



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Yuri Gonçalves Matos

Biometria testicular e caracterização morfológica, morfométrica e ultraestrutural dos espermatozoides de tigrina *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) no bioma Caatinga

MOSSORÓ

2023

Yuri Gonçalves Matos

Biometria testicular e caracterização morfológica, morfométrica e ultraestrutural dos espermatozoides de tigrina *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) no bioma Caatinga

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr.

MOSSORÓ

2023

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

MM433 MATOS, Yuri Gonçalves.
b Biometria testicular e caracterização
morfológica, morfométrica e ultraestrutural dos
espermatozoides de tigrina *Leopardus tigrinus*
(Schreber, 1775) no bioma Caatinga / Yuri
Gonçalves MATOS. - 2023.
56 f. : il.

Orientador: Alexandre Rodrigues SILVA.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Medicina
Veterinária, 2023.

1. gato-do-mato-pequeno. 2. ultrassonografia.
3. orquiometria. 4. sêmen. 5. conservação. I.
SILVA, Alexandre Rodrigues, orient. II. Título.

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

Yuri Gonçalves Matos

Biometria testicular e caracterização morfológica, morfométrica e ultraestrutural dos espermatozoides de tigrina *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) no bioma Caatinga

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Defendida em: 11 / 10 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

 Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente

Luãna Grasielle Pereira Bezerra, Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Gislayne Christianne Xavier Peixoto, Dra. (UFRN)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Nonato Leite; À minha mãe, Iraci Gonçalves; Ao meu irmão, Italo Gonçalves; À minha avó, Dona Rosa; e em memória ao meu avô, Seu Sebastião. Agradeço a vocês pelo amor, incentivo, e pela dedicação incondicional durante a minha criação para me fazer melhor. Pelo empenho irrestrito, especialmente para me oferecer educação de qualidade, que me possibilitou chegar até o presente momento. Minha maior determinação é o desejo de dar orgulho a vocês. Ainda aos meus tios, Edivan Santiago e Gilvan Santiago, pelo suporte e apoio que certamente foram essenciais durante meus anos de formação.

Ao meu companheiro, meu melhor amigo, e aquele por quem me apaixono todos os dias, Antônio Gustavo. Compartilhar a vida com você é um privilégio, e sou imensamente grato pelo amor, pela parceria e por toda paciência. Ao seu lado, os dias são melhores.

Aos meus amigos de graduação, Matheus Henrique, Ana Leticia, Mariana Aquino, Victor Hugo, Maria Isabelle e Efraim Matos. Considerem o carinho que tenho por cada um, que ultrapassa os muros desta Universidade. Contem comigo sempre.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Alexandre Rodrigues, pela sensibilidade de enxergar e investir esforços no meu potencial. Por contribuir para minha formação através de seus ensinamentos e orientações. Seu amor pelos animais, pela educação e pela ciência me inspiram.

Ao Dr. Herlon Victor Rodrigues e a Dra. Bruna Farias, sócios-administradores da Reprocenter Reprodução Animal Ltda., onde parte das análises deste trabalho foi processada. Ao Parque Ecológico Ecopoint e ao Zoológico Municipal Sargento Prata, em Fortaleza; e ao Zoológico de São Francisco, em Canindé. Agradeço pelo cuidado com os animais, pela disposição para o estudo e pela assistência durante as coletas.

A minha banca examinadora, cuidadosamente escolhida, Dra. Gislayne Peixoto e a Dra. Luana Pereira. Agradeço pela disponibilidade e pelas contribuições.

Ao Prof. Dr. Moacir Franco, por ceder o Laboratório de Morfofisiologia Animal; e Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura. Pela assistência para processamento e realização da eletromicroscopia. Suas contribuições foram enriquecedoras para o trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal. Todos vocês, sem excessões, foram e são essenciais para a minha formação pessoal e profissional. Tenho imenso orgulho de fazer parte dessa equipe.

Aos seres mais puros. Entre inúmeras possíveis carreiras, nenhuma outra me fascina tanto quanto aquela que se dedica a eles: Aos animais.

Muito obrigado!

This is the funny thing about growing up. For years and years, everybody's desperately afraid to be different, you know, in any way. And then, suddenly, almost overnight, everybody wants to be different. And that is where we win.

Mitchell Pritchett, *Modern Family*

RESUMO

Entre os pequenos felídeos neotropicais, a tigrina *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) está classificada como vulnerável pela União Internacional para Conservação da Natureza, em consequência da fragmentação de seus habitats, da caça e do comércio ilegal. Considerando a ameaça de extinção, estudos voltados para a compreensão da morfofisiologia reprodutiva são escassos, porém essenciais para estratégias de conservação da espécie. Este trabalho teve como objetivo obter dados referentes à biometria testicular e características espermáticas de *L. tigrinus* radicados no bioma Caatinga. Os procedimentos foram aprovados pela CEUA-UFERSA n. 20/2023 e pelo SISBIO n. 88201-1. Foram utilizados quatro animais, com idade média de $2,25 \pm 0,32$ anos, e peso médio de $2,52 \pm 0,15$ quilogramas, cativos dos zoológicos localizados em Fortaleza, CE (Latitude: $3^{\circ} 43' 6''$ Sul, Longitude: $38^{\circ} 32' 36''$ Oeste) e Canindé, CE (Latitude: $4^{\circ} 21' 29''$ Sul, Longitude: $39^{\circ} 18' 7''$ Oeste). Os animais foram capturados de seus recintos com puçá, e contidos quimicamente pela associação de dexmedomidina e cloridrato de cetamina. A avaliação do parênquima testicular foi realizada por ultrassonografia, bem como as mensurações de cada testículo para cálculo do volume testicular pelas fórmulas de Lambert e elipsoide. As amostras seminais foram coletadas por eletroejaculação, e os parâmetros macroscópicos (volume e cor) e microscópicos (concentração, motilidade, viabilidade, teste hiposmótico) dos ejaculados foram avaliados. A morfologia e morfometria foram descritas, e as amostras foram processadas para eletromicroscopia de varredura. Para todas as análises estatísticas, o software GraphPad Prism 8.0.2 foi utilizado. Como resultados, o parênquima testicular da tigrina apresentou ecogenicidade média e ecotextura homogênea. As fórmulas de Lambert e elipsoide demonstraram volumes testiculares significativamente diferentes. Os ejaculados apresentaram $237,50 \pm 89,85 \mu\text{L}$ de volume com concentração de $1,44 \pm 0,65 \times 10^9 \text{ spz/mL}$, $55,00 \pm 15,41\%$ de motilidade, $3,5 \pm 0,29$ de vigor, $51,75 \pm 16,77\%$ para viabilidade, $75,00 \pm 8,6\%$ responsivos ao teste hiposmótico e $60,75 \pm 10,24\%$ de espermatozoides morfologicamente normais. A análise morfométrica descreveu o comprimento total do espermatozoide de $29,50 \pm 0,10 \mu\text{m}$. A avaliação ultraestrutural permitiu definir a cabeça espermática de tigrinas em formato oval, o colo espermático e os segmentos equatorial e apical do acrossomo. Dessa forma, este estudo abrange a morfofisiologia reprodutiva de *L. tigrinus*, destacando a aplicação da ultrassonografia testicular na espécie e fornecendo dados sobre as características espermáticas que são fundamentais para a implementação de biotecnologias reprodutivas como estratégia de conservação.

Palavras-chave: gato-do-mato-pequeno; ultrassonografia; orquiometria; sêmen; conservação.

ABSTRACT

Among neotropical small felids, the oncilla *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) is classified as vulnerable by the International Union for Conservation of Nature, due to habitat fragmentation, hunting, and illegal trade. Considering the threat of extinction, studies on the understanding of reproductive morphophysiology are scarce but essential for species conservation strategies. This work aimed to obtain data on testicular biometry and spermatogenic characteristics of *L. tigrinus* in the Caatinga biome. Procedures were approved by CEUA-UFERSA No. 20/2023 and SISBIO No. 88201-1. Four animals, with an average age of 2.25 ± 0.32 years and weight of 2.52 ± 0.15 kilograms, housed in zoos in Fortaleza, CE (Latitude: $3^{\circ} 43' 6''$ S, Longitude: $38^{\circ} 32' 36''$ W) and Canindé, CE (Latitude: $4^{\circ} 21' 29''$ S, Longitude: $39^{\circ} 18' 7''$ W) were used. Animals were captured from their enclosures using a net and chemically restrained with a combination of dexmedetomidine and ketamine hydrochloride. Testicular parenchyma was assessed by ultrasonography, and measurements of each testicle were taken to calculate testicular volume using Lambert and ellipsoid formulas. Seminal samples were collected by electroejaculation, and macroscopic (volume and color) and microscopic (concentration, motility, viability, hypo-osmotic swelling test) parameters of ejaculates were evaluated. Morphology and morphometry were described, and samples were processed for scanning electron microscopy. GraphPad Prism software was used for all statistical analyses. Results showed that the tigrinus testicular parenchyma exhibited moderate echogenicity and homogeneous echotexture. Lambert and ellipsoid formulas revealed significantly different testicular volumes, with no significant correlation found with seminal parameters. Ejaculates presented an average volume of $237.50 \pm 89.85 \mu\text{L}$, a concentration of $1.44 \pm 0.65 \times 10^9$ spz/mL, $55.00 \pm 15.41\%$ motility, 3.5 ± 0.29 vigor, $51.75 \pm 16.77\%$ viability, $75.00 \pm 8.6\%$ responsiveness to the hypo-osmotic swelling test, and $60.75 \pm 10.24\%$ morphologically normal spermatozoa. Morphometric analysis described a total sperm length of $29.50 \pm 0.10 \mu\text{m}$. Ultrastructural evaluation allowed a more detailed description of the sperm morphology in tigrinus, to define the sperm head of tigrinus as oval-shaped, the sperm neck, and the equatorial and apical segments of the acrosome. Thus, this study encompasses the reproductive morphophysiology of *L. tigrinus*, emphasizing the application of testicular ultrasonography in the species and providing crucial data on sperm characteristics for the implementation of reproductive biotechnologies as a conservation strategy.

Keywords: oncilla; ultrasonography; orchimetry; semen; conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Tigrina (<i>Leopardus tigrinus</i>) em monitorização anestésica	31
Figura 2	–	A. Tigrina (<i>Leopardus tigrinus</i>) em decúbito lateral esquerdo, permitindo a observação dos testículos posicionados na região perineal, com conformação simétrica. B. Avaliação do pênis de tigrina (<i>Leopardus tigrinus</i>), visualizando o órgão de aproximadamente 1 cm de comprimento e presença de espículas penianas na base. C. Glande do pênis de tigrina em formato petaliforme	35
Figura 3	–	Padrão ultrassonográfico do testículo de tigrina (<i>Leopardus tigrinus</i>). Abaixo da borda testicular, a linha hiperecótica representa a túnica albugínea (Alb). Em linhas pontilhadas, mensuração de comprimento, altura e largura testicular (cm). A. Apresentação sagital, sendo observado mediastino testicular (M) hiperecogênico na porção central. B. Apresentação transversal, onde o mediastino (M) é visualizado como um ponto focal hiperecótico no centro da estrutura testicular, e o epidídimo (E) é diferenciado como uma estrutura hipoeecóica lateral	36
Figura 4	–	Tigrinas (<i>Leopardus tigrinus</i>) em decúbito lateral, com sonda de eletroejaculação inserida na ampola retal, e microtubos acoplados ao pênis	38
Figura 5	–	Fotomicroscopias dos espermatozoides de tigrinas (<i>Leopardus tigrinus</i>). A. Espermatozoide morfolologicamente normal; B. Cabeça fusiforme; C. Peça intermediária dobrada; D. Célula germinativa imatura (em seta); E. Cabeça solta; F. Microcefalia (em seta); G. Cauda enrolada	40
Figura 6	–	Eletromicrografia da morfologia espermática de tigrinas (<i>Leopardus tigrinus</i>). A. Visualização das divisões do espermatozoide, em Cb – Cabeça; PI – Peça intermediária; e Ca – Cauda. B. Destaque para cabeça do espermatozoide, visualizando Co – Colo espermático; e SEq – Segmento Equatorial do acrossomo. C. Visualização do Segmento Apical do acrossomo (SAp). D. Espermatozoide de tigrina com defeito de cauda fortemente enrolada em MEV. E. Defeito espermático de cauda dobrada em MEV	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Protocolo de eletroestimulação descrito por Howard <i>et al.</i> (1990)	19
Tabela 2	–	Média ($\pm$ EP) das características seminais de tigrinas por diferentes autores	20
Tabela 3	–	Mensurações volumétricas de testículos de tigrinas	23
Tabela 4	–	Morfometria descrita para espermatozoides de felídeos domésticos e selvagens	27
Tabela 5	–	Identificação das tigrinas (<i>Leopardus tigrinus</i>) utilizadas no estudo	30
Tabela 6	–	Morfometria testicular (cm) de tigrinas (<i>Leopardus tigrinus</i>) mensurada por ultrassonografia	36
Tabela 7	–	Volumes testiculares médios (Média $\pm$ EP) de tigrinas (<i>Leopardus tigrinus</i>) mensurados por ultrassonografia calculados pelas fórmulas de Lambert e elipsoide (cm ³)	37
Tabela 8	–	Parâmetros seminais de tigrinas (<i>Leopardus tigrinus</i>)	38
Tabela 9	–	Avaliação morfológica (%) dos ejaculados de tigrinas (<i>Leopardus tigrinus</i>)	39
Tabela 10	–	Média ($\pm$ EP) para morfometria espermática de tigrinas (<i>Leopardus tigrinus</i>)	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IUCN	União Internacional para Conservação da Natureza
km	Quilômetros
CITES	Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Fauna e Flora Selvagens em Perigo de Extinção
EP	Erro Padrão
mL	Mililitros
cm	Centímetro
mg	Miligramas
kg	Quilogramas
sptz	Espermatozoide
spt	Espermátides
S	Células de Sertoli
CASMA	Computer-assisted Sperm Morphometry Analysis
µm	Micrômetro
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentação
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-árido
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
°C	Graus célsius
MHz	Megahertz
Co. Ltd	Companhia empresarial
V	Volt
µl	Microlitros
mOsm	Miliosmol
g	Gramas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
pH	Potencial hidrogeniônico
M	Molar
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
nm	Nanômetros

LISTA DE SÍMBOLOS

$\pm$	Mais ou menos
%	Porcentagem
=	Igual a
$\times$	Multiplicado por
α	Alfa
V	Volts
°	Graus
'	Minutos
"	Segundos
10^6	Milhões
10^9	Bilhões

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 BIOECOLOGIA E ESTADO DE CONSERVAÇÃO DO GATO-DO-MATO- PEQUENO.....	15
2.2 MORFOFISIOLOGIA REPRODUTIVA MASCULINA DOS FELÍDEOS	17
2.2.1 Aspectos reprodutivos de tigrinas.....	17
2.2.2 Coleta, avaliação e processamento de sêmen em tigrinas.....	18
2.3 ULTRASSONOGRAFIA E BIOMETRIA TESTICULAR.....	21
2.3.1 Volume testicular.....	21
2.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA	23
2.4.1 Morfologia Espermática	23
2.4.1.1 Teratospermia	24
2.4.2 Morfometria espermática	26
2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA E AVALIAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA ESPERMÁTICA	27
2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	42
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Entre os pequenos felídeos neotropicais, a tigrina *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775), também conhecida como gato-do-mato-pequeno, está distribuída geograficamente em habitats e densidades populacionais variáveis, desde as florestas montanhosas na Costa Rica ao bioma semiárido da Caatinga brasileira (Payan e Oliveira, 2016). Entretanto, como consequência da destruição e fragmentação de seus habitats, somado ao comércio e caça ilegal (Motta e Reis, 2009), a espécie está classificada como “em perigo” pela Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Brasil, 2014) e “vulnerável” pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) (Payan e Oliveira, 2016).

