

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA

**Características seminais de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*,  
Linnaeus, 1766).**

JAQUELINE CANDIDO DE CARVALHO

BOTUCATU - SP  
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DEPARTAMENTO  
DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA

**Características seminais de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*,  
Linnaeus, 1766).**

JAQUELINE CANDIDO DE CARVALHO

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Estadual Paulista “Julio de  
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para  
Exame Geral de Defesa de Mestrado junto  
ao Programa de Pós-Graduação em Animais  
Selvagens para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

**Coorientador:** Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

BOTUCATU - SP  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho, Jaqueline Candido de.

Características seminais de cachorro-do-mato(*Cerdocyon thous*) / Jaqueline  
Candido de Carvalho. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita  
Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Roberto Teixeira Coorientador: João  
Carlos Pinheiro Ferreira Capes: 50504002

1. Cães - Reprodução. 2. Reprodução animal. 3. Sêmen - Criopreservação.
4. Ultrassonografia veterinária.
5. Preservação do sêmen.

Palavras-chave: *Cerdocyon thous*; Reprodução animal; Sêmen.

Nome do Autor: Jaqueline Candido de Carvalho

Título: Características seminais de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*,  
Linnaeus, 1766).

#### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Nei Moreira

Membro do Departamento de Biociências

Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Palotina/PR

Data da defesa: 24 de setembro de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me guiar, me dando força para nunca desistir do meu sonho, colocando sempre pessoas maravilhosas em meu caminho.

Ao meu filho Vinicius que compreendeu a distância e mesmo longe torce por mim.

Ao amado companheiro Claudionor que apesar da dificuldade da distância física, dos contratempos enfrentados, decidiu ficar, me apoiar e me amar, sempre expressando seu orgulho e admiração.

Aos meus pais Reginaldo e Conceição que sempre me apoiaram e me incentivaram a buscar minha felicidade, sendo um exemplo de perseverança e plasticidade diante da vida.

Ao meu irmão Cleverson e sua companheira Tatiane que torcem pelo sucesso de minha empreitada, sabendo que não seria fácil, principalmente financeiramente.

Ao meu querido orientador e professor Dr. João que foi um pai, sempre sanando minhas dúvidas dedicando-se com paciência e carinho, aos conhecimentos compartilhados, não teria ninguém melhor para pegar na minha mão e me conduzir tão bem durante estes anos, obrigada por estar aqui sempre que precisei, você foi e sempre será um mestre, uma figura inspiradora com seu amor à docência transmitido a cada ensinamento, serei sempre uma grande admiradora. Obrigada por me conduzir.

Ao amigo e parceiro de trabalho Fernando que sempre esteve ao meu lado durante o experimento a paciência, dedicação e apoio aplicado, tornando o experimento mais leve e divertido, pela grande amizade regada a risadas e sorvete.

À Professora Dra. Fabiana, pela atenção e disponibilidade em responder meus questionamentos, pelo aceite em compor a banca, aos conhecimentos acrescentados na qualificação. Espero ainda aprender muito com a Dra.

À amiga Laíza pela disposição e carinho em auxiliar sempre que precisei e pelas risadas inconfundíveis.

Às amigas Ana Claudia Albuquerque e Luana Shaade pelo auxílio, leitura e sugestões durante a jornada.

Ao Professor Dr. Papa por permitir a utilização do seu laboratório para a realização de minhas análises, pela paciência em auxiliar esclarecendo minhas dúvidas e pelo tempo disponibilizado em observar minhas amostras, sempre que necessário.

Aos colegas Verônica e Lucas por auxiliar nas leituras de microscopia de luz de contraste diferencial (DIC) pelo ao tempo dispendido.

Aos colegas que fiz durante este tempo na Universidade pelas palavras de apoio e pelos momentos de descontração.

Ao Professor Dr. Nei, pelo aceite em compor a banca, seus conhecimentos serão muito importantes e enriquecedores.

