poock, S.E., Melendez, P., Lucy M.C. (2017) Hot topic: 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant bovine uterus. *J Dairy Sci.* 100(6): 4953-4960. Doi: 10.3168/jds.2017-12592.
- Moreno, VR, Grisolia, AB, Campagnari, F, Milazzotto, M, Adania, CH, Garcia, JF, Souza, EB, 2006. Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor* and *Panthera onca* (Mammalia, Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29(2): 290-293.
- Müller, K, Eder, S, Jakop, U, Schiller, J, Müller, P, Bashawat, M, 2020. Assisted reproduction for felid species conservation-sperm competences at risk. *Reprod Domest Anim.* 55(2):55-60. <https://doi.org/10.1111/rda.13581>.
- Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, et al. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation

extent and relationship with semen parameters. *Hum Reprod.* 2008;23;5:1035-43. <https://doi.org/10.1093/humrep/den058>.

Muratori M, Pellegrino G, Mangone G, Azzari C, Lotti F, Tarozzi N, et al. DNA Fragmentation in viable and non-viable spermatozoa discriminates fertile and subfertile subjects with similar accuracy. *J Clin Med.* 2020;4;9(5):1341. <https://doi.org/10.3390/jcm9051341>. PMID: 32375389

Murphy, SM, Wilckens, DT, Augustine, BC, Peyton, MA, Harper, GC, 2019. Improving estimation of puma (*Puma concolor*) population density: clustered camera-trapping, telemetry data, and generalized spatial mark-resight models. *Sci Rep* 9: 4590. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40926-7>

Nickel, J.C., Stephens, A., Landis, J.R., Mullins, C., Van Bokhoven, A., Anger, J.T., Ackerman, A.L., Kim, J., Sutcliffe, S., Krol, J.E., Sen, B., Hammond, J. e Ehrlich, G.D. (2020) Multidisciplinary approach to the study of chronic pelvic pain (MAPP) research network. Urinary fungi associated with urinary symptom severity among women with interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS). *World J Urol.* 38(2): 433-446. Doi: 10.1007/s00345-019-02764-0.

Nielsen, C, Thompson, D, Kelly, M, Lopez-Gonzalez, CA, 2015. *Puma concolor* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species: e.T18868A97216466. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T18868A50663436.en>.

Nogueira, GP, Silva, JCR, 1997. Plasma cortisol levels in captive wild felines after chemical restraint. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30(11): 1359–1361. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1997001100016>

Norkaew, T, Brown, JL, Bansiddhi, P, Somgird, C, Thitaram, C, Punyapornwithaya, V, Punturee, K, Vongchan, P, Somboon, N, Khonmee, J, 2019. Influence of season, tourist activities and camp management on body condition, testicular and adrenal steroids, lipid profiles, and metabolic status in captive Asian elephant bulls in Thailand. *PLoS One* 14(3):e0210537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210537>.

Nowak, RM, 1992. Walker's mammals of the world. Fifth ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2:643-1629.

Ochoa, A, Onorato, DP, Fitak, RR, Roelke-Parker, ME, Culver, M, 2019. De novo assembly and annotation from parental and F1 Puma genomes of the Florida Panther genetic restoration program. *G3 Genes|Genomes|Genetics* g3.400629.2019. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400629>