Considerando a ameaça de extinção, a compreensão da fisiologia reprodutiva desse felídeo selvagem é fundamental para a implementação de estratégias adequadas de manejo e conservação, especialmente para a adaptação e implantação de biotecnologias que otimizem o potencial reprodutivo da espécie (Santos e Silva, 2022).

Nesse cenário, o estudo dos parâmetros orquiométricos, que inclui a análise das dimensões testiculares, fornece informações valiosas para avaliar a saúde reprodutiva dos machos e identificar indivíduos com maior potencial reprodutivo. Em mamíferos domésticos, as mensurações das medidas testiculares são aplicadas durante o exame andrológico em modelos matemáticos para calcular o volume testicular, que está intimamente relacionado com a qualidade do sêmen e fertilidade (Queiroz *et al.*, 2010). Nessas espécies, esses parâmetros refletem na estrutura seminífera e, consequentemente, na produção gametogênica, que afetam diretamente a idiossincrasia espermática (Gouletsou *et al.*, 2008).

Além das mensurações biométricas, a caracterização da célula espermática é fundamental para o desenvolvimento e padronização de técnicas de reprodução assistida, além de permitir a criação de bancos de material genético que possibilitem a conservação e multiplicação desses biomateriais (Costa *et al.*, 2022; Santos e Silva, 2022). Embora já existam descrições de tentativas de estabelecimento de protocolos para refrigeração (Angrimani *et al.*, 2017) e criopreservação (Baudi *et al.*, 2008) do sêmen de tigrinas, estudos detalhados sobre as características reprodutivas dos machos da espécie são ainda escassos. Na verdade, a literatura traz poucos estudos descritivos, predominantemente restritos às regiões sul, sudeste e centro-oeste do país (Morais *et al.*, 2002; Swanson, 2003; Erdmann *et al.*, 2006; Balarini *et al.*, 2012). Entretanto, a partir da recente revisão taxonômica do gênero *Leopardus* (Nascimento e Feijó, 2017), é possível que os estudos anteriormente relatados se refiram a espécie *L. guttulus*,

considerando sua distribuição geográfica. Portanto, informações sobre os parâmetros espermáticos da espécie *L. tigrinus* são ainda escassos.

Nessa perspectiva, a avaliação morfológica é uma abordagem amplamente empregada nas avaliações seminais e determinante para estimar o potencial de fertilização da amostra, considerando a descrição prévia das características celulares fisiológicas da espécie (Silva *et al.*, 2019). Além disso, a descrição morfométrica permite uma compreensão ainda mais detalhada da biologia dos gametas, aplicada ao diagnóstico de defeitos espermáticos ou para o fornecimento de dados como valores de referência para softwares de análises seminais computadorizadas (Barbosa *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019). Em adição, a avaliação ultraestrutural fornece informações significativas sobre a complexidade estrutural e funcional da célula e pode ser essencial para revelar características visíveis além da capacidade de resolução da microscopia óptica convencional (Silva *et al.*, 2019).

No entanto, até o presente momento, os estudos sobre a reprodução da tigrina permanecem insuficientes para abordar plenamente as necessidades de conservação dessa espécie. Portanto, este trabalho visa preencher essa lacuna, com uma abordagem inédita na mensuração biométrica testicular da espécie, a partir do uso da ultrassonografia, bem como a caracterização espermática detalhada, com descrição morfométrica e ultraestrutural, a fim de contribuir com informações que embasarão estratégias de conservação e manejo mais eficazes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOECOLOGIA E ESTADO DE CONSERVAÇÃO DO GATO-DO-MATO-PEQUENO

O Neotrópico compreende, provavelmente, a região biogeográfica mais diversa do planeta (Túnez *et al.*, 2021). No entanto, o declínio populacional de mamíferos nessa porção territorial ameaça sua biodiversidade, notadamente observado pelo aumento de espécies vulneráveis ou em risco de extinção (Júnior, 2023). Infelizmente, essa tendência é um fenômeno comum à quase todos os predadores neotropicais, consequentemente influenciando a interação das populações em toda a cadeia trófica e o equilíbrio dos ecossistemas (Redford, 1997).

Os felídeos, como predadores que ocupam o topo da cadeia alimentar, são particularmente impactados por qualquer ação, antrópica ou não, que influencie direta ou indiretamente os níveis tróficos inferiores. A “cascata trófica” resultante desse desequilíbrio pode desencadear consequências interconectadas que afetam toda a dinâmica biocenótica (Muller-Filho, 2000). Uma das importantes consequências dessas modificações na estrutura do ecossistema é a perda da biodiversidade (Vidolin, 2004).

A família Felidae, embora com uma sistemática complexa, sendo frequentemente revisada e reclassificada por diferentes autores (Kitchener *et al.*, 2017), reúne todos os pequenos gatos selvagens da América Central e do Sul no gênero *Leopardus*. A recente revisão taxonômica permitiu o reconhecimento de três espécies plenas de gato-do-mato-pequeno: *L. tigrinus*, com ocorrência no norte, noroeste e oeste da região neotropical; *L. emiliae*, ao leste; e *L. guttulus*, ao sul (Nascimento e Feijó, 2017).

Entre os felídeos neotropicais, o *Leopardus tigrinus*, popularmente conhecido como gato-do-mato-pequeno, gato-macambira, gato-tigre-do-norte ou tigrina, é a menor espécie felídea presente no Brasil, sendo proporcionalmente semelhante ao gato doméstico (Nascimento e Feijó, 2017; Bellani, 2020). Interessantemente, sua distribuição geográfica apresenta extrema variabilidade, abrangendo desde as florestas montanhosas e nubladas na Costa Rica e nos Andes, até a planície do bioma semiárido na Caatinga brasileira (Payan e Oliveira, 2016). No entanto, essa distribuição é descontínua e sua população é intrinsecamente pequena, com densidade populacional de 0,1 a 0,25 espécimes/km² nas florestas tropicais secas do Cerrado e da Caatinga, enquanto nas florestas úmidas da Bacia Amazônica é ainda mais reduzida, sendo encontrados 0,0001 espécimes/km² (Oliveira *et al.*, 2013; Bellani, 2020).

No Brasil, a população de *L. tigrinus* é naturalmente insustentável, enfrentando constantes ameaças pela perda e fragmentação de habitats, doenças, atropelamentos, comércio ilegal e mortes retaliatórias pela invasão de propriedades (Torres *et al.*, 2018). Entre essas, a perda e fragmentação de habitats é, seguramente, a principal ameaça (Bellani, 2020). Na ótica do semiárido, o Cerrado e a Caatinga brasileira são atemorizados pela antropização e destinação de áreas para a agropecuária, com constante perda de suas áreas remanescentes, afetando negativamente a tendência populacional da espécie (Marinho, 2015; Torres *et al.*, 2018).

Algumas décadas atrás, as tigrinas foram alvo de intensa exploração pelo comércio de pele animal. Entre os anos de 1976 e 1985, pelo menos 352 mil unidades de produtos a partir de pele de *L. tigrinus* foram comercializadas, de acordo com relatórios da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES) (Oliveira *et al.*, 2013). Atualmente, ainda que a caça da espécie seja proibida no Brasil e em outros países da América do Sul e Central, diminuindo o comércio internacional, a caça ilegal persiste regionalmente, contribuindo para o status de conservação preocupante (Payan e Oliveira, 2016).

Além disso, uma realidade frequentemente relatada nas tigrinas é a caça retaliatória após esses animais invadirem e predarem aves oriundas de propriedades privadas, gerando revolta dos produtores (Bellani, 2020). Torres *et al.* (2018) conclui que os carnívoros naturalmente substituirão suas presas por espécies domésticas em situações de desequilíbrio ambiental. Consequentemente, esses predadores também serão caçados por se alimentarem de animais domésticos.

Diante desses desafios, a demografia do *L. tigrinus* demonstra uma tendência decrescente e fragmentada. Como resultado, a espécie foi classificada como vulnerável pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (Payan e Oliveira, 2016) e em perigo pela Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção do IBAMA (Brasil, 2014). Nesse cenário, torna-se fundamental a implantação de estratégias de preservação do gato-domato-pequeno de maneira sustentável.

Considerando a insustentabilidade natural e a complexidade da reprodução consistente de pequenos felídeos em ambiente de cativeiro (Moreira, 2007), torna-se evidente que as biotécnicas de reprodução assistida sejam ferramentas importantes para a conservação desses animais. Portanto, uma compreensão detalhada da morfofisiologia reprodutiva da espécie pode ser essencial para permitir a adaptação de forma adequada das biotecnologias voltadas para a otimização do potencial reprodutivo desses animais.

2.2 MORFOFISIOLOGIA REPRODUTIVA MASCULINA DOS FELÍDEOS

A compreensão da anatomofisiologia reprodutiva é essencial para uma avaliação andrológica precisa e o sucesso reprodutivo de qualquer espécie (Moreira, 2023). Em contravia, as informações disponíveis sobre a reprodução de animais selvagens, especialmente dos felídeos, são escassas (Bellani, 2020). Ainda assim, quando presentes, há uma tendência de enfoque nas espécies de grande porte, como as *Panthera spp.*, mas poucos estudos detalhados nos pequenos felídeos, como os *Leopardus spp.* (Ceregatti e Feitosa, 2023). Como resultado, a fisiologia da reprodução de muitas dessas espécies permanece quase ou completamente desconhecida.

Possivelmente, o status ecológico da maioria das espécies e a restrição de acesso a espécimes na natureza sejam os principais fatores que limitam a produção científica nessa área. Isso coloca os pesquisadores em uma posição desafiadora, frequentemente trabalhando com uma amostragem reduzida e insuficiente para representar adequadamente a população, o que compromete a confiabilidade dos resultados (Wildt, 1989).

Em situações em que pouca informação consistente está disponível, uma alternativa para superar essa limitação é o uso de espécies filogeneticamente próximas como modelos experimentais (Santos e Silva, 2022). As similaridades anatômicas e fisiológicas do trato reprodutivo entre felinos domésticos e selvagens já foram descritas, permitindo a realização de pesquisas em maior escala pela maior disponibilidade de animais (Mehanna *et al.*, 2016). Assim, posteriormente os protocolos podem ser adaptados para a espécie de interesse.

2.2.1 Aspectos reprodutivos de tigrinas

A caracterização anatômica do sistema reprodutivo masculino de tigrinas é comum a de outros felídeos neotropicais (Carneiro *et al.*, 2010; Mehanna *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2020; Ceregatti e Feitosa, 2023), sendo comparativamente semelhantes ao gato doméstico descrito por Ellenport (1986). De maneira geral, os componentes funcionais incluem o pênis, a uretra, a glândula bulbouretral, a glândula prostática, os ductos deferentes, os epidídimos e os testículos.

O órgão genital masculino, o pênis, localiza-se ventralmente aos testículos, e apresenta algumas particularidades notáveis. A principal delas é evidenciada a partir da puberdade, quando ocorre um aumento na concentração sérica de andrógenos, resultando na formação de espículas penianas (Morais *et al.*, 2002). Essas estruturas consistem em um epitélio cornificado, e foram visualizadas no grupo da espécie por Moraes *et al.* (2002), Swanson *et al.* (2003) e

Erdmann *et al.* (2006). Diversas hipóteses são supostas para explicar as funções das espículas penianas, porém, de forma geral, acredita-se que sejam responsáveis por estimular o aparelho reprodutor feminino durante a cópula e induzir a ovulação (Carneiro *et al.*, 2010; Ceregatti e Feitosa, 2023).

Os testículos estão posicionados na região perineal, sendo internamente envoltos pela túnica albugínea, que origina o mediastino testicular. Essa faixa de tecido conjuntivo forma septos fibrosos que dividem os compartimentos do parênquima testicular em lóbulos (Machado *et al.*, 2020). A nível microscópico, os lóbulos são constituídos de túbulos contorcidos, chamados túbulos seminíferos, onde ocorre a produção espermática (Ceregatti e Feitosa, 2023). Cada etapa da espermatogênese ocorre em regiões específicas do epitélio, formando camadas celulares desde a base, onde estão as espermatogônias, até a luz do túbulo, onde são liberados os espermatozoides. Essa estrutura é possível graças às células de Sertoli, que desempenham papel significativo no suporte ao crescimento das células germinativas (Dalia *et al.*, 2019; Pinto, 2020). Além disso, podemos observar que, histologicamente, esse processo acontece de maneira cíclica e sucessiva (Ceregatti e Feitosa, 2023), em que, em tigrinas, a espermatogênese dura, aproximadamente, 41,37 dias (Balarini *et al.*, 2012).

Ainda, essa produção espermática pode ser influenciada pelo fenômeno de sazonalidade reprodutiva, em que a quantidade e qualidade de espermatozoides pode variar ao longo do ano e entre os hemisférios geográficos, a partir de variações climáticas, de fotoperíodo, ou de disponibilidade de alimentos (Morais *et al.*, 2002). Enquanto alguns felídeos respondem pronunciadamente a essas variações, como o gato doméstico (Nuñez-Favre *et al.*, 2012), o leopardo-das-neves (*Panthera uncia*) (Johnston *et al.*, 1994) e o gato-de-pallas (*Felis manul*) (Swanson *et al.*, 1996), para os felídeos neotropicais, essa influência parece ser mais discreta. Moraes *et al.* (2002) observaram que os efeitos sazonais não foram significativamente influentes na reprodução das tigrinas, embora picos de produção espermática tenham sido descritos durante o verão, onde existe uma influência positiva do fotoperíodo.

2.2.2 Coleta, avaliação e processamento de sêmen em tigrinas

Quanto a obtenção do sêmen, os métodos comumente empregados em felídeos são adaptados a suas particularidades anatomofisiológicas e comportamentais, abrangendo desde abordagens pouco invasivas, como o uso da vagina artificial, até métodos mais intrusivos, como a eletroejaculação. Esse último consiste na introdução de uma sonda retal lubrificada, que é

acoplada ao eletroejaculador, no assoalho da ampola retal do animal, permitindo o contato com a mucosa e o plexo pélvico, entre a próstata e a glândula bulbouretral (Zambelli e Cunto, 2022).