A todos os departamentos e funcionários que sempre me acolheram amavelmente.

Agradeço principalmente ao Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens, seus residentes e estagiários, pela cortesia, pela disponibilidade para as avaliações ultrassonográficas e pelos animais, e ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo acolhimento de todos que fazem parte do quadro de funcionários.

Aos animais que contribuíram para que o experimento fosse realizado.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código do Financiamento 001”.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura. 1.** Posicionamento do transdutor durante avaliação ultrassonográfica dos testículos de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) .....21
- Figura. 2.** Morfologia espermática de cachorro-do-mato (*C. thous*) mostrada com microscopia de luz de contraste de interferência diferencial.....26
- Figura. 3.** Morfologia espermática de cachorro-do-mato (*C. thous*) observada pelo método de Karras modificado .....27
- Figura. 4.** Avaliação ultrassonográfica em Modo B, dos testículos de cachorro-do-mato (*C. thous*) .....28
- Figura. 5.** Avaliação ultrassonográfica da próstata de cachorro-do-mato (*C. thous*).....29
- Fig. 1** Avaliação ultrassonográfica testicular de cachorro-do-mato (*C. thous*), modo Triplex doppler... .....30

### CAPÍTULO 3

- Figura. 1.** Eixo Hipotálamo-hipófise-gonadal, inibição hormonal diante do estresse. Adaptado de [60].....51

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> Valores individuais e médios (EPM) das características seminais de cachorro-do-mato ( <i>C. thous</i> ).....	24
<b>Tabela 2</b> Valores médios (EPM) dos defeitos morfológicos espermáticos de cachorro-do-mato ( <i>C. thous</i> ) avaliados pelo método Karras modificado ou em preparação úmida sob microscopia de luz de contraste de interferência diferencial (DIC).....	25
<b>Tabela 3</b> Dimensões individuais e médias (EPM) da próstata de cachorro-do-mato ( <i>C. thous</i> ) mensuradas por ultrassonografia modo B.....	29
<b>Tabela 4</b> Valores médios (EPM) dos índices Dopplerfluxométricos, observados nos testículos de cachorro-do-mato ( <i>C. thous</i> ).....	29
ANEXOS	
<b>Tabela 1</b> Resultados individuais e médios (EPM), das características seminais de cachorro do mato ( <i>C. thous</i> ), avaliados pelo Computer - Assisted - Sperm Analysis – CASA.....	65

**SUMÁRIO**

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
CAPÍTULO 1.....	10
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	11
CAPÍTULO 2.....	14
TRABALHO CIENTÍFICO.....	15
1. Introdução.....	17
2. Material e Métodos.....	18
2.1. Animais.....	18
2.2. Condicionamento dos animais à colheita seminal por manipulação digital do pênis.....	18
2.3. Análise seminal.....	19
2.4. Morfometria espermática.....	20
2.5. Avaliação ultrassonográfica dos testículos e próstata.....	20
3. Resultados.....	22
4. Discussão.....	30
Referências.....	36
CAPÍTULO 3.....	44
REVISÃO DE LITERATURA.....	45
5.1. <i>Cerdocyon thous</i> .....	45
5.2. Conservação dos canídeos silvestres.....	46
5.3. Biotécnicas aplicadas em canídeos selvagens.....	47
5.4. Colheita de sêmen em canídeos silvestres.....	48
5.4.1. Sazonalidade.....	48
5.4.2. Cativoiro, estresse e dominância.....	50
5.4.3. Eletroejaculação.....	52
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS.....	64