- Oliveira, TG, 1994. Neotropical cats: ecology and conservation. Edufma, São Luis, Brazil, 220 pp.
- Oliveira, TG, 1998. *Herpailurus yagouaroundi*. Mammalian species 578, pp. 1-6.
- O'Neill, C, 1985. Partial characterization of the embryo-derived platelet activating factor in mice. *J Reprod Fertil* 75: 375–380. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0750375>
- O'Neill, C, 1997. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol Reprod*. 56(1):229-37. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.1.229>
- O'Neill, C, 2005. The role of paf in embryo physiology. *Hum Reprod Update* 11(3):215-28. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi003>
- Pacheco, SE, Houseman, EA, Christensen, BC, Marsit, CJ, Kelsey, KT, Sigman, M, Boekelheide, K, 2011. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020280>
- Patti, GJ, Yanes, O, Siuzdak, G, 2012. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13(4):263-9. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Penfold, LM, Criffield, M, Cunningham, MW, Jansen, D, Lotz, M, Shea, C, Onorato, D, 2022. Long-term evaluation of male Florida panther (*Puma concolor coryi*) reproductive parameters following genetic introgression, *Journal of Mammalogy*, gyac029. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyac029>
- Pereira AF, Borges P, Fontbonne A, Cardoso L, Gaivão I, Martins-Bessa A. The Comet assay for detection of DNA damage in canine sperm. *Reprod Domest Anim*. 2017;52;6:1149-52. <https://doi.org/10.1111/rda.13042>
- Pfuhler S, Wolf HU. Detection of DNA-cross-linking agents with the alkaline Comet assay. *Environ. Mol. Mutagen*. 1996;27:196-201. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1996\)27:3<196::AID-EM4>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)27:3<196::AID-EM4>3.0.CO;2-D)
- Pilch, B, Mann, M, 2006. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome biology* 7(5): R40. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-5-r40>
- Pisu MC, Ponzio P, Rovella C, Baravalle M, Veronesi MC. Usefulness of an injectable anaesthetic protocol for semen collection through urethral catheterization in domestic cats. *J Feline Med Surg* 2016;19;10:1087–90. <https://doi.org/10.1177/1098612x16679589>

- Pontius, JU, Mullikin, JC, Smith, DR, Lindblad-Toh, K, Gnerre, S, Clamp, M, Chang, J, Stephens, R, Neelam, B, Volfovsky, N, Tesler, G, 2007. NISC Comparative Sequencing Program, O'Brien S. J. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Research* 17(11), 1675–1689, 2007. <https://doi.org/10.1101/gr.6380007>
- Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wildl Med* 1991;22;1:87-95.
- Pope, C, Johnson, C, McRae, M, Keller, G, Dresser, B, 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Animal Reproduction Science* 53(1-4): 221–236. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(98\)00115-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(98)00115-8)
- Prochowska S, Niżański W, Ochota M, Partyka A. Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats—A retrospective study of 214 cases. *Theriogenology* 2015;84;9:1565–71. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.08.005>
- Prochowska S, Niżański W, Ochota M, Partyka A. Effect of dilution rate on feline urethral sperm motility, viability, and DNA integrity. *Theriogenology* 2014;82;9: 1273–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.012>
- Prochowska S, Niżański W, Partyka A, Kochan J, Młodawska W, Nowak A, et al. Influence of the type of semen and morphology of individual sperm cells on the results of ICSI in domestic cats. *Theriogenology* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.031>
- Prochowska S, Niżański W, Partyka A. Comparative analysis of in vitro characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa from cats (*Felis domesticus*). *Theriogenology* 2016;86;8:2063–72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.002>
- Prochowska S, Niżański W, Partyka A. Low levels of apoptotic-like changes in fresh and cryopreserved feline spermatozoa collected from the urethra and epididymis. *Theriogenology* 2017;88:43–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.045>
- Prochowska S, Niżański W. In vitro fertilizing potential of urethral and epididymal spermatozoa collected from domestic cats (*Felis catus*). *Pol J Vet Sci* 2017;20;1:19–24. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2017-0003>
- Pukazhenth, BS, Neubauer, K, Jewgenow, K, Howard, J, Wildt, DE, 2006. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild

- relatives. *Theriogenology* 66(1):112-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.020>.
- Putman, SB, Brown, JL, Saffoe, C, Franklin, AD, Pukazhenth, BS, 2019. Linkage between fecal androgen and glucocorticoid metabolites, spermaturia, body weight and onset of puberty in male African lions (*Panthera leo*). *PLoS One* 14(7):e0217986.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217986>
- Qiuwen, H., Lai-Yu, K., Xiaoxia, X., Zhi, Z., Teng, M., Haiyan, X., Haixia, M., Fangqing, Z. e Heping, Z. (2020) *Micróbios intestinais* 12: 1. Doi: 10.1080/19490976.2020.1794266
- Quiñones-Pérez, C., Hidalgo, M., Ortiz, I., Crespo, F., Vega-Pla, J.L. (2021) Characterization of the seminal bacterial microbiome of healthy, fertile stallions using next-generation sequencing. *Anim Reprod.* 18(2): e20200052. Doi: 10.1590/1984-3143-AR2020-0052
- R Core Team. R versão 3.6.3. 2020. Disponível em: <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.6.3/>. Acesso em: 10 jul. 2019.
- Rabb, GB, 1959. Reproductive and vocal behavior in captive pumas, *Journal of Mammalogy* 40(4): 616–617. <https://doi.org/10.2307/1376293>
- Reddy, PA, Kothandaraman, H, Arun, PVPS, Challagandla, A, Baghel, DS, 2018. High coverage genome sequencing and identification of genomic variants in Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). *bioRxiv* 306399. <https://doi.org/10.1101/306399>
- Ribas-Maynou J, Fernández-Encinas A, García-Peiró A, Prada E, Abad C, Amengual MJ, et al. Human semen cryopreservation: a sperm DNA fragmentation study with alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2014;2;1:83-7. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00158.x>
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups, *Human Reproduction* 2012;27;3:652–8. <https://doi.org/10.1093/humrep/der461>
- Roberts, C, O'Neill, C, Wright, L, 1993. Platelet activating factor (PAF) enhances mitosis in preimplantation mouse embryos. *Reprod Fertil Dev* 5: 271–279. <https://doi.org/10.1071/rd9930271>.
- Robinette, WL, Gashwiler, JS, Morris, OW, 1961. Notes of cougar productivity and life history. *J. Mammal.* 42(2): 204-217. <https://doi.org/10.2307/1376830>

- Roelke, ME, Martenson, JS, O'Brien, SJ, 1993. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Current Biology* 3(6): 340–350. [https://doi.org/10.1016/0960-9822\(93\)90197-v](https://doi.org/10.1016/0960-9822(93)90197-v)
- Rolland, AD, Lavigne, R, Daully, C, Calvel, P, Kervarrec, C, Freour, T, Evrard, B, RiouxLeclercq, B, Auger, J, Pineau, C, 2012. Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Hum Reprod* 28: 199–209. <https://doi.org/10.1093/humrep/des360>
- Romagnoli N, Lambertini C, Zambelli D, Cunto M, Ballotta G, Barbarossa A. Plasma concentration rise after the intramuscular administration of high dose medetomidine (0.13 mg/kg) for semen collection in cats. *Vet. Sci.* 2020;7:17.
- Romagnoli N, Zambelli D, Cunto M, Lambertini C, Ventrella D, Baron M. Non-invasive evaluation of the haemodynamic effects of high-dose medetomidine in healthy cats for semen collection. *J Feline Med Surg* 2015;18;4: 337–43. <https://doi.org/10.1177/1098612x15583345>
- Ross, PI, Jalkotzy, MG, 1992. Characteristics of a hunted population of cougars in southwestern Alberta. *The Journal of Wildlife Management* 56(3): 417-426.
- Roudebush, WE, 2007. Seminal platelet-activating factor. *Semin Thromb Hemost.* 33(1):69-74. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958464>.
- Roudebush, WE, Fukuda, AI, Minhas, BS, 1993. Enhanced embryo development of rabbit oocytes fertilized in vitro with platelet activating factor (PAF) treated sperm. *J Assist Reprod Genet* 10:91–94.
- Roudebush, WE, Massey, JB, Toledo, AA, Kort, HI, MitchellLeef, D, Elsner, CW, 2004. Platelet-activating factor significantly enhances intrauterine insemination pregnancy rates. *Fertil Steril* 82:52–56.
- Roudebush, WE, Minhas, BS, Ricker, DD, Palmer, TV, Dodson, MG, 1990. Platelet activating factor enhances in vitro fertilization of rabbit oocytes. *Am J Obstet Gynecol* 163:1670–1673. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(90\)90648-q](https://doi.org/10.1016/0002-9378(90)90648-q)
- Ruiz-García, M, Pinedo-Castro, M, 2013. Population genetics and phylogeographic analyses of the jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) by means of three mitochondrial markers: The first molecular population study of this species. In: Ruiz-Garcia, M, Shostell, JM. *Molecular population genetics, evolutionary biology and biological conservation of neotropical carnivores*. Nova Science Publishers, Inc.
- Ruiz-García, M, Pinedo-Castro, M, Shostell, JM, 2018. Mitogenomics of the jaguarundi (*Puma yagouaroundi*, Felidae, Carnivora): disagreement between

morphological subspecies and molecular data. *Mammalian Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.09.004>