Furthner *et al.* (2018) avaliaram a segurança e inocuidade do procedimento sobre a mucosa retal de gatos, concluindo que a eletroestimulação, quando realizada adequadamente, não induz lesões histológicas e colonoscópicas significativas que comprometam a saúde do animal. Portanto, atualmente esse é considerado o método eletivo para coleta espermática em felídeos, e o único método descrito até o momento em tigrinas, possibilitando a realização com o animal anestesiado, mesmo em machos não treinados ou com comportamento agressivo, proporcionando maior segurança ao técnico e ao animal (Zambelli e Cunto, 2022).

Usualmente, a cetamina é o fármaco mais empregado na indução anestésica para eletroejaculação em felídeos, seja isoladamente ou em associação (Zambelli e Cunto, 2022). Quando associada a um $\alpha 2$ -agonista, como a medetomidina, Zambelli *et al.* (2007) obtiveram ejaculados com maior concentração espermática. Johnson (2018) substituiu a medetomidina pela dexmedetomidina (30-40 $\mu\text{g/kg}$), da mesma classe de $\alpha 2$ -agonistas, associada a cetamina (3-5 mg/kg), por via intramuscular. Essa combinação também foi utilizada com sucesso em *Panthera onca* por Silva *et al.* (2019), obtendo espermatozoides viáveis.

Ao comparar diferentes protocolos de estímulos elétricos em gatos, Pineda e Dooley (1984) observaram que o número de espermatozoides dos ejaculados sofreram variação em resposta a voltagem e ao número de estímulos. Nesse estudo, foi observado que a concentração espermática era significativamente maior quando aplicada voltagem no intervalo de 4 a 8V, em comparação aos eletroejaculados coletados com 1 ou 2V. No entanto, a estimulação com altas voltagens resultavam em contaminação por urina, o que compromete a viabilidade do sêmen. Entre os diferentes protocolos descritos na literatura, o mais utilizado em pequenos felídeos é o proposto por Howard *et al.* (1990) para gatos domésticos, representado na tabela 1.

Tabela 1. Protocolo de eletroestimulação descrito por Howard *et al.* (1990).

	Série 1			Série 2			Série 3	
Estímulos	10	10	10	10	10	10	10	10
Voltagem	2	3	4	3	4	5	4	5

Os estudos de Morais *et al.* (2002), Swanson *et al.* (2003), Erdmann *et al.* (2006) e Baudi *et al.* (2008) aplicaram o mesmo protocolo em tigrinas com sucesso. A média geral dos parâmetros seminais obtidos nesses estudos, desprezando as alíquotas contaminadas, estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Média ($\pm$ EP) das características seminais de tigrinas por diferentes autores.

	Morais <i>et al.</i> (2002) [n=4]	Swanson <i>et al.</i> (2003) [n=17]	Erdmann <i>et al.</i> (2006) [n=11]	Baudi <i>et al.</i> (2008) [n=4]
Volume (mL)	0,3 $\pm$ 0,1	0,11 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,2	0,35 $\pm$ 0,1
pH	7,6 $\pm$ 0,1	-	7,58	-
Concentração ($\times 10^6$/mL)	411,9 $\pm$ 46,3	83,0 $\pm$ 35,5	436,41 $\pm$ 95,8	242,8 $\pm$ 85,2
Motilidade (%)	71,4 $\pm$ 2,3	62,1 $\pm$ 5,7	73,44	78,9 $\pm$ 1,5
Vigor (0-5)	3,8 $\pm$ 0,1	-	3,48	3,9 $\pm$ 0,1
Morfologia normal (%)	59,2 $\pm$ 3,5	35,6 $\pm$ 6,0	55,86 $\pm$ 3,3	76,8 $\pm$ 0,9
Defeitos primários (%)	8,6 $\pm$ 1,6	-	-	5,9 $\pm$ 0,7
Defeitos secundários (%)	32,2 $\pm$ 2,9	-	-	17,3 $\pm$ 5,0

Estudos experimentais trabalharam ainda com criopreservação e refrigeração de sêmen na espécie. Baudi *et al.* (2008) avaliaram as propriedades criobiológicas da célula espermática de tigrinas congeladas em meio crioprotetor a base de lactose, gema de ovo e glicerol, utilizando curvas de congelamento rápida e lenta. Nesse estudo, foi possível observar que as amostras apresentaram uma redução significativa da porcentagem de espermatozoides móveis ($80,0 \pm 2,0\%$ nos ejaculados frescos e $49,0 \pm 2,9\%$ nas amostras congeladas-aquecidas), além de um efeito deletério importante na integridade acrossomal dos espermatozoides ($91,0 \pm 5,0\%$ nos ejaculados frescos e $30,8 \pm 5,6\%$ nas amostras criopreservadas-aquecidas), independente da curva de congelação utilizada. Mais recentemente, Angrimani *et al.* (2016) estudaram a refrigeração de sêmen por curto período de tempo na espécie, sugerindo o uso do diluente Tris-gema de ovo-citrato para manutenção dos parâmetros espermáticos de tigrinas por até 24 horas a 4°C (Índice de Motilidade Espermática – SMI: $50,0 \pm 1,7\%$).

Apesar de contribuírem significativamente com a aplicação de biotecnologias conservacionistas, ainda existe uma lacuna de dados importantes no entendimento da fisiologia reprodutiva da espécie, que podem permitir a otimização desses protocolos para obter resultados ainda mais satisfatórios. Não foi descrito, por exemplo, o uso da ultrassonografia testicular para mensuração biométrica nesses animais, o que representa uma grande limitação na avaliação andrológica. Adicionalmente, existe a necessidade de implementar técnicas de análise espermática mais aprofundadas, como a morfometria espermática e a avaliação

ultraestrutural, que permitam a adaptação de forma mais adequada das biotécnicas de reprodução assistida.

2.3 ULTRASSONOGRAFIA E BIOMETRIA TESTICULAR

A ultrassonografia é uma técnica de imagem amplamente empregada na Medicina Veterinária para a análise em tempo real da arquitetura e características ultrassonográficas de órgãos, permitindo a identificação de condições fisiológicas e patológicas (Peixoto *et al.*, 2010). Esta abordagem, não invasiva, precisa e rápida, pode ser aplicável em ambientes laboratoriais e de campo, o que tem estimulado sua utilização em diversos contextos de diagnóstico e pesquisa ao redor do mundo (Huda e Slone, 2003).

Rivkees *et al.* (1987) sugeriram o emprego da ultrassonografia como uma abordagem biométrica alternativa para avaliar o tamanho dos testículos. Comparada aos métodos tradicionais da época, como régua, paquímetro (Lambert, 1951) e orquidômetros (Prader, 1966), a ultrassonografia proporciona maior precisão, minimizando erros inerentes à medição, como por exemplo, a inclusão do epidídimo e do tecido cutâneo na mensuração e da variabilidade na espessura e elasticidade da pele escrotal (Goletsou *et al.*, 2008).

2.3.1 Volume testicular

A mensuração precisa do volume testicular oferece benefícios na avaliação de pacientes com desordens que afetem direta ou indiretamente o desenvolvimento testicular (traumas, orquite, epididimite, quiomioterapias), bem como no monitoramento do desenvolvimento puberal e no potencial reprodutivo (Goletsou *et al.*, 2008). Considerando que os túbulos seminíferos constituem cerca de 70-80% da massa testicular, o volume testicular está intrinsecamente correlacionado com a espermatogênese e, por extensão, com parâmetros reprodutivos como concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides da maioria das espécies domésticas, especialmente as de interesse produtivo (Rege *et al.*, 2000; Pant *et al.*, 2003; Mekasha *et al.*, 2007; Devkota *et al.*, 2008).

No entanto, essas correlações podem divergir entre as espécies, como no quati (*Nasua nasua*, Carnívora) e no cateto (*Tayassu tajacu*), onde não foram identificadas correlações significativamente relevantes entre parâmetros biométricos e a qualidade seminal (Queiroz *et al.*, 2010; Peixoto *et al.*, 2012). Nos felinos, essa relação parece ser inversa, conforme analisado por Neubauer *et al.* (2004). Nesse estudo, as maiores volumetrias obtidas de gatos domésticos

foram correlacionadas com uma menor qualidade espermática, como será abordado detalhadamente no tópico 2.4.1.1. Assim, é necessário estudos aprofundados e específicos para cada espécie, avaliando a presença ou ausência dessas correlações, e indicando se essa influência afeta positiva ou negativamente a fertilidade.

A ultrassonografia oferece uma excelente ferramenta para calcular o volume testicular quando medições objetivas e reprodutíveis são necessárias (Rivkees *et al.*, 1987; Paltiel *et al.*, 2002; Goletsou *et al.*, 2008). No entanto, ainda assim a precisão das estimativas ultrassonográficas pode variar conforme o operador e a fórmula usada para cálculos volumétricos (Goletsou *et al.*, 2008). Diversas fórmulas foram propostas, sendo a fórmula do elipsoide ($\text{volume} = \text{comprimento} \times \text{altura} \times \text{largura} \times 0,5236$) uma das mais comumente aplicadas (Peixoto, 2011), enquanto outros estudos usam uma variação empírica da fórmula, proposta por Lambert (1951) ($\text{volume} = \text{comprimento} \times \text{altura} \times \text{largura} \times 0,71$), que sugere que o testículo seja, na verdade, um cilindro de pontas arredondadas.

Apesar de ainda não existir uma metodologia padronizada estabelecida, comparações diretas da precisão dessas fórmulas em outras espécies indicaram a superioridade da fórmula de Lambert para estimar o volume de testículos através da ultrassonografia, enquanto a fórmula do elipsoide pode fornecer uma estimativa mais confiável para cálculos de volume testicular quando as mensurações são feitas por paquímetros (Paltiel *et al.*, 2002; Goletsou *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2009; Peixoto *et al.*, 2015). Adicionalmente, a medição pelo deslocamento de água (Princípio de Arquimedes) pode determinar diretamente o volume testicular de forma mais precisa, embora existam limitações quando aplicada em animais de pequeno porte, em que o volume testicular seja inferior a 6 cm^3 (Goletsou *et al.*, 2008), ou quando se está trabalhando com animais *in vivo*.

Nos felídeos neotropicais, o volume testicular apresenta alta variação entre as espécies, sendo naturalmente proporcional ao seu porte. Por exemplo, a *Panthera onca* pode atingir $62,43 \text{ cm}^3$ de volume testicular total (Madrigal-Valverde *et al.*, 2019), enquanto o *Leopardus colocolo* foi descrito com uma média de $2,8 \pm 0,7 \text{ cm}^3$ (Pinto, 2020). Em tigrinas, as medições volumétricas dos testículos também exibem uma variação considerável dentro da própria espécie, conforme descrito na Tabela 3.

É relevante mencionar que todas as avaliações realizadas até o momento estão restritas às regiões sul, sudeste e centro-oeste do país, demonstrando uma notável escassez de dados sobre essa espécie na região da Caatinga. Ainda, nota-se que todas as medições foram conduzidas utilizando paquímetro como ferramenta de avaliação, portanto, a avaliação ultrassonográfica ainda não foi implementada para essa espécie.

Tabela 3. Mensurações volumétricas de testículos de tigrinas.

Referência	Mensuração (cm ³)	Ferramenta	Fórmula	Local
Morais <i>et al.</i> (2002)	4,2 ± 0,2*	Paquímetro	Elipsoide	Paraná
Swanson <i>et al.</i> (2003)	2,8 ± 0,3	Paquímetro	Elipsoide	Sul e Sudeste
Erdmann <i>et al.</i> (2006)	2,3	Paquímetro	Elipsoide	Paraná
Balarini <i>et al.</i> (2012)	1,53 ± 0,4	Paquímetro	Elipsoide	Minas Gerais

* Volume dos testículos pareados.

2.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

Após a coleta do sêmen, a avaliação espermática desempenha um papel fundamental na determinação da qualidade reprodutiva e do potencial de fertilização do sêmen coletado (Barbosa, 2019). Rotineiramente, durante o exame andrológico os ejaculados são avaliados quanto a aspectos macroscópicos, incluindo coloração, aspecto e volume, e microscópicos, determinando a porcentagem de motilidade espermática, vigor, concentração, morfologia e integridade da membrana celular (Zambelli e Cunto, 2006).

Além de fornecer informações sobre a funcionalidade e viabilidade dos espermatozoides, a avaliação espermática pode preencher lacunas de conhecimento em espécies pouco estudadas, permitindo a caracterização de seus parâmetros seminais. Nesse sentido, apesar do estudo de Erdmann *et al.* (2006) relatar um exame reprodutivo em tigrinas com a descrição dos parâmetros citados, informações detalhadas e aprofundadas, incluindo a avaliação morfológica morfométrica e ultraestrutural dos espermatozoides da espécie, são inexistentes.

2.4.1 Morfologia Espermática

Alterações morfológicas podem estar diretamente correlacionadas com redução da fertilidade, como descrito por Axné e Forsberg (2007) para a espécie felina. Portanto, na avaliação da morfologia espermática, o gameta tem sua estrutura completamente examinada, e o detalhamento dos achados dessa análise é descrito quanto as alterações encontradas nas suas diferentes regiões anatômicas: cabeça, acrosso, peça intermediária e cauda. Ainda, os defeitos podem ser classificados em primários e secundários (referentes a origem, seja ela

durante a espermatogênese ou durante o trânsito epididimário) ou maiores e menores (de acordo com seu potencial de interferência na fertilidade) (Arruda *et al.*, 2011).

Em conhecimento de que o espermatozoide é uma célula translúcida, sua visualização sob microscopia óptica comum pode não ser nítida, dificultando a avaliação do contorno celular (Arruda *et al.*, 2011). Em situações em que a amostra é preparada em câmara úmida, fixada em soluções igualmente translúcidas, como a formalina-salina, faz-se necessário do uso de microscópio de contraste de fases (Zambelli e Cunto, 2022). Entretanto, a preparação corada permite uma avaliação mais simples e acessível. Nesse contexto, corantes como Rosa de Bengala e Fast Green FCF são frequentemente utilizados para visualização da estrutura espermática em felídeos (Villaverde *et al.*, 2008).

Em gatos domésticos, Ceregatti e Feitosa (2023) descrevem as principais anormalidades encontradas: espermatozoides piriformes, micro e macrocefalia, acrossomo anormal, fixação abaxial, peça intermediária enrolada, formação anormal da peça, espermatozoides imaturos, gota citoplasmática, cabeças soltas e cauda dobrada. Esses defeitos afetam diretamente a hidrodinâmica espermática e sua funcionalidade, reduzindo a capacidade de fertilização. Assim como nos felinos domésticos, esses achados são relativamente comuns em outras espécies da família Felidae (Moreira, 2023).

2.4.1.1 Teratospermia

Pukazhenth *et al.* (2006) demonstraram que ejaculados com elevada quantidade de espermatozoides defeituosos foram significativamente comprometidos durante o processo de capacitação e reação acrossômica, na penetração da zona pelúcida oocitária e, inclusive, na sobrevivência durante a criopreservação. Esse fenômeno, onde mais do que 60% dos espermatozoides avaliados apresentam defeitos morfológicos, é definido como teratospermia (Wildt, 1994), e tem sido frequentemente observado em ejaculados felídeos, embora exista variação entre as espécies e dentro de cada espécie (Axnér e Forsberg, 2007).