CARVALHO, J.C. **Características seminais de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). Botucatu, 2019.** 70p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O cão selvagem *Cerdocyon thous*, mais conhecido como cachorro-do-mato, estão suscetíveis a problemas como predação, caça e atropelamentos. A colheita e criopreservação do sêmen torna-se uma técnica auxiliar para a conservação *ex situ*, para tanto, estudos iniciais de caracterização seminal devem ser desenvolvidos. Esta espécie pode servir como modelo para espécies seriamente ameaçadas. O objetivo do trabalho foi realizar a colheita de sêmen por estimulação digital do pênis após o condicionamento dos animais, relatar as características seminais para a espécie, mensurar volume testicular e dimensões da próstata por ultrassom, além de relatar parâmetros Dopplerfluxométricos. Utilizamos machos adultos, (n=5), com idade média de 3 anos, (variando de 2 a 5 anos), pesando em média ( $\pm$  DP) 7 kg mantidos em cativeiro. O condicionamento teve início em maio de 2018, sendo que foram utilizados 13 ejaculados para as avaliações. Média e desvio padrão foram calculados. Com volume médio de  $463,8 \pm 164,9 \mu\text{L}$  e concentração de  $393,2 \pm 49,5 \times 10^6$  espermatozoides/mL, motilidade total  $68,0 \pm 1,7\%$ , progressiva  $48,8 \pm 1,4\%$  e rápidos  $57,2 \pm 1,9\%$ . Na avaliação morfológica foi encontrada alta prevalência de defeitos de cabeça (acrossomo, pequena anormal, diadema *defect* e formas teratológicas). O volume testicular  $2,2 \text{ cm}^3 (\pm 0,2)$  para o testículo esquerdo e  $2,1 \text{ cm}^3 (\pm 0,2)$  testículo direito, próstata com dimensão crâniocaudal e dorsoventral respectivamente,  $2,3 \text{ cm} (\pm 0,2)$  e  $1,5 \text{ cm} (\pm 0,1 \text{ cm})$ . Na avaliação ultrassonográfica modo Triplex *doppler*, a velocidade do pico sistólico (VPS) com maior média na artéria supra testicular e menor na artéria intratesticular. Concluímos que o condicionamento de *C. thous* à colheita de sêmen por estimulação digital do pênis é possível, o método é eficiente para a espécie, proporciona amostras viáveis, passíveis de avaliação; a técnica da ultrassonografia mostrou-se apropriada para as mensurações testiculares e prostáticas, a técnica ultrassonográfica modo Doppler foi capaz de identificar e mensurar o fluxo sanguíneo das artérias de interesse.

**Palavras chave:** *Cerdocyon thous*, Reprodução animal, Ultrassonografia, Sêmen, Condicionamento animal.

CARVALHO, J.C. **Seminal characteristics of crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). Botucatu, 2019.** 70p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

### ABSTRACT

The crab-eating fox *Cerdocyon thous*, known as the forest fox, is susceptible to problems such as predation, hunting and running over. Semen collection and cryopreservation becomes the main technique used for ex situ conservation. Therefore, initial studies of seminal characterization should be developed. This species can serve as a model for seriously threatening species. The objective of this study was to collect semen by digital penis stimulation after animal conditioning, to report seminal characteristics for the species, measure testicular volume and prostate dimensions by ultrasound, and report Triplex *doppler* velocometric parameters. We used 5 animals, males, adults, weighing 7 kg on average kept in captivity. The conditioning began in May 2018, 35 ejaculates were obtained, but just 13 were used for the evaluations. The results were expressed as average and standard error. The ejaculates presents 463.8 $\mu$ L  $\pm$ 164.9 of average volume, average concentration of 393.2  $\pm$ 49.5 x 10<sup>6</sup> / mL, total motility average, progressive and rapid of 68  $\pm$ 1.7%; 48.8  $\pm$ 1.4%; 57.2  $\pm$ 1.9% respectively. In the morphological evaluations, high prevalence of defects were observed (acrosomal injury, small abnormality and teratological forms). The testicular volume was 2.2  $\pm$ 0.2 cm<sup>3</sup> for the left testis and 2.1  $\pm$ 0.2 cm<sup>3</sup> right testis, prostate with cranio-caudal and dorsoventral dimensions respectively, 2.3  $\pm$ 0.2 and 2.1  $\pm$ 0.2cm. At Triplex *doppler* ultrasound evaluation, systolic peak velocity (SPV) with a higher mean in the supra-testicular artery and lower in the intratesticular artery, both in the right testis. We conclude that conditioning *C. thous* and of seed crops by digital penis stimulation is possible, the method is efficient for one species, provides viable, testable samples; An ultrasound technique proved to be adjustable for testicular and prostate measurements, The Triplex *doppler* ultrasound technique was able to measure the blood flow of the arteries of interest.