Ryan, JP, Spinks, NR, O'Neill, C, Ammit, AJ, Wales, RG, 1989. Platelet activating factor (PAF) production by mouse embryos in-vitro and its effects on embryonic metabolism. *J Cell Biochem* 40: 387–395. <https://doi.org/10.1002/jcb.240400314>

Ryan, JP, Spinks, NR, O'Neill, C, Wales, RG, 1990. Implantation potential and fetal viability of mouse embryos cultured in media supplemented with platelet activating factor. *J Reprod Fertil* 89: 309–315. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0890309>.

Santos, C.S., Silva, A.M., Maia, K.M., Rodrigues, G.S.O., Feijó, F.M.C., Alves, N.D., Oliveira, M.F. e Silva A.R. (2020) Composition of semen and foreskin mucosa aerobic microbiota and its impact on sperm parameters of captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Journal of Applied Microbiology*. Doi:10.1111/jam.14663

Santus, W., Devlin, J.R. e Behnsen, J. (2021) Crossing Kingdoms: How the mycobiota and fungal-bacterial interactions impact host health and disease. *Infect Immun*. 89(4): e00648-20. Doi: 10.1128/IAI.00648-20.

Saremi, NF, Supple, MA, Byrne, A, Cahill, JA, Coutinho, LL, Dalén, L, Figueiró, HV, Johnson, WE, Milne, HJ, O'Brien, SJ, Shapiro, B, 2019. Puma genomes from North and South America provide insights into the genomic consequences of inbreeding. *Nature Communications* 10(1): 4769. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12741-1>

Schepper M. A comparative study in morphological defects of semen from African Lions (*Panthera leo*) and Caracal (*Caracal caracal*): collected by urethral catheterization and electroejaculation. Thesis of dissertation (Faculty of Veterinary Medicine – Ghent University). 2016. Disponível em: [https://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/274/171/RUG01-002274171\\_2016\\_0001\\_AC.pdf](https://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/274/171/RUG01-002274171_2016_0001_AC.pdf). Acesso em: 12 dez. 2020.

Schmidt, P.A., Bálint, M., Greshake, B., Bandow, C., Römbke, J. e Schmitt, I. (2013) Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry*: 128–132. Doi: 10.1016/j.soilbio.2013.05.014

Seidensticker, JCIV, Hornocker, MG, Wiles, WV, Messick, JP, 1973. Mountain lion social organization in the Idaho Primitive Area. *Wildl. Monogr*. 35: 1-60.

Seli, E, Robert, C, Sirard, MA, 2010. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Molecular Human Reproduction* 16(8): 513–530. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq041>

- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod.* 2005;20;12:3446-51. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei231>
- Silva, VHD, 2014. Avaliação do processo espermatogênico de gatos-mouriscos (*Puma yagouarundi*, Lacépède, 1809) adultos. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Viçosa. 54 f.
- Sinha, A, Singh, V, Yadav, S, 2017. Multi-omics and male infertility: status, integration and future prospects. *Frontiers In Bioscience, Scholar* 9: 375-394. <https://doi.org/10.2741/s493>
- Słowińska M, Karol H, Ciereszko A. Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. *Cryobiology* 2008; 56; 1: 100-2. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.10.176>
- Smuts GL, Robinson GA, Whyte IJ. Comparative growth of wild male and female lions (*Panthera leo*). *J Zoo* 1980;190;3:365–73. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1980.tb01433.x>
- Soheila, P, Parvin, S, 2020. The effect of free radicals on sperm DNA and antioxidant protective role; an assessment and review. *Reviews in Clinical Medicine* 7(1): 37-42.
- Souza, A, Boffo, E, Azzolini, F, Moreira, N, Oliveira, MJ, Ribeiro, RN, Erdmann, RH, 2021. Monitoramento endócrino para identificação da puberdade em gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*). *PUBVET* 15(2): a746. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n02a746.1-8>
- Souza, TD, 2009. Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, diagnóstico e controle de doenças; Epidemiologia e controle de qualidade de prod. de) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Spinks, NR, O'Neill, C, 1988. Antagonists of embryo-derived platelet activating factor prevent implantation of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 84: 89–98. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0840089>.
- Spinks, NR, Ryan, JP, O'Neill, C, 1990. Antagonists of embryo-derived platelet activating factor act by inhibiting the ability of the mouse embryo to implant. *J Reprod Fertil* 88: 241–248. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880241>.
- Stoner, DC, Wolfe, ML, Mecham, C, Mecham, MB, Durham, SL, Choate, DM, 2013. Dispersal behaviour of a polygynous carnivore: do cougars *Puma concolor* follow