Considerando a família Felidae, onde parte do seu táxon tem suas funções reprodutivas afetadas pela sazonalidade, é possível que este seja um fator que contribua para o aumento das falhas morfológicas dos espermatozoides produzidos em determinadas estações do ano (Johnston *et al.*, 1994; Swanson *et al.*, 1996). Entretanto, nas últimas décadas, outros vetores também tem sido estudados como possíveis etiologias para indivíduos teratospérmicos.

Em pequenas populações, o grande percentual de espermatozoide malformados tem sido relacionado a perda da diversidade genética. Em estudo experimental, Pukazhenth *et al.* (2006)

provocaram endogamia em gatos domésticos a partir de cruzamentos intencionalmente consanguíneos por três gerações. Todos os filhotes nasceram aparentemente normais, sem aberrações anatômicas, e foram submetidos a eletroejaculação e análise seminal, onde foi possível observar que esses ejaculados apresentavam concentrações espermáticas anormalmente altas (77% mais espermatozoides do que os animais não parentados), e mais de 75% de espermatozoides morfologicamente defeituosos.

Em relação aos felídeos selvagens, a reprodução consanguínea pode ser acentuada pelo reduzido número de indivíduos nas espécies em declínio populacional, ou em populações que sofreram fragmentação e isolamento, reduzindo a variabilidade genética e tornando-os susceptíveis a consequências que comprometem a perpetuação da espécie. Esse efeito foi observado em leões asiáticos por Wildt (1994), onde acredita-se que a fragmentação dos seus habitats naturais induziram acasalamentos consanguíneos, levando a uma cascata de perda genética e, inevitavelmente, influenciando na atividade reprodutiva, sendo inclusive reportados descendentes estéreis.

Swanson *et al.* (2003) avaliaram o *status* reprodutivo de espécies felíneas em zoológicos da América Latina. A partir dos ejaculados de 15 tigrinas, provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil, foi possível observar uma média de $35,6 \pm 6,0\%$ (intervalo de 9-70) de espermatozoides normais, indicando a ocorrência de teratospermia em indivíduos dessas populações. Entre os defeitos espermáticos ($64,4 \pm 6,0\%$), nesse estudo foi possível observar a presença de anormalidades da cabeça (macrocefalia, microcefalia, bicefalia e acrossomo anormal), da peça intermediária (peça intermediária anormal, ausente, dobrada e presença de gota citoplasmática) e da cauda espermática (cauda dobrada e cauda enrolada).

Outra particularidade interessante observada é que, frequentemente, ejaculados teratospérmicos estão combinados a uma maior concentração espermática. Neubauer *et al.* (2004) quantificaram parâmetros histomorfométricos e espermatogênicos em gatos domésticos teratospérmicos e normospérmicos, verificando que de fato o volume testicular e a produção espermática aumentam em indivíduos teratospérmicos, acompanhado da redução das células de Sertoli e do índice apoptótico durante a espermatogênese. Portanto, aparentemente, um aumento na quantidade espermática compromete a qualidade do ejaculado.

Jewgenow *et al.* (2013) também relacionaram a teratospermia com a eficiência das células de Sertoli. Esses autores verificaram que gatos teratospérmicos apresentaram $13,4 \pm 0,5$ espermátides/células de Sertoli, enquanto em gatos normospérmicos essa relação era de $6,1 \pm 0,4$ spt/S. Portanto, embora o maior número de células espermatogênicas pareça benéfico, isso significa que mais células em desenvolvimento dependeriam de cada única célula de Sertoli,

comprometendo sua capacidade de suporte e nutrição. Balarini *et al.* (2012) descreveu por histomorfometria a população do epitélio seminífero de cinco tigrinas criadas em cativeiro em Minas Gerais, onde, nesses animais, cada célula de Sertoli foi capaz de sustentar e manter 13,48 espermatídes. Entretanto, nesse estudo nenhuma correlação com características seminais foi realizada.

É possível observar que as células espermáticas de felídeos possuem particularidades que interferem diretamente na avaliação do ejaculado, inclusive com elevada heterogeneidade entre as espécies da mesma família. Para aumentar a confiabilidade das avaliações morfológicas, o uso complementar da morfometria espermática pode fornecer informações precisas das dimensões e formatos dos gametas (Barbosa, 2019).

2.4.2 Morfometria espermática

A morfometria permite uma avaliação objetiva das características morfológicas espermáticas, pela mensuração da célula e de suas regiões estruturais, permitindo a identificação de características que, possivelmente, não seriam avaliadas convencionalmente. Ainda, estudos morfométricos podem fornecer informações sobre a biologia reprodutiva da espécie, para o fornecimento de dados como valores de referência para softwares de análises seminais (Barbosa *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019).

Os dados morfométricos são obtidos a partir da digitalização de imagens dos espermatozoides previamente corados, com auxílio de câmeras de captura acopladas a microscópio óptico. A partir das fotomicroscopias captadas, podem ser utilizados métodos automatizados, por sistemas computadorizados de análise morfométrica espermática (CASMA), ou manuais, pelo software ImageJ (Barbosa *et al.*, 2019).

A escassez de dados publicados referentes a morfometria de felídeos, inclusive da tigrina, dificulta a compreensão reprodutiva dessas espécies. A Tabela 4 apresenta as descrições morfométricas publicadas para espermatozoides de felídeos domésticos e selvagens.

Tabela 4. Morfometria descrita para espermatozoides de felídeos domésticos e selvagens.

	Parâmetro	Mensuração	Amostra	Local	Referência
<i>Felis catus</i>	Área da cabeça (μm^2)	7,34 – 15,59	Espermatozoides da cauda do epidídimo	Milão, Itália	Veronicchi <i>et al.</i> (2014)
	Área da cabeça (μm^2)	$8,20 \pm 0,01$	Espermatozoides da cauda do epidídimo	Quito, Equador	Gutiérrez-Reinoso e García-Herreros (2016)
	Área da cabeça (μm^2)	$8,55 \pm 2,18$	Espermatozoides da cauda do epidídimo	São Paulo, Brasil	Alves <i>et al.</i> (2018)
	Área da cabeça (μm^2)	$16,94 \pm 0,05$	Espermatozoides da cauda do epidídimo	Fortaleza, Brasil	Barbosa <i>et al.</i> (2019)
<i>Puma concolor</i>	Área da cabeça (μm^2)	$8,59 \pm 0,85$	Espermatozoides da cauda do epidídimo	Cusco, Perú	Cucho <i>et al.</i> (2016)
<i>Panthera onca</i>	Largura da cabeça (μm)	$3,6 \pm 0,03$	Sêmen coletado por eletroejaculação	Fortaleza, Brasil	Silva <i>et al.</i> (2019)
	Comprimento da cabeça (μm)	$4,9 \pm 0,02$			

2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA E AVALIAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA ESPERMÁTICA

Enquanto na microscopia óptica convencional, a imagem é formada a partir da emissão de fótons, que interagem com as estruturas da amostra e são transmitidos, absorvidos ou refletidos para visualização por um sistema de lentes; na microscopia eletrônica, como o nome sugere, são usados feixes de elétrons, que apresentam um comprimento de onda significativamente menor do que a luz visível (Toma, 2016). Essa abordagem confere a capacidade da técnica ultrapassar a limitação da resolução óptica, permitindo a observação detalhada de aspectos ultraestruturais do material em análise, alcançando a escala nanométrica. Devido à marcante capacidade de resolução do microscópio eletrônico, a análise ultraestrutural aumenta significativamente a quantidade de dados e a precisão das avaliações nos estudos do sêmen (Silva *et al.*, 2009; Bezerra, 2018).

2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Além da alta resolução, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permite a avaliação do contraste topográfico e composicional da superfície da amostra. Essa técnica gera imagens tridimensionais e de alta profundidade, obtidas a partir dos diferentes sinais emitidos pela interação entre os elétrons e o material analisado (Dedavid *et al.*, 2007; Ramos, 2013).

Esse equipamento é composto por uma coluna óptico-eletrônica, formada por um canhão de elétrons e um sistema de demagnificação, uma unidade de varredura, um suporte para amostras, um sistema detector e um sistema de visualização. Nesse procedimento, um feixe eletrônico de alta intensidade é emitido pelo canhão, passa por lentes eletromagnéticas para ser demagnificado e, em seguida, focalizado para atingir a superfície da amostra. Durante a interação com o material, raios eletromagnéticos, principalmente elétrons secundários e retroespalhados, são gerados e captados pelo sistema de detecção, sendo então convertidos em imagens exibidas em um monitor (Dedavid *et al.*, 2007; Bezerra, 2018).

Nas áreas biológicas, a MEV tem permitido a ampliação do conhecimento, por exemplo, através da identificação de espécies e de características filogenéticas que auxiliam na classificação taxonômica (Ramos, 2013). Na tecnologia do sêmen, estudos descritivos e comparativos podem caracterizar padrões espermáticos das diferentes espécies, ou auxiliar na avaliação da eficiência de biotecnologias aplicadas a reprodução de espécies ameaçadas.

Na família Felidae, a aplicação da MEV já foi realizada por Schmehl e Graham (1989) em estudo comparativo entre espermatozoides de gatos domésticos e tigres-siberianos (*Panthera tigris altaica*). Os autores observaram diferenças estruturais significativas pelo tamanho e formato da cabeça: nos gatos domésticos, a cabeça é oval e alongada, com um aparente estreitamento na região de inserção da peça intermediária; enquanto nos tigres-siberianos, a cabeça é notadamente mais arredondada, assimétrica e sem estreitamento. Em trabalho mais recente, Silva *et al.* (2019) também empregaram a MEV para descrever a ultraestrutura espermática da onça-pintada (*Panthera onca*), observando um padrão ultraestrutural morfológico semelhante ao dos tigres-siberianos, que pertencem a mesma subfamília Pantherinae. Outro importante avanço alcançado nas biotecnologias reprodutivas em felídeos foi a pesquisa conduzida por Santos *et al.* (2022), que documentou a produção de embriões a partir da fertilização *in vitro* heteróloga com oócitos de gatas domésticas e espermatozoides de onça-pintada criopreservados-aquecidos. Nesse estudo, a MEV permitiu nitidamente a observação do estágio de mórula do embrião híbrido.

Apesar dos trabalhos citados revelarem a riqueza de informações que a microscopia eletrônica pode fornecer, ainda não foram publicados estudos aplicando a técnica para caracterização dos espermatozoides de *L. tigrinus*.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Obter dados reprodutivos referentes à biometria testicular e características morfofisiológica espermáticas de *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) radicados no bioma Caatinga.

Objetivos específicos:

- Avaliar as características ultrassonográficas dos testículos de *L. tigrinus* da Caatinga;
- Comparar as fórmulas de elipsoide e empírica de Lambert para estimar o volume testicular de *L. tigrinus*.
- Descrever detalhadamente as características morfológicas e morfométricas dos espermatozoides de *L. tigrinus* da Caatinga;
- Analisar a ultraestrutura dos espermatozoides de *L. tigrinus* por meio de microscopia eletrônica de varredura;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Bioética e animais experimentais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentação da UFERSA (CEUA UFERSA: 34/2023) e autorizado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio SISBIO N° 88201-1). No estudo, foram utilizados quatro indivíduos sexualmente maduros, com idade média de $2,25 \pm 0,32$ anos, e peso médio de $2,52 \pm 0,15$ quilogramas, identificados na Tabela 5. Dentre esses animais, um foi proveniente do Instituto Ecopoint, e dois do Parque Zoológico Sargento Prata, ambos localizados na cidade de Fortaleza, Ceará, situada a 14 metros de altitude, sob as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 3° 43' 6" Sul, Longitude: 38° 32' 36" Oeste. O quarto animal foi oriundo do Zoológico São Francisco, localizado no Santuário do município de Canindé (Latitude: 4° 21' 29" Sul, Longitude: 39° 18' 7" Oeste). O clima é predominantemente tropical semiárido, com temperatura média de 27 a 29°C. Durante o experimento, os animais permaneceram alocados isoladamente em seus recintos, e foram submetidos a dieta à base de carne, com acesso livre à água fresca.

Tabela 5. Identificação das tigrinas (*Leopardus tigrinus*) utilizadas no estudo.

Animais	Local	Idade (anos)	Peso (kg)	Origem
A1	Fortaleza/CE	2,5	2,72	Cativo resgatado
A2	Fortaleza/CE	1,5	2,62	Cativo resgatado
A3	Fortaleza/CE	3	2,84	Nascido em cativeiro
A4	Canindé/CE	2	2,14	Cativo resgatado
Média ($\pm$ EP)		$2,25 \pm 0,32$	$2,52 \pm 0,15$	

Anestesia

Todos os animais foram submetidos a exame físico e classificados como clinicamente saudáveis, livres de doenças e aptos a serem submetidos ao procedimento anestésico para contenção química. Para cada procedimento, os animais foram capturados de seus recintos com puçá, e a associação de Dexmedomidina (Dexmedomitor, Zoetis, Campinas, SP, Brasil), na dose de 0,04mg/kg, com Cloridato de Cetamina (Ketalar, Pfizer, São Paulo, SP, Brasil), na dose

de 5mg/kg, foi administrada por via intramuscular (Johnson, 2018). Durante todo o procedimento, os parâmetros fisiológicos de temperatura corporal, pulso femoral, frequência cardíaca e respiratória foram monitorados (Figura 1).



Figura 1. Tigrina (*Leopardus tigrinus*) em monitorização anestésica.

Análise biométrica e ultrassonográfica testicular

A tigrina foi posicionada em decúbito lateral, e o gel acústico foi aplicado na área do escroto. As características ultrassonográficas foram avaliadas a partir de um equipamento portátil com transdutor linear de frequência 8 MHz, em modo-B e em tempo-real (Vinn A5, Vinno Technology Co. Ltd., Suzhou, Jiangsu, China). O parênquima testicular foi avaliado quanto a ecogenicidade e homogeneidade. Foram obtidas imagens sagitais e transversais para medir comprimento, altura e largura (cm) entre as bordas testiculares, utilizando cursores eletrônicos integrados a máquina de ultrassom (Peixoto *et al.*, 2012). As dimensões foram aplicadas para calcular o volume testicular pelas fórmulas de Lambert (1) e elipsoide (2):

$$Volume = Comprimento \times Largura \times Altura \times 0,71 \quad \dots (1)$$

$$Volume = Comprimento \times Largura \times Altura \times 0,5236 \quad \dots (2)$$

Os dados foram expressos em centímetros cúbicos (cm³).