**Keywords:** *Cerdocyon thous*, Animal reproduction, Ultrasound, Semen, Conditioning animal.

# **CAPÍTULO 1**

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Pertencente à subfamília Caninae, o *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766), é conhecido popularmente como cachorro-do-mato, lobete, lobinho, graxaim, graxaim do mato, raposinha-do-mato, raposão, guaraxo, guancito, fusquinho e rabo-fofo [1].

O *C. thous* é considerado um canídeo de porte médio monogâmico, organizado em uma sociedade facultativamente cooperativa, associado a auxiliares, formando um grupo social estendido [2]. Após os filhotes chegarem à idade adulta e se dispersarem do grupo, ainda circulam pelo mesmo território, indicando que o contato com os ancestrais é mantido [2].

Considerada uma espécie endêmica na América do Sul, habita vários biomas e tem facilidade de adaptação. A perda de habitat e a facilidade de obtenção de alimento em áreas urbanas, tem aproximado a espécie das residências e dos animais domésticos, ficando suscetível a problemas como predação, caça, disputas por alimentos com cães domésticos, e suscetibilidade às enfermidades de cães domésticos [1,3].

Além de ser a espécie mamífera mais atropelada no Brasil [4,5], o cachorro-do-mato sofre ainda com a caça na região da caatinga, onde por credence popular sua gordura é utilizada para o tratamento de prolapso uterino em animais de produção [1,4,6]. Apesar de não estar na lista dos animais ameaçados de extinção [3] o número de indivíduos da espécie vem decrescendo progressivamente em várias áreas do Brasil [5,7], e parece ser apenas uma questão de tempo o declínio da sua população [8], sendo importante o desenvolvimento de medidas de conservação [9].

Desta forma, as biotécnicas reprodutivas são importâtes para o manejo genético de populações selvagens, pois permitem a troca de material genético entre populações de vida livre e de cativeiro aumentando variabilidade genética das populações [8,10,11]. Neste contexto, estabelecer métodos de eficientes de criopreservação do seminal e inseminação artificial é fundamental para a manutenção das espécies [11–13]. No entanto, devido à pouca disponibilidade de informações básicas sobre a anatomia e biologia reprodutiva das espécies selvagens, o uso de biotécnicas de reprodução assistida ainda é complexo [14].

A colheita do sêmen nos animais selvagens exige a utilização de protocolos anestésicos que permitam a manipulação segura do macho durante os procedimentos de eletroejaculação [15]. Um dos obstáculos enfrentados neste método em canídeos, é a contaminação do ejaculado com urina [16] que, por sua característica físico-química, torna o meio inviável para a sobrevivência dos espermatozoides, por danificar irreversivelmente as membranas espermáticas [15,17–19].

Diversas estratégias vêm sendo utilizadas na tentativa de minimizar a contaminação do ejaculado dos animais selvagens por urina. Entre estas, destacam-se a busca por protocolos anestésicos específicos [17], o posicionamento restrito da probe na ampola retal na região dorsal à próstata [20,21], o uso de aparelhos de eletroestimulação capazes de emitir correntes elétricas de estimulação contínua (onda senoidal) ou alternadas (onda quadrática) [22] e o protocolo de eletroestimulação espécie específico [19,23].