source-sink predictions? *Wildlife Biology* 19(3): 289-301. <https://doi.org/10.2981/12-124>

Štšepetova, J, Baranova, J, Simm, J, 2020. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human *in vitro* fertilization procedure. *Reprod Biol Endocrinol* 18: 3. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0562-z>

Swanson EW, Bearden HJ. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science* 1951;10;4:981–7. <https://doi.org/10.2527/jas1951.104981x>

Swanson W, Bateman H, Vansandt L. Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reprod Domest Anim* 2016;52:255–60. <https://doi.org/10.1111/rda.12863>

Swanson WF, Johnson WE, Cambre RC, Citino SB, Quigley KB, Brousset DM, et al. Reproductive Status of Endemic Felid Species in Latin American Zoos and Implications for Ex Situ Conservation. *Zoo Biology* 2003;22:421–41. <https://doi.org/10.1002/zoo.10093>

Tamazian, G, Dobrynin, P, Zhuk, A, Zhernakova, DV, Perelman, PL, Serdyukova, NA, Graphodatsky, AS, Komissarov, A, Kliver, S, Cherkasov, N, Scott, AF, 2021. Draft de novo genome assembly of the elusive jaguarundi, *Puma yagouaroundi*. *Journal of Heredity* 112(6): 540-548.

Thuwanut, P, Chatdarong, K, Techakumphu, M, Axne´r, E, 2008. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenol* 70:233–40.

Tipkantha, W, Thuwanut, P, Morrell, J, Comizzoli, P, Chatdarong, K, 2016. Influence of living status (single vs. paired) and centrifugation with colloids on the sperm morphology and functionality in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Theriogenology* pii: S0093-691X(16)30329-6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.02>

Trapnell, C, Williams, BA, Pertea, G, Mortazavi, A, Kwan, G, van Baren, MJ, Salzberg, SL, Wold, BJ, Pachter, L, 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* 28(5): 511-5. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>

Urduinguio, RG, Bayón, GF, Dmitrijeva, M, Toraño, EG, Bravo, C, Fraga, MF, Bassas, L, Larriba, S, Fernández, AF, 2015. Aberrant DNA methylation patterns of

spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod* 30: 1014–1028. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev053>

Verstraelen, H., Vilchez-Vargas, R., Desimpel, F., Jauregui, R., Vankeirsbilck, N., Weyers, S., Verhelst, R., De Sutter, P., Pieper, D.H. e Van De Wiele, T. (2016) Characterization of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ*. 4:e1602. Doi: 10.7717/peerj.1602

Vickers, TW, Sanchez, JN, Johnson, CK, Morrison, SA, Botta, R, Smith, T, 2015. Survival and mortality of Pumas (*Puma concolor*) in a fragmented, urbanizing landscape. *PLoS ONE* 10(7): e0131490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131490>

Walker, CW, Harveson, LA, Pittman, MT, Tewes, ME, Honeycutt, RL, 2000. Microsatellite variation in two populations of Mountain Lions (*Puma concolor*) in Texas. *The Southwestern Naturalist* 45(2): 196. <https://doi.org/10.2307/3672461>

Wang, Y. e Qian, P.Y. (2009) Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS ONE* 4(10): e7401. Doi: 10.1371/journal.pone.0007401

Weigel, I, 1975. Small felids and clouded leopards. Pp, 281-332, In: Grzimek's animal life encyclopedia (R. Altevogt, R. Angermann, H. Dathe, B. Grzimek, K. Herter, D. Muller-Using, U. Rahm, and E. Thenius, eds.), Van Nostrand Reinhold, New York, 12:1-657.