Coleta de sêmen

As coletas aconteceram durante os meses de junho a agosto de 2023, sendo realizada uma coleta por animal, totalizando quatro amostras. Após confirmar que o animal estava em adequado plano anestésico, a tigrina foi posicionada em decúbito lateral e realizada limpeza da região peniana com solução salina (0,9%). No canal retal, as fezes foram removidas e um gel lubrificante foi utilizado para facilitar a penetração da sonda de eletroejaculação (Autojac V2®, Neovet, Uberaba, MG, Brasil). Os eletrodos foram posicionados em direção a superfície prostática. O procedimento foi composto por três ciclos com dez estímulos para cada voltagem (2V, 3V e 4V no primeiro ciclo; 3V, 4V e 5V no segundo ciclo; 4V e 5V no terceiro ciclo), conforme descrito para gatos domésticos por Howard *et al.* (1990) e aplicado em tigrinas previamente por Baudi *et al.* (2008). Cada estímulo durava aproximadamente 2 segundos, e o intervalo entre ciclos de 5 minutos. As amostras seminais foram coletadas em microtubos de 1,5ml, e os parâmetros espermáticos foram avaliados imediatamente após a coleta.

Análises do sêmen

Imediatamente após a coleta, as amostras foram submetidas à avaliação de parâmetros macroscópicos de volume e cor, assim como parâmetros microscópicos de motilidade (%) e vigor (escala de 0-5; 0 – sem movimento e 5 – movimento rápido progressivo – Moraes *et al.*, 2002) em microscopia óptica de luz. A concentração espermática foi estimada em uma câmara de contagem celular (Câmara de Neubauer), a partir de uma alíquota de sêmen diluída em solução de formol-salina tamponada e avaliada sob microscopia óptica em aumento de 400x.

A avaliação da viabilidade espermática, pela integridade estrutural da membrana plasmática, foi realizada através da preparação úmida de 5uL da amostra de sêmen com 5uL da coloração de Azul de Bromofenol em uma lâmina de vidro avaliada sob microscópio óptico de luz (400x), sendo contados os espermatozoides viáveis (sem coloração) e inviáveis (corados em azul) (Lima *et al.*, 2016).

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hipo-osmótico, utilizando água destilada (0 mOsm/L) como solução hipo-osmótica (Lima *et al.*, 2016). Foram contadas 100 células para estimar a porcentagem de espermatozoides que apresentem resposta osmótica (com enrolamento da cauda), sugerindo adequada funcionalidade da membrana plasmática.

Análise morfológica e morfométrica

Para avaliar a morfologia espermática, uma preparação úmida de 5uL de cada amostra em 45uL de solução de Rosa Bengala (água destilada 20mL; citrato de sódio 0,58g; formaldeído 0,8mL; Rosa Bengala 0,3g) foi realizada sob uma lâmina de vidro e, em seguida, observada em microscopia de luz com aumento de 1000x (Barbosa *et al.*, 2019). Foram contadas 100 células de cada amostra para determinar a proporção de células morfolologicamente normais e defeituosas, além da classificação dos defeitos de acordo com sua região (acrossomo, cabeça, colo, peça intermediária e cauda) e do seu potencial de influência na fertilidade (defeitos maiores ou menores) (Wildt *et al.*, 1986).

A morfometria espermática foi mensurada a partir da captura de imagens de 100 células consideradas morfolologicamente normais, utilizando as lâminas previamente preparadas com Rosa Bengala. As imagens foram capturadas sob aumento de 1000x em microscopia óptica. As mensurações foram realizadas utilizando software de análise digital ImageJ, seguindo as recomendações de Barbosa *et al.* (2019). Foram analisadas as seguintes medidas: comprimento (do ápice do acrossomo a base da cabeça) e largura (eixo transversal do maior diâmetro) da cabeça do espermatozoide, comprimento da peça intermediária (do colo ao annulus), comprimento da cauda (do annulus ao final da porção caudal distal) e comprimento total do espermatozoide (do ápice do acrossomo ao final da porção caudal distal) (Silva *et al.*, 2019).

Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de sêmen foram fixadas em solução de glutaraldeído tamponado a 2,5% (pH 7,4), sendo refrigeradas a 4°C e mantidas para posterior processamento e análise. Para o processamento, as amostras foram inicialmente centrifugadas a 800g por 10 minutos para formação de pellet de células. O pellet foi submetido a três lavagens em solução de tampão fosfato 0,2M (pH 7,4), impregnado em tetróxido de ósmio a 1% e lavado duas vezes em água destilada, seguido de desidratação com diferentes concentrações de álcool em série (50%, 70%, 90% e 100%). Após o processamento, as amostras foram dispersas em stubs e revestidas em ouro através da técnica de “*sputtering*” ou pulverização catódica, e observadas em microscópio eletrônico de varredura (Silva *et al.*, 2019).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Para todas as análises, o software GraphPad Prism 8.0.2 (Dotmatics, Boston, MA, USA) foi utilizado, considerando um valor de significância de $P < 0,05$. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. A diferença entre as médias das volumetrias testiculares quando utilizadas as fórmulas de Lambert e elipsoide foram avaliadas pelo teste t-Student.

5 RESULTADOS

Aspectos macroscópicos

Os testículos apresentaram conformações simétricas, ausência de lesões visíveis e consistência fibroelástica à palpação (Figura 2A). O pênis foi examinado macroscopicamente, observando presença de espículas discretas na base peniana dos animais A1, A2 e A3, e pronunciadas no animal A4 (Figura 2B), com glande em formato petaliforme (Figura 2C).

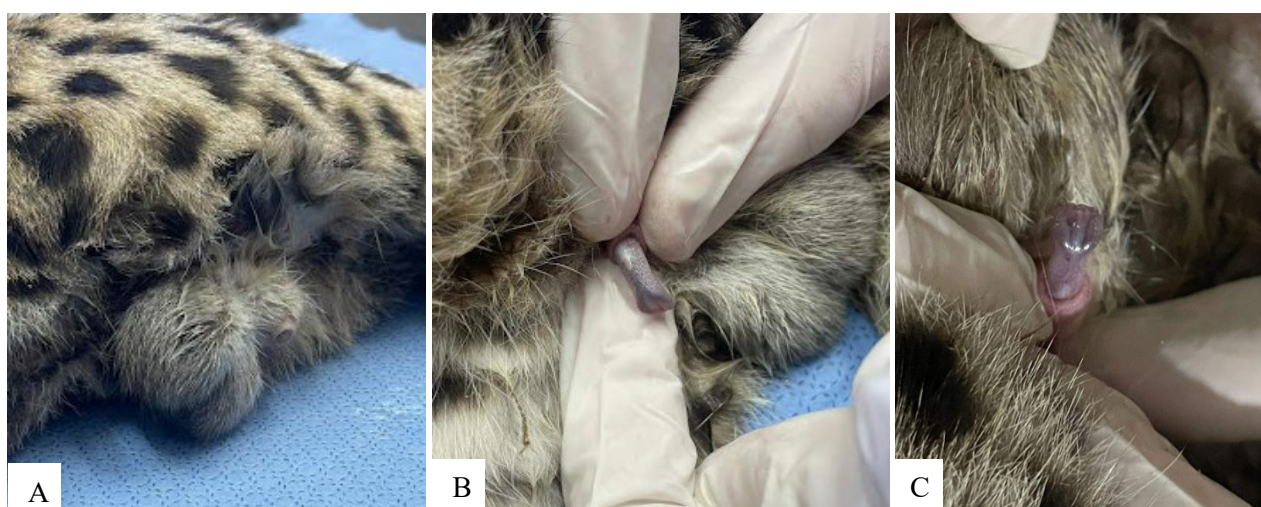


Figura 2. A. Tigrina (*Leopardus tigrinus*) em decúbito lateral esquerdo, permitindo a observação dos testículos posicionados na região perineal, com conformação simétrica. B. Avaliação do pênis de tigrina (*Leopardus tigrinus*), visualizando o órgão de aproximadamente 1 cm de comprimento e presença de espículas penianas na base. C. Glande do pênis de tigrina em formato petaliforme.

Aspectos ultrassonográficos e biometria testicular

Na ultrassonografia, o parênquima testicular da tigrina exibiu ecotextura homogênea e hiperecogenicidade em relação ao epidídimo, mas hipoecogenicidade em relação a túnica albugínea, sendo esses parâmetros comuns a todos os animais avaliados. Nas imagens transversais, foi possível identificar nitidamente uma estrutura linear hiperecótica na porção central do testículo, representando o mediastino testicular (Figura 3A). O epidídimo foi identificado como uma estrutura hipoecoica, e isolado da mensuração (Figura 3B).

A Tabela 6 apresenta as medidas morfométricas para comprimento, largura e altura, em centímetros, dos testículos direito e esquerdo de cada animal, assim como suas médias ($\pm$ EP).

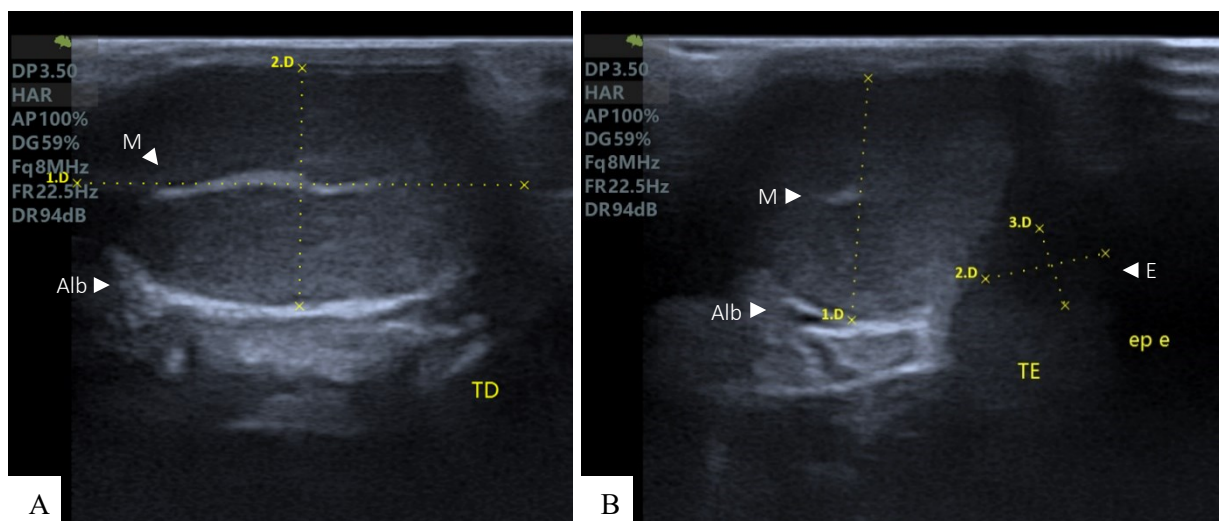


Figura 3. Padrão ultrassonográfico do testículo de tigrina (*Leopardus tigrinus*). Abaixo da borda testicular, a linha hiperecótica representa a túnica albugínea (Alb). Em linhas pontilhadas, mensuração de comprimento, altura e largura testicular (cm). **A.** Apresentação sagital, sendo observado mediastino testicular (M) hiperecogênico na porção central. **B.** Apresentação transversal, onde o mediastino (M) é visualizado como um ponto focal hiperecótico no centro da estrutura testicular, e o epidídimo (E) é diferenciado como uma estrutura hipoecoica lateral.

Tabela 6. Morfometria testicular (cm) de tigrinas (*Leopardus tigrinus*) mensurada por ultrassonografia.

Animais	Testículo Direito (cm)			Testículo Esquerdo (cm)		
	Comprimento	Largura	Altura	Comprimento	Largura	Altura
A1*	-	-	-	-	-	-
A2	2,27	1,27	1,25	1,92	1,37	1,26
A3	2,05	1,68	1,35	2,38	1,61	1,32
A4	2,04	1,65	1,45	2,14	1,57	1,45
Média	2,12	1,53	1,35	2,14	1,51	1,33
(± EP)	± 0,07	± 0,13	± 0,06	± 0,13	± 0,07	± 0,05

*Não foram realizadas medições ultrassonográficas no animal.

As médias das estimativas volumétricas quando utilizadas as fórmulas de Lambert ($3,11 \pm 0,21$) e elipsoide ($2,29 \pm 0,16$) apresentaram diferença estatística, com a fórmula de Lambert exibindo valores significativamente superiores de volumetria ($P = 0,0113$) (Tabela 7).

Tabela 7. Volumes testiculares médios (Média $\pm$ EP) de tigrinas (*Leopardus tigrinus*) mensurados por ultrassonografia calculados pelas fórmulas de Lambert e elipsoide (cm³) [n = 6 testículos, considerando-se 03 direitos e 03 esquerdos em conjunto].

Animais	Média ($\pm$ EP) dos volumes testiculares (cm ³)**	
	Fórmula de Lambert	Fórmula de elipsoide
A1*	-	-
A2	2,46 $\pm$ 0,10	1,81 $\pm$ 0,08
A3	3,45 $\pm$ 0,15	2,54 $\pm$ 0,11
A4	3,43 $\pm$ 0,04	2,53 $\pm$ 0,03
Média ($\pm$ EP)**	3,11 $\pm$ 0,21 ^a	2,29 $\pm$ 0,16 ^b

*Não foram realizadas medições ultrassonográficas no animal.

** n = 06, considerando-se o conjunto de 03 testículos direitos e 03 esquerdos.

^{a, b} Letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatisticamente significativa entre a mesma linha.

Análise do sêmen

A associação das drogas anestésicas dexmedetomidina (0,04mg/kg) e cloridrato de cetamina (5mg/kg) foi eficiente na manutenção do adequado plano anestésico em tigrinas durante todo o procedimento (Figura 1), bem como na recuperação adequada, sem intercurtos.

A eletroejaculação possibilitou a obtenção de ejaculados em 100% dos animais (Figura 4), em que as amostras de sêmen obtidas dos animais A1 e A2 apresentaram uma coloração branca-opalescente, enquanto as amostras dos animais A3 e A4 estavam ligeiramente amareladas e translúcidas, sugerindo contaminação por urina. O volume médio total dos ejaculados foi de 237,50 $\pm$ 89,85 μ L, com uma concentração média de 1,44 $\pm$ 0,65 $\times 10^9$ espermatozoides/mL. Notavelmente, o animal A2 registrou a concentração espermática mais elevada, alcançando 3,09 $\times 10^9$ espermatozoides/mL, enquanto o animal A4 apresentou a menor concentração espermática, totalizando 0,11 $\times 10^9$ espermatozoides/mL. Os valores individuais e médios para volume, motilidade, vigor, concentração, viabilidade e teste hiposmótico podem ser consultados na Tabela 8.

Avaliação morfológica

A normalidade morfológica dos espermatozoides foi observada em 60,75 $\pm$ 10,24% das amostras em estudo. Entre os animais, destaca-se o A2, que apresentou a maior proporção de

células morfológicamente normais (80%), enquanto os ejaculados de A1 (38%) e A3 (49%) foram classificados como teratospérmicos pela alta incidência de anormalidades espermáticas.

A Tabela 9 mostra detalhes sobre os parâmetros morfológicos individuais e as médias dos ejaculados obtidos. A Figura 5 apresenta espermatozoides morfológicamente normais e alguns dos defeitos espermáticos encontrados.



Figura 4. Tigrinas (*Leopardus tigrinus*) em decúbito lateral, com sonda de eletroejaculação inserida na ampola retal, e microtubos acoplados ao pênis.

Tabela 8. Parâmetros seminais de tigrinas (*Leopardus tigrinus*).

Animais	Volume (μL)	Concentração (spz/mL) $\times 10^9$	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Viabilidade (%)	Hiposmótico (%)
A1	500	1,79	60	4	59	72
A2	150	3,09	75	4	79	52
A3*	100	0,78	10	3	66	94
A4*	200	0,11	75	3	3	70
Média ($\pm$ EP)	237,50 $\pm 89,85$	1,44 $\pm 0,65$	55,00 $\pm 15,41$	3,5 $\pm 0,29$	51,75 $\pm 16,77$	75,00 $\pm 8,6$

*Ejaculados contaminados por urina.

Tabela 9. Avaliação morfológica (%) dos ejaculados de tigrinas (*Leopardus tigrinus*).

Parâmetros	A1	A2	A3	A4	Média (± EP)
Morfologia normal	38	76	49	80	60,75 ± 10,24
Defeitos espermáticos	62	24	51	20	39,25 ± 10,24
Acrossomo	4	5	3	1	3,25 ± 0,85
Maiores	4	5	3	1	3,25 ± 0,85
Contorno anormal	1	2	1	1	1,25 ± 0,25
Acrossomo ausente	3	3	2	0	2 ± 0,70
Cabeça	9	12	4	6	7,75 ± 1,75
Menores	1	0	1	0	0,5 ± 0,29
Microcefalia	1	0	0	0	0,25 ± 0,25
Macrocefalia	0	0	1	0	0,25 ± 0,25
Maiores	8	12	3	6	7,25 ± 1,89
Fusiforme	2	3	0	4	2,25 ± 0,85
Piriforme	0	1	0	0	0,25 ± 0,25
Cabeça solta	6	5	2	2	3,75 ± 1,03
Contorno anormal	0	3	0	0	0,75 ± 0,75
Colo	1	0	0	0	0,25 ± 0,25
Maiores	1	0	0	0	0,25 ± 0,25
Implantação retroaxial	1	0	0	0	0,25 ± 0,25
Peça intermediária	22	3	23	6	13,5 ± 5,24
Maiores	22	3	23	6	13,5 ± 5,24
Dobrada	18	1	14	0	8,25 ± 4,55
Enrolada	3	2	8	3	4 ± 1,35
Gota proximal	1	0	1	2	1 ± 0,41
Ausência da peça	0	0	0	1	0,25 ± 0,25
Cauda	26	4	21	6	14,25 ± 5,45
Menores	26	4	21	6	14,25 ± 5,45
Dobrada	5	2	3	3	3,25 ± 0,63
Enrolada	20	2	18	3	10,75 ± 4,79
Gota distal	1	0	0	0	0,25 ± 0,25
Célula germinativa imatura	0	0	0	1	0,25 ± 0,25

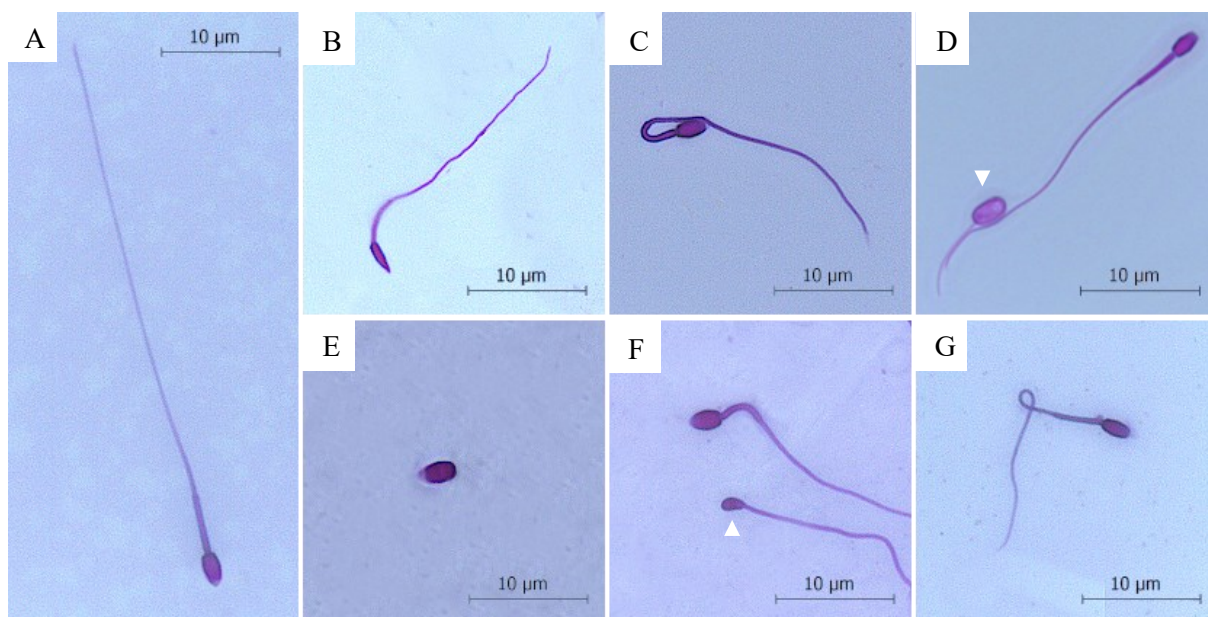


Figura 5. Fotomicroscopias dos espermatozoides de tigrinas (*Leopardus tigrinus*). **A.** Espermatozoide morfologicamente normal; **B.** Cabeça fusiforme; **C.** Peça intermediária dobrada; **D.** Célula germinativa imatura (em seta); **E.** Cabeça solta; **F.** Microcefalia (em seta); **G.** Cauda enrolada.

Avaliação morfométrica

Os espermatozoides da tigrina apresentaram uma cabeça de formato oval ligeiramente alongado, com comprimento médio de $2,51 \pm 0,01 \mu\text{m}$ e largura de $1,46 \pm 0,01 \mu\text{m}$. A peça intermediária apresentou $4,39 \pm 0,01 \mu\text{m}$ de extensão, e o comprimento da cauda atingiu $22,60 \pm 0,01 \mu\text{m}$, totalizando o comprimento médio da célula espermática de $29,50 \pm 0,10 \mu\text{m}$. As mensurações individuais são expressas na Tabela 10.

Avaliação ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A eletromicroscopia de varredura (MEV) dos espermatozoides de tigrinas evidenciou a cabeça do espermatozoide da espécie em formato oval alongado. As regiões de cabeça, peça intermediária e cauda são apresentadas na Figura 6A. Além disso, foi possível definir estruturas de escala nanométrica em detalhes, como o colo espermático e os segmentos equatorial (Figura 6B) e apical (Figura 6C) do acrossomo (Figura 6B). Defeitos espermáticos frequentes observados na análise morfológica convencional foram encontrados, também, durante a avaliação eletromicroscópica, como espermatozoides com a cauda fortemente enrolada (Figura 6D) e cauda dobrada (Figura 6E).

Tabela 10. Média ($\pm$ EP) para morfometria espermática de tigrinas (*Leopardus tigrinus*).

Animais	Cabeça		Peça intermediária	Cauda	Comprimento total (μm)
	Comprimento (μm)	Largura (μm)	Comprimento (μm)	Comprimento (μm)	
A1	2,33 $\pm$ 0,02	1,49 $\pm$ 0,01	4,39 $\pm$ 0,02	22,05 $\pm$ 0,22	28,73 $\pm$ 0,22
A2	2,59 $\pm$ 0,02	1,47 $\pm$ 0,01	4,48 $\pm$ 0,02	22,36 $\pm$ 0,11	29,45 $\pm$ 0,13
A3	2,55 $\pm$ 0,02	1,32 $\pm$ 0,01	4,32 $\pm$ 0,02	22,01 $\pm$ 0,23	28,84 $\pm$ 0,23
A4	2,63 $\pm$ 0,02	1,54 $\pm$ 0,01	4,37 $\pm$ 0,01	24,10 $\pm$ 0,12	31,00 $\pm$ 0,12
Média	2,51 $\pm$ 0,01	1,46 $\pm$ 0,01	4,39 $\pm$ 0,01	22,60 $\pm$ 0,01	29,50 $\pm$ 0,10

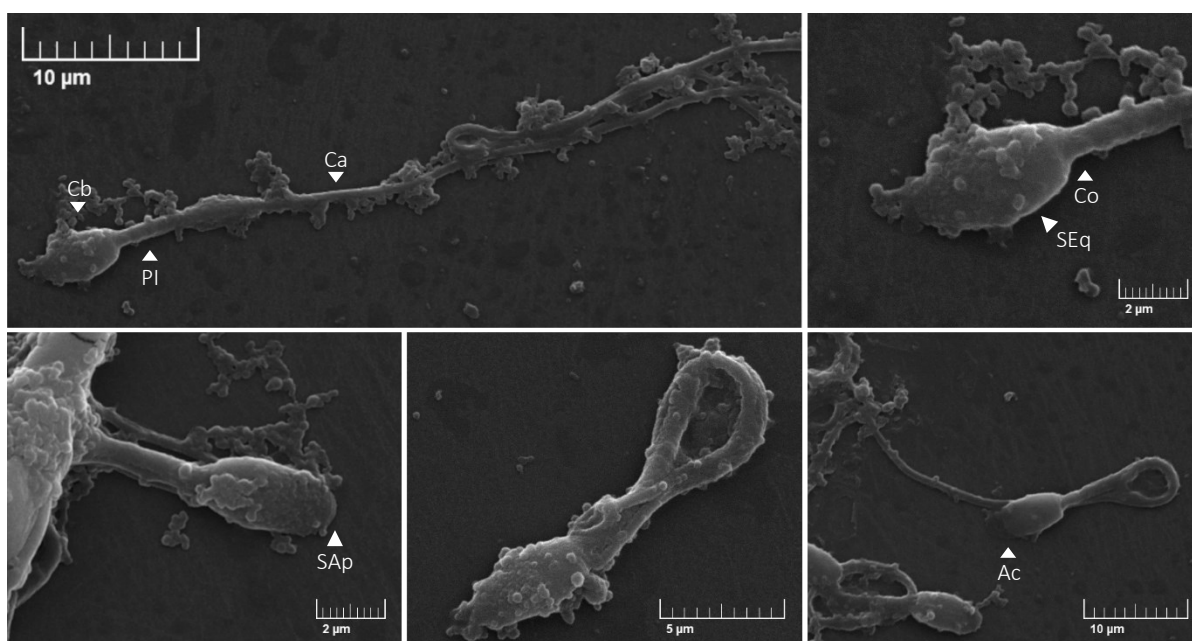


Figura 6. Eletromicrografia da morfologia espermática de tigrinas (*Leopardus tigrinus*). **A.** Visualização das divisões do espermatozoide, em Cb – Cabeça; PI – Peça intermediária; e Ca – Cauda. **B.** Destaque para cabeça do espermatozoide, visualizando Co – Colo espermático; e SEq – Segmento Equatorial do acrossomo. **C.** Visualização do Segmento Apical do acrossomo (SAp). **D.** Espermatozoide de tigrina com defeito de cauda fortemente enrolada em MEV. **E.** Defeito espermático de cauda dobrada em MEV.

6 DISCUSSÃO

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a aplicar a ultrassonografia para avaliação e mensuração dos parâmetros testiculares em *Leopardus tigrinus*. Além disso, fornecemos dados precisos sobre os parâmetros seminais desta espécie, particularmente com animais radicados no bioma Caatinga, permitindo ainda o aprofundamento da caracterização morfológica de suas células espermáticas por meio da descrição morfométrica e ultraestrutural.

A partir de uma avaliação andrológica inicial, observou-se que, enquanto muitos felídeos exibem uma morfologia peniana de formato cônico, como o gato doméstico (Ellenport, 1986) e a onça-pintada (*P. onca* - Silva *et al.*, 2019), o pênis de tigrinas apresenta uma glândula visivelmente pronunciada, característica também observada em outras espécies do gênero, como a jaguatirica (*Leopardus pardalis* – Machado *et al.*, 2020) e o gato-do-mato-do-sul (*Leopardus guttulus* – Tebet *et al.*, 2022). Notavelmente, a extremidade do pênis de tigrinas forma um arranjo com bordas livres e o óstio uretral externo ao centro. Esse padrão morfológico também foi observado no lobo-marinho-do-sul (*Arctocephalus australis*), pertencente à mesma Ordem Carnívora, em que os autores Machado *et al.* (2012) sugeriram os termos “petaliforme” ou “liliforme”, referentes a semelhança com pétalas de flores ou com a flor de lírio-da-paz. Nesse estudo, adotamos essa terminologia para descrever o órgão genital externo das tigrinas.

No que se refere a avaliação testicular, um exame minucioso é requerido, uma vez que esses órgãos participam diretamente da produção de espermatozoides, e, conseqüentemente, afetam o desempenho reprodutivo (Goletsou *et al.*, 2008). Ao introduzir o uso da ultrassonografia na avaliação testicular da espécie, este estudo representa um avanço significativo, pela definição da técnica e de parâmetros ultrassônicos de ecotextura e ecogenicidade fisiológicas aplicáveis para tigrinas, semelhantes aos descritos anteriormente para o felino doméstico (Trautwein e Martins, 2021).

Em felídeos de grande porte, a ultrassonografia testicular já demonstrou eficácia para diagnóstico de alterações testiculares em onça-pintada (*P. onca* – Berger *et al.*, 1999), e, mais recentemente, em onças-pardas (*Puma concolor*) para avaliar e classificar sua capacidade reprodutiva (Araújo *et al.*, 2021). Com essa perspectiva, o presente trabalho pode ser considerado um passo inicial na aplicação dessa ferramenta para auxiliar na conservação de tigrinas e, potencialmente, de outros pequenos felídeos neotropicais.

As informações obtidas sobre a biometria testicular são de grande relevância para a compreensão mais abrangente da biologia reprodutiva da espécie, particularmente considerando o uso da ultrassonografia para essa mensuração. Estudos prévios têm relatado

medidas de morfometria testicular de tigrinas utilizando paquímetros, atingindo mensurações variáveis de $1,53 \pm 0,4 \text{ cm}^3$ (Balarini *et al.*, 2012) a $2,8 \pm 0,3 \text{ cm}^3$ (Swanson *et al.*, 2003), ambos calculados pela fórmula de elipsoide. Nosso estudo obteve resultados semelhantes quando utilizada a mesma equação ($2,29 \pm 0,16 \text{ cm}^3$), entretanto a diferença significativa do resultado obtido pela fórmula de Lambert ($3,11 \pm 0,21 \text{ cm}^3$) demonstra a necessidade de estudos que verifiquem a confiabilidade dessas metodologias a partir de comparações envolvendo não somente as fórmulas, mas também as ferramentas de mensuração. Em cães, a equação de Lambert demonstrou maior precisão do volume testicular quando a ultrassonografia foi utilizada para mensuração da morfometria (Paltiel *et al.*, 2002; Goletsou *et al.*, 2008), o mesmo ocorrendo em humanos (Hsieh *et al.*, 2009) e catetos (Peitoxo *et al.*, 2015). Portanto, sugerimos estudos comparativos em tigrinas ou em modelos experimentais filogeneticamente mais próximos, como o gato doméstico, que possibilitem a avaliação do volume testicular real com órgãos orquiectomizados, para estimar a confiabilidade dessas abordagens na família Felidae.