Weng, S.L., Chiu, C.M., Lin, F.M., Huang, W.C., Liang, C. e Yang, T. (2014) Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS ONE* 9(10): e110152. Doi: 10.1371/journal.pone.0110152

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. e Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*: 315–322. Doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1

Wildt DE, Bush M, O'Brien SJ. Training Manual: reproduction, genetics and veterinary medicine. Front Royal: Center for New Opportunities in Animal Health Sciences (NOAHS), Conservation and Research Center, National Zoo, Smithsonian Institution, 1993.

Wildt, DE, Phillips, LG, Simmons, LG, Chakraborty, PK, Brown, JL, Howard, JG, Teare, A, Bush, M, 1988. A comparative analysis of ejaculate and hormonal

characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard and puma. *Biology of Reproduction* 38 245-255. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.2.245>

Wu, G.D., Lewis, J.D., Hoffmann, C., Chen, Y.Y., Knight, R., Bittinger, K., Hwang, J., Chen, J., Berkowsky, R., Nessel, L., Li, H. e Bushman, F.D. (2010) Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC microbiology* 10: 206. Doi: 10.1186/1471-2180-10-206

Wultsch, C, Waits, LP, Kelly, MJ, 2016. A comparative analysis of genetic diversity and structure in jaguars (*Panthera onca*), pumas (*Puma concolor*), and ocelots (*Leopardus pardalis*) in fragmented landscapes of a critical mesoamerican linkage zone. *PLoS ONE* 11(3): e0151043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151043>

Xu, J. e Gordon, J.I. (2003) Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(18): 10452-9. Doi: 10.1073/pnas.1734063100.

Yang Y, Wang HR, Zhou HM. Kinetics of inhibition of aminoacylase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol. *Int J Pept Protein Res.* 1996;48;6;:532-8. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1996.tb00872.x>

Yang, H., Zhang, J., Xue, Z., Zhao, C., Lei, L., Wen, Y., Dong, Y., Yang, J. e Zhang, L. (2020) Potential pathogenic bacteria in seminal microbiota of patients with different types of dysspermatism. *Sci Rep.* 10(1): 6876. Doi: 10.1038/s41598-020-63787-x

Young, SP, Goldman, EA, 1946. The puma, mysterious American cat. Dover Publication Inc, New York, 358. Disponível em: <https://archive.org/details/pumamysteriousam00youn/page/n5/mode/2up?view=theater> Acesso em: 13 jan. 2022.

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* 2008;69;4:485–90. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.019>

Zambelli D, Raccagni R, Cunto M, Andreani G, Isani G. Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology* 2010;74;8:1396–1402. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.011>

Zambelli, D, Merlo, B, Iacono, E, Prati, F, Belluzzi, S, 2006. Fertilizing ability of electro-ejaculated cryopreserved semen in the domestic cat. *Reproduction in Domestic Animals* 41(2): 137–141. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00654.x>

- Zanin, M, Palomares, F, Brito, D, 2015. What we (don't) know about the effects of habitat loss and fragmentation on felids. *Oryx*, 49(1), 96-106. <https://doi.org/10.1017/S0030605313001609>
- Zee YP, López-Fernández C, Arroyo F, Johnston SD, Holt WV, Gosalvez J. Evidence that single-stranded DNA breaks are a normal feature of koala sperm chromatin, while double-stranded DNA breaks are indicative of DNA damage. *Reproduction* 2009;138;2:267-78. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0021>.
- Zeller, KA, Vickers, TW, Ernest, HB, Boyce, WM, 2017. Multi-level, multi-scale resource selection functions and resistance surfaces for conservation planning: Pumas as a case study. *PLoS ONE* 12(6): e0179570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179570>
- Zhang RQ, Chen QX, Zheng WZ, Lin JY, Zhuang ZL, Zhou HM. Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32;8:865-72. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(00\)00030-3](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(00)00030-3)
- Zhang, WQ, Zhang, MH, 2013. Complete mitochondrial genomes reveal phylogeny relationship and evolutionary history of the family Felidae. *Genet Mol Res.* 12(3):3256-62. <https://doi.org/10.4238/2013.September.3.1>