Quando se trata dos parâmetros seminais, é importante destacar a influência da técnica de coleta por eletroejaculação, que devido a diversos fatores intrinsecamente heterogêneos, como os ciclos de eletroestímulos (Pineda e Dooley, 1984), o protocolo anestésico (Zambelli *et al.*, 2007) e as próprias variações individuais, podem afetar os resultados. Contudo, esta é a abordagem mais viável para coleta de sêmen em animais selvagens (Zambelli e Cunto, 2022), sendo, até o momento, a única técnica descrita para tigrinas (Baudi *et al.*, 2008). Em nosso estudo, a qualidade do sêmen pode ter sido influenciada pela presença de urina nos ejaculados dos animais A3 e A4. Embora essa ocorrência seja comum durante a eletroestimulação, certamente exerceu impacto negativo para os parâmetros de motilidade, viabilidade e resposta hiposmótica das amostras.

Observamos que, em comparação aos achados de Moraes *et al.* (2002) com tigrinas cativas da região paranaense, reportando uma média de $411,9 \pm 46,3$ milhões ($\times 10^6$) de espermatozoides/ml ($0,3 \pm 0,1 \text{ mL}$ de volume seminal), nosso estudo apresentou uma média substancialmente maior, com $1,44 \pm 0,65$ bilhões ($\times 10^9$) de concentração espermática por mL, ($0,2 \pm 0,09 \text{ mL}$ de volume seminal). Esse aumento considerável pode ser justificado, possivelmente, à influência ambiental da região semiárida da Caatinga na função reprodutiva. Apesar de não apresentar estações do ano bem definidas, a posição estratégica desse bioma oferece condições ambientais favoráveis ao fotoperíodo reprodutivo de forma constante. Portanto, sugere-se que a maior concentração de espermatozoides observada na nossa pesquisa possa estar associada a uma produção espermática elevada em animais cativos dessa região.

A proporção de pleomorfismo nas formas espermáticas variou consideravelmente entre os animais, caracterizando os ejaculados dos animais A1 e A3 como teratospérmicos (>40% de morfologia espermática normal – Wildt, 1994), e apresentando uma média geral de $60,75 \pm 10,24\%$ de células morfologicamente normais para as amostras avaliadas. Esses são semelhantes aos estudos de Morais *et al.* (2002) e Erdmann *et al.* (2006), que obtiveram, respectivamente, $59,2 \pm 3,5\%$ e $55,86 \pm 3,3\%$ de espermatozoides normais em tigrinas.

Dentre os defeitos identificados, foram observados os mais incidentes com anormalidades acrossomais ($3,25 \pm 0,85\%$), cabeças destacadas ($3,75 \pm 1,03\%$), peça intermediária dobrada ($8,25 \pm 4,55\%$) e cauda enrolada ($10,75 \pm 4,79\%$), concordando com estudo anterior de Swanson *et al.* (2003) na espécie. Além disso, esses autores relatam taxas ainda mais elevadas de defeitos espermáticos, atingindo $64,4 \pm 6,0\%$ de pleomorfismo. Assim, é evidente que a condição de teratospermia é prevalente em tigrinas.

Esses achados suscitam a possibilidade de uma estreita relação entre a consanguinidade e pleomorfia em felídeos, fenômeno já observado em populações isoladas de gatos domésticos (Pukazhenthil *et al.*, 2006) e leões (*Panthera leo*) (Wildt *et al.*, 1987; Wildt, 1994). Podemos levantar a hipótese de que a baixa variabilidade genética, provavelmente induzida pela fragmentação populacional de tigrinas devido ao declínio populacional e a fragmentação de habitats (Payan e Oliveira, 2016), contribua para um impacto prejudicial da qualidade seminal, inclusive pela expressão de genótipos deletérios para a morfologia espermática.

Barbosa *et al.* (2019) sugerem que a avaliação morfológica seja ainda mais precisa utilizando dados morfométricos em análises computadorizadas de sêmen, visando a otimização das técnicas de reprodução assistida por detectar mudanças sutis na estrutura celular. A partir de setups pré-definidos nesses softwares, é possível avaliar defeitos, como micro e macrocefalia, mesmo quando se apresentarem imperceptíveis à avaliação convencional. Ainda, Gutiérrez-Reinoso *et al.* (2016) mostram que esses dados morfométricos podem servir como marcadores biofísicos indicativos da maturação espermática. Para isso, a caracterização prévia dos parâmetros métricos celulares é essencial. No nosso estudo, a avaliação morfométrica permitiu uma definição precisa das medidas celulares fisiológicas.

No que se refere ao comprimento total dos espermatozoides, atingiu média consideravelmente menor ($29,50 \pm 0,10 \mu\text{m}$) que outros felídeos descritos, como o gato doméstico ($59,87 \pm 0,06 \mu\text{m}$ de comprimento – Barbosa *et al.*, 2019), e espécies selvagens, como a onça-pintada (*P. onca* – $59,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de comprimento – Silva *et al.*, 2019). Entretanto, é interessante notar que, apesar das diferenças no comprimento absoluto, as espécies felíneas

compartilham proporções semelhantes, em que a cauda representa $\frac{3}{4}$ do comprimento total do espermatozoide, assim como observado nas espécies mencionadas anteriormente.¹

A análise ultraestrutural, devido à sua marcante capacidade de resolução, enriquece significativamente nossa compreensão sobre a morfologia espermática (Silva *et al.*, 2009; Bezerra, 2018). Ramos (2013) defende que essa análise permite a identificação de características filogenéticas que auxiliam na classificação taxonômica ao caracterizar padrões espermáticos das diferentes espécies. De fato, observamos esse efeito, principalmente relacionado ao formato oval da cabeça espermática de tigrinas. Essa característica também foi observada em gatos domésticos (Schmehl e Graham, 1989), onças-pardas (*P. concolor* – Cucho *et al.*, 2016) e cheetah (*Acinonyx jubatus* – Wildt *et al.*, 1983), que compreendem a subfamília Felinae. Por outro lado, tigres-siberianos (*P. tigris altaica* – Schmehl e Graham, 1989) e onças-pintadas (*P. onca* – Silva *et al.*, 2019), ambos da subfamília Pantherinae, foram caracterizados com formato mais arredondado da cabeça espermática, sugerindo que essa morfologia esteja relacionada a proximidade filogenética.

Além disso, a abordagem eletromicroscópica também permitiu a identificação detalhada de defeitos espermáticos que haviam sido relatados na avaliação morfológica convencional em microscopia óptica. A aplicação dessa técnica revelou estruturas espermáticas que, até então, não haviam sido identificadas para a espécie pelas limitações metodológicas dos estudos anteriores. Essa identificação fornece informações valiosas para estudos prospectivos que possam avaliar a integridade dessas estruturas durante a aplicação de biotecnologias reprodutivas, como o processamento, refrigeração e congelamento dessas amostras.

Este estudo permitiu, portanto, o preenchimento de lacunas sobre a compreensão da fisiologia reprodutiva de *L. tigrinus*. No entanto, reconhecemos a complexidade do sistema reprodutivo em felídeos, e incentivamos investigações que explorem ainda mais profundamente a reprodução desses animais, especialmente com interesse na otimização de biotecnologias para conservação da espécie. O uso da ultrassonografia em modo-Doppler pode ser somatório aos resultados do nosso estudo e permitir novas noções na avaliação testicular da espécie. Além disso, a partir da descrição espermática realizada em detalhes, contribuimos com o oferecimento de dados que podem ser futuramente utilizados como referencial de parâmetros fisiológicos da espécie para embasar estratégias de conservação ainda mais eficazes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo, foi possível obter dados reprodutivos referentes à biometria testicular e às características espermáticas de *Leopardus tigrinus*, especialmente no contexto do bioma Caatinga. A aplicação da ultrassonografia testicular na espécie permitiu a avaliação do parênquima testicular e a mensuração biométrica. Contribuímos para a definição de parâmetros morfológicos e morfométricos dos espermatozoides da espécie, a partir dessa descrição. Em adição, a eletromicroscopia de varredura permitiu a caracterização da ultraestrutura espermática, visualizando regiões imperceptíveis a outros métodos de avaliação convencionais. Portanto, contribuímos para a compreensão da morfofisiologia reprodutiva desse felídeo ecologicamente vulnerável, sendo este um avanço fundamental para a implementação e otimização de biotecnologias reprodutivas como estratégia de conservação da espécie.

REFERÊNCIAS

- ANGRIMANI, D. S. R.; BARROS, P. M. H.; LOSANO, J. D. A.; CORTADA, C. N. M.; BERTOLLA, R. P.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; CORREA, S. H. R.; BARNABE, V. H.; NICHI, M. Effect of different semen extenders for the storage of chilled sperm in Tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v.89, p.146-154, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.015>
- ARAÚJO, G. R.; JORGE-NETO, P. N.; CSERMAK-JR, A. C.; PIZZUTTO, C. S.; LUCZINSKI, T. C.; DECO-SOUZA, T. Avanços na andrologia de grandes felinos neotropicais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.45, n.4, p.219-228. 2021. <http://dx.doi.org/10.21451/1809-3000.rbra2021.028>.
- ARAUJO, G. R.; PAULA, T. A. R.; DECO-SOUZA, T.; MORATO, R. G.; BERGO, L. C. F.; SILVA, L. C.; COSTA, D. S.; BRAUD, C. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. **Animal Reproduction Science**, v.195, p.1-7, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.019>.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIME, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.145-151, 2011. <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n2/RB385%20Arruda%20145151.pdf>.
- AXNÉR, E.; FORSBERG, C. L. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: A retrospective study. **Reproduction in Domestic Animals**, p.282-291, 2007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00780.x>.
- BALARINI, M. K.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; PEIXOTO, J. V.; GUIÃO-LEITE, F. L.; ROSSI JÚNIOR, J. L.; CZERMAK JUNIOR, A. C.; WALKER, N. J. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775). **Theriogenology**, v.77, n.5, p.873-880, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.011>.
- BARBOSA, B. S. **Criopreservação e morfometria dos espermatozoides epididimários de gato doméstico**. 2019. 109p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2019.
- BARBOSA, B. S.; SILVA, H. V. R.; TABOSA, B. E. A.; NUNES, T. G. P.; MAGALHÃES, F. F.; SILVA, L. D. M. Morphological and morphometric characterization of domestic cat epididymal sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, n.12, p.1-7, 2019. <https://doi.org/10.1111/rda.13572>

BAUDI, D. L.; JEWGENOW, K.; PUKAZHENTHI, B. S.; SPERCOSKI, K. M.; SANTOS, A. S.; REGHELIN, A. L.; CANDIDO, M. V.; JAVOROUSKI, M. L.; MÜLLER, G.; MORAIS, R. N. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v.69, n.2, p.204-11, 2008. <http://10.1016/j.theriogenology.2007.09.013>.

BELLANI, G. G. Subfamily Felinae. In: **Felines of the World**. Elsevier, 2020, p.145-308. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-816503-4.00005-2>.

BERGER, H.; PAZ, R. C. R.; ZÜGE, R. M.; MORATO, R. G.; NUNES, A. L. V.; TEIXEIRA, R. H. F. Ultra-sonografia no auxílio diagnóstico de alterações testiculares em onça pintada (*Panthera onca*). In: **Anais**. São Pedro: ABRAS. 1999.

BEZERRA, L. G. P. **Descrição ultraestrutural de espermatozoides a fresco e criopreservados de catetos (Pecari tajacu Linnaeus, 1758)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

CARNEIRO, R. M.; BRANCO, É.; PINHEIRO, L. L.; MARTINS, D. M.; BRÍGIDA, S. S.; ARAÚJO, E. B.; SOUZA, A. C. B.; PEREIRA, L. C.; LIMA, A. R. Descrição morfológica do sistema reprodutor masculino de jaguatirica (*Leopardus pardalis*). **Biotemas**, p.83-89, 2010. <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n4p83>.

CEREGATTI, G.; FEITOSA, W. B. Male reproductive physiology of neotropical felids. **Theriogenology Wild**, v.2, p.100023, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.therwi.2023.100023>.

CHRISTIANSEN, I. J. **Reproduction in Dog and Cat**. London: Balilieri Tindall, 1988.

COSTA, B. B.; POVH, J. A.; SANCHES, E. A.; SPICA, L. N.; RODRIGUES, R. B.; TEIXEIRA, N. S.; FRANÇA, T. S.; BENATO, J. L.; MACHADO, T. L. F.; BRASILEIRO, L. O. Characterization of sperm quality in *Brycon hilarii*: how does morphology affect sperm movement?. **Theriogenology Wild**, v.1, p.100007, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.therwi.2022.100007>.

DALIA, K.; ALI, K.; GHINA, G. The Developmental Process of Spermatogenesis. **Journal of Andrology & Gynaecology**, v.7, n.1, 3p., 2019.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras: Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DEVKOTA, B.; KOSEKI, T.; MATSUI, M. *et al.* Relationships among age, body weight, scrotal circumference, semen quality and peripheral testosterone and estradiol concentrations in pubertal and postpubertal Holstein bulls. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.70, n.1, p.119-121, 2008.

ELLENPORT, C. R. Aparelho urogenital geral. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p.139.

ERDMANN, R. H.; JUVENAL, J. C.; MORAES, W.; CUBAS, P.; CARVALHO, A. L.; MOREIRA, N. Exame reprodutivo em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775). **Archives Of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.75-79. 2005. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v10i2.4420>.

FURTHNER, E.; CORDONNIER, N.; DUDAL, M. L.; FONTBONNE, A.; FREICHE, V. Is electroejaculation a safe procedure in cats? An endoscopic and histological prospective blinded study. **Theriogenology**, v.119, p.69-75, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.013>.

GOULETSOU, P. G.; GALATOS, A. D.; LEONTIDES, L. S. Comparison between ultrasonographic and caliper measurements of testicular volume in the dog. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p.1-12. 2008.

HOWARD, J. G.; BROWN, J. L.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoa motility and morphology after swim up processing. **Journal of Andrology**, v.11, p.204–215. 1990. <http://10.1002/j.1939-4640.1990.tb03229.x>

HUDA, W.; SLONE, R. Ultrasound, in Review of Radiologic Physics. 2 ed. Philadelphia: **Editora Lippincot Williams & Wilkins**, p. 178, 2003.

JEWGENOW, K.; PUKAZHENTHI, B. S.; SCHOEN, J. Analysis of Sertoli cell efficiency allows the differentiation between two fundamentally different forms of feline teratospermia. **Theriogenology**, v.79, p.261-266. 2013

JOHNSON, A. K. Assisted Reproduction in the Male Cat. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.48, n.4, p.511-521, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.001>.

JOHNSTON, L. A.; ARMSTRONG, D. L.; BROWN, J. L. Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (*Panthera uncia*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, p.229-236, 1994.

JÚNIOR, J. Y. H. **Identificação de áreas adequadas para a conservação de felinos neotropicais na Mata Atlântica**. 2023. 76p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2023.

KITCHENER, A. C.; BREITENMOSER-WÜRSTEN, C. H.; EIZIRIK, E.; GENTRY, A.; WERDELIN, L.; WILTING, A.; YAMAGUCHI, N.; ABRAMOV, A. V.; CHRISTIANSEN, P.; DRISCOLL, C.; DUCKWORTH, J. W.; JOHNSON, W.; LUO, S. J.; MEIJAARD, E.; O'DONOGHUE, P.; SANDERSON, J.; SEYMOUR, K.; BRUFORD, M.; GROVES, C.; HOFFMANN, M.; NOWELL, K.; TIMMONS, Z; 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, 2017. 80p.

LAMBERT, B. The frequency of mumps and of mumps orchitis and the consequences for sexuality and fertility. **Acta Genetica et Statistica Medica**, v.2, p.1-166, 1951.

LIMA, D. B. C.; SILVA, T. F. P.; CORTEZ, A. A.; PINTO, J. N.; MAGALHÃES, F. F.; CALDINI, B. N.; SILVA, L. D. M. Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, p.873–881, 2016. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8653>

MACHADO, A. S. D.; BAS, A. L.; MIGLINO, M. A.; LEISER, R.; PAPA, P. C. Genital morphology of the male South American fur seal (*Arctocephalus australis*) and biological implications. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.1, p.67-78. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2012001300013>.

MACHADO, L. C.; ORLANDIN, J. R.; KARAM, R. G.; RÓS, F. A.; MARTINS, D. S.; COSTA, G. M.; AMBRÓSIO, C. E.. Morphology of male and female reproductive tract of the ocelot (*Leopardus pardalis*). **Animal Reproduction**, v.17, n.2, p.1-12, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0010>.

MADRIGAL-VALVERDE, M.; BITTENCOURT, R. F.; FILHO, A. L. R.; LENTS, M. P.; AZEVEDO, M. C.; BARRETO, R. O.; TEIXEIRA, N. A.; MATTOS, P. M. S.; CURVELO, V. P.; GOMES, M. C.; DANTAS, V.; ARAUJO, G. R.; VALVERDE-ABARCA, A. Biometria testicular y características seminales en felinos neotropicales (Carnivora: Felidae) sometidos a cateterismo uterino. **Revista de Biología Tropical**, v.67, n.4, p.975-988, 2019.

MEHANNA, M.; FERREIRA, A. L. S.; FERREIRA, A.; PAZ, R. C. R.. Morphology of the testes and epididymal ducts in the pampas cat *Leopardus colocolo* (Molina, 1782). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.10, p.1014-1020, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2016001000016>.

MEKASHA, Y.; TEGEGNE, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of supplementation with agro-industrial by-products and khat (*Catha edulis*) leftovers on testicular growth and sperm production in Ogaden bucks. **Journal of Veterinary Medicine A**, v.54, p.147-155, 2007.

MORAIS, R. N.; MUCCIOLO, R. G.; GOMES, M. L.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L. H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, n.8, p.2027-41, 2002. [https://10.1016/s0093-691x\(02\)00707-0](https://10.1016/s0093-691x(02)00707-0).

MOREIRA, N. Desafios na andrologia de espécies selvagens, com ênfase em felídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.47, n.3, p.536-543, 2023.

MOREIRA, N.; BROWN, J. L.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, v.26, n.6, p.441-460. 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/zoo.20139>.

MORETTI, E.; SUTERA, G.; COLLODEL, G. The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: diagnostic applications and basic research. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v.62, n.3, p.171-183. 2016. <http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2016.1155242>.

MOTTA, M. C.; REIS, N. R. Elaboração de um catálogo comportamental de gato-do-mato-pequeno, *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) (Carnivora: Felidae) em cativeiro. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, p.165-171, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032009000300017>

MULLER-FILHO, J. C. 2000. **Análise da dieta de felídeos (Carnivora: Mammalia) no Parque Estadual Pico do Marumbi – Paraná**. 2000. 31 p. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2000.

NASCIMENTO, F. O.; FEIJÓ, A. Taxonomic revision of the tigrina *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) species group (Carnivora, Felidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.57, n.19, p.231-264. 2017. <http://dx.doi.org/10.11606/0031-1049.2017.57.19>.

NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; BLOTTNER, S.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B. S. Quantity rather than quality in teratospermic males: A histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis Catus*). **Biology of Reproduction**, v.71, n.5, p.1517-1524, 2004. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.104.031062>.

NUÑEZ-FAVRE, R. *et al.* Effect of Natural Photoperiod on Epididymal Sperm Quality and Testosterone Serum Concentration in Domestic Cat (*Felis silvestris catus*). **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.232-234, 2012.

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; MOURA, A. A. A.; ARAUJO, A. A. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.3, p.862–869, 2009.

OLIVEIRA, T.; TORTATO, M. A.; ALMEIDA, L. B.; CAMPOS, C. B.; BEISIEGEL, B. M. Avaliação do risco de extinção do Gato-do-mato *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v.3, n.1, p.56-65, 2013.

PALTIEL, H. J.; DIAMOND, D. A.; CANZIO, J. D.; ZURAKOWSKI, D.; BORER, J. G.; ATALA, A. Testicular volume: comparison of orchidometer and US measurement in dogs. **Radiology**, v.222, p.114-119. 2002.

PAYAN, E.; OLIVEIRA, T. Northern Tiger Cat: *Leopardus tigrinus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**, 2016. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T54012637A50653881.en>

PEIXOTO, G. C. X. **Biometria testicular e suas correlações com a avaliação de parâmetros seminais de catetos (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758)**. 2011, 98p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

PEIXOTO, G. C. X.; LIRA, R. A.; ALVES, N. D.; SILVA, A. R. Bases da formação da imagem ultrassonográfica. **Acta Veterinaria Basílica**, v.4, n.1, p.15-24. 2010.

PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, M. A.; CASTELO, T. S.; SILVA, A. M.; BEZERRA, J. A. B.; SOUZA, A. L. P.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Individual variation related to testicular biometry and semen characteristics in collared peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). **Animal Reproduction Science**, v.134, n.3-4, p.191-196, 2012.

PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, M. A.; LIMA, G. L.; CAMPOS, L. B.; PAIVA, A. L. C.; PAULA, V. V.; RICARTE, A. R. F.; SILVA, A. R.. Use of Non-invasive Methods for Evaluating the Testicular Biometry in Collared Peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.45, n.1, p.60-66. 2015.
<http://dx.doi.org/10.1111/ahe.12171>.

PINEDA, M. H.; DOOLEY, M. P. Effects of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.8, p.1520-5, ago. 1984. PMID: 6476564.

PINTO, G. C. C. B. **Fisiologia espermática de felídeos neotropias**: revisão bibliográfica. 2020. 55p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do ABC, Santo André, 2020.

PRADER A. Testicular size: assessment and clinical importance. **Triangle**, v.7, p.240–243, 1966.

PUKAZHENTHI, B. S.; NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; HOWARD, J.; WILDT, D. E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. **Theriogenology**, v.66, n.1, p.112-121, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.020>.

QUEIROZ, J. P. A. F.; BARROS, F. F. P. C.; LIMA, G. L.; CASTELO, T. S.; FREITAS, C. I. A.; SILVA, A. R. Assessment of Orchidometry and Scrotal Circumference in Coatis (*Nasua nasua*). **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.6, p.e382-e386, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01582.x>.

QUINTELA A. T.; OLIVEIRA I. R. S.; SOUZA A. O.; GUSMÃO A. L.; SILVA A. R. Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. **Animal Reproduction**, v.7, n.2, p.70-74, 2010.

RAMOS, T. M. **Potencialidades da microscopia eletrônica (transmissão e varredura) e microscopia confocal como ferramentas para análises de amostras biológicas**. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

REDFORD, K. H. A floresta vazia. 1:1-22 In: VALLADARES PÁDUA, C.; BODMER, R. E.; CULLEN, J. R. **Manejo e conservação de vida silvestre no Brasil**. Belém, PA: Sociedade Mamirauá, 1997. p.296.

REGE, J.E.; TOE, F.; MUKASA-MUGERWA, E.; TEMBELY, S.; ANINDO, D.; BEKER, R.L.; LAHLOU-KASSI, A. Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep. II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. **Small Ruminant Research**, v.37, p.173–187, 2000.

RIVKEES, S. A.; HALL, D. A.; BOEPPLE, P. A.; CRAWFORD, J. D. Accuracy and reproducibility of clinical measures of testicular volume. **Clinical and laboratory observations**, v.110, n.6, p. 914-917. 1987.

ROCHA, E.; TÁVITA, N.; FREITAS, R.; DINIZ, J. A. R. A.; SANTOS, J. R. S.; MENEZES, D. J. A. Anatomia macroscópica dos órgãos reprodutores do *Puma yagouaroundi* (Geoffroy, 1803) macho. **Pubvet**, v.11, n.8, p.767-770, 2017.
<http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v11n8.767-770>.

SANTOS, M. V. O.; SILVA, H. V. R.; BEZERRA, L. G. P.; OLIVEIRA, L. R. M.; OLIVEIRA, M. F.; ALVES, N. D.; SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F. Heterologous in vitro fertilization and embryo production for assessment of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) frozen-thawed semen in different extenders. **Animal Reproduction**, v.19, n.1, p.1-11, 2022. <http://dx.doi.org/10.1590/1984-3143-ar2021-0093>.

SANTOS, R. P.; SILVA, A. R. Biobancos para a conservação da vida silvestre: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.46, n.4, p.413-430, 2022.
<https://10.0.83.203/1809-3000.RBRA2022.042>

SCHMEHL, M. L.; GRAHAM, E. F. Ultrastructure of the domestic tom cat (*Felis domestica*) and tiger (*Panthera tigris altaica*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 31, n.4. 1989.

SILVA, A. R.; FONTENELE-NETO, J. D.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M.; CHINIRÉA, V. H.; LOPES, M. D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.595–601. 2009.

SILVA, H. V. R.; MAGALHÃES, F. F.; RIBEIRO, L. R.; SOUZA, A. L. P.; FREITAS, C. I. A.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Morphometry, morphology and ultrastructure of ring-tailed coati sperm (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766). **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.945–951, 2015. <https://doi.org/10.1111/rda.12613>

SILVA, H. V. R.; NUNES, T. G. P.; RIBEIRO, L. R.; FREITAS, L. A.; OLIVEIRA, M. F.; NETO, A. C. A.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Morphology, morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v.203, p.84-93, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.011>

SWANSON, W. F.; BROWN, J. L.; WID, D. E. Influence of seasonality on reproductive traits of the male pallas' cat (*Felis manul*) and implications for captive management. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.27, n.2, p.234-240, 1996.

SWANSON, W. F.; JOHNSON, W. E.; CAMBRE, R. C.; CITINO, S. B.; QUIGLEY, K. B.; BROUSSET, D. M.; MORAIS, R. N.; MOREIRA, N.; O'BRIEN, S. J.; WILDT, D. E. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **Zoo Biology**, v.22, n.5, p.421-441, 2003.
<http://dx.doi.org/10.1002/zoo.10093>.

TEBET, J. M.; SOUZA, F. F.; MARTINS, M. I. M.; CHIRINÉA, V. H.; CARVALO, J. C.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D. Assessment of thawed sperm quality from feline species: Ocelot (*Leopardus pardalis*) and oncilla (*Leopardus guttulus*). **Theriogenology**, v. 117, p.56-62. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.10.004>

TOMA, H. E. **Nanotecnologia molecular – materiais e dispositivos**. São Paulo: Blucher, 2016.

TORRES, D. F.; OLIVEIRA, E. S.; ALVES, R. R. N. Understanding Human – Wildlife Conflicts and Their Implications. **Ethnozology**, p.421-445, 2018.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-809913-1.00022-3>.

TRAUTWEIN, L. G. C.; MARTINS, M. I. M. Ultrassonografia em modo B e Doppler para avaliação reprodutiva de cães e gatos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.45, n.4, p.574-582. 2021. <http://dx.doi.org/10.21451/1809-3000.rbra2021.077>.

TÚNEZ, J. I.; NARDELLI, M.; IBÁÑEZ, E. A.; PERALTA, D. M.; BYRNE, M. S. A Review of the Conservation Status of Neotropical Mammals. In: NARDELLI, M.; TÚNEZ, J. I. **Molecular Ecology and Conservation Genetic of Neotropical Mammals**. Switzerland: Springer, 2021. p.13.

VIDOLIN, G. P. **Aspectos bio-ecológicos de *Puma concolor* (Linnaeus, 1771), *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) e *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) na Reserva Natural Salto Morato, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil**. 2004. 89p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

VILLAYERDE, A. I. S. B.; MELO, C. M.; CORRENTE, J. E.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D. Comparação entre dois métodos de coloração para análise morfológica e acrossomal de espermatozoides de gato doméstico (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.686-692. 2008.

WILD, D. E. Strategies for the Practical Application of Reproductive Technologies to Endangered Species. **Zoo Biology Supplement**, v.1, p.17-20, 1989.

WILDT, D. E. Endangered species spermatozoa: diversity, research, and conservation. In: BARTKE, A. **Function of somatic cells in the testis**. New York: Springer-Verlag. 1994.

WILDT, D. E.; BUSH, M.; HOWARD, J. G.; O'BRIEN, S. J.; MELTZER, D.; VAN DYK, A.; EBEDES, H.; BRANDES, D. J. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v.29, p.1019–1025, 1983. <https://doi.org/10.1095/biolreprod29.4.1019>.

WILDT, D. E.; BUSH, M.; HOWARD, J. G.; O'BRIEN, S. J.; MELTZER, D.; VAN DYK, A.; EBEDES, H.; BRAND, D. J. Unique seminal quality in the South African Cheetah and a Comparative Evaluation in the Domestic Cat. **Biology of Reproduction**, v.29, p.1019-1025. 1983.

WILDT, D. E.; HOWARD, J. G.; HALL, L. L.; BUSH, M. Reproductive physiology of the clouded leopard: I. Electroejaculates contain high proportions of pleiomorphic spermatozoa throughout the year. **Biology of Reproduction**, v.34, n.5, p.937–947, 1986.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod34.5.937>

WILDT, D.; BUSH, M.; GOODROWE, K. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. **Nature**, v.329, p.328–331. 1987.
<https://doi.org/10.1038/329328a0>

ZAMBELLI, D., CUNTO, M., PRATI, F., AND MERLO, B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. **Theriogenology**, v.68, p.796-803. 2007.
<http://10.1016/j.theriogenology.2007.06.008>

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Semen Collection and Evaluation. **Feline Reproduction**, p.167-177. 2022. <http://dx.doi.org/10.1079/9781789247107.0018>.

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Semen collection in cats: techniques and analysis. **Theriogenology**, v.66, n.2, p.159-165. 2006.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.054>.

ZAMBELLI, D.; PRATI, F.; CUNTO, M.; IACONO, E.; MERLO, B. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. **Theriogenology**, v.69, n.4, p.485-490. 2008.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.019>.