Embora existam relatos de sucesso na obtenção de amostras seminais adequadas em algumas espécies selvagens [24], até o presente momento essa não é a realidade de muitos canídeos selvagens, incluindo o cachorro-do-mato. Apesar de existir um relato de colheita seminal com relativo sucesso nessa espécie, as amostras obtidas nesse estudo estavam contaminadas por urina e os escassos espermatozoides obtidos, que se encontravam imóveis, só puderam ser avaliados do ponto de vista morfológico [16], o que nestas condições tem valor questionável.

O insucesso dos protocolos utilizados nas tentativas de colheita seminal por eletroejaculação em canídeos selvagens vem estimulando a busca por procedimentos alternativos. Devido à facilidade de manejo e à relativa docilidade desses animais, a colheita seminal por estimulação digital do pênis, tradicionalmente empregada nos canídeos domésticos, vem sendo testada em canídeos silvestres [25,26]. Este procedimento já foi aplicado com sucesso em lobos-guará, que após serem condicionados à contenção física, ejacularam por meio da estimulação digital do pênis [25,26].

Além da colheita e avaliação do sêmen, o estudo ultrassonográfico dos órgãos reprodutivos, podem contribuir para o estudo dos aspectos reprodutivos. Visto que a ultrassonografia é uma ferramenta importante para se estudar a biologia reprodutiva de populações cativas e selvagens [14], que vem sendo usada como método de avaliação dos órgãos genitais como, testículo, glândulas sexuais acessórias, útero e ovários. Essa

técnica, além de permitir a caracterização morfológica destes órgãos, também auxilia na detecção de afecções reprodutivas, muitas vezes assintomáticas [14,27]. A correta avaliação ultrassonográfica depende do conhecimento prévio das estruturas do sistema reprodutor [28]. Quando a ultrassonografia Modo B é associada ao Modo *doppler* colorido e modo pulsado, temos o modo Triplex *doppler*, que torna possível estudar o aporte sanguíneo dos órgãos, além da caracterização morfológica. Essas duas informações, avaliadas em conjunto, permitem inferências importantes sobre a função dos órgãos estudados [29].

Existem descrições importantes sobre os padrões de fluxo sanguíneo nos testículos de canídeos domésticos, obtidas por ultrassonografia Triplex *doppler* colorido e pulsado. Esses dados, fornecem informações valiosas para a avaliação andrológica, são desconhecidos nos canídeos selvagens [30,31].

Dada a escassez e importância do conhecimento reprodutivo anatômico e fisiológico do sistema genital masculino de *C. thous*, este estudo teve como objetivo condicionar os animais à colheita de sêmen por estimulação digital do pênis, estabelecer características seminais e morfológicas espermáticas da espécie, realizar a morfometria testicular e prostática, além de padrões circulatórios dos testículos de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*).

O presente trabalho está dividido em três capítulos: o primeiro capítulo são as considerações iniciais, expondo a importância do estudo desenvolvido; o capítulo 2, abriga o trabalho científico encaminhado a publicação e o capítulo 3, aborda a revisão de literatura realizada.

# **CAPÍTULO 2**

1 Nas páginas a seguir encontra-se o manuscrito que será submetido à publicação na  
2 revista *Theriogenology* no formato Original “Research Paper”. Após as considerações da  
3 banca o artigo será corrigido, finalizado e submetido.

4 As normas da revista encontram-se no link abaixo:

5 <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

6  
7 **Caracterização seminal e avaliação reprodutiva ultrassonográfica de cachorro-do-**  
8 **mato (*Cerdocyon thous*)**

9 Jaqueline Candido de Carvalho<sup>\*a</sup>, Fernando Evaristo da Silva<sup>b</sup>, Guilherme Rizzoto<sup>c</sup>  
10 Carmell Rezende Dadalto<sup>b</sup>, Maria Jaqueline Mamprim<sup>b</sup>, Fabiana Ferreira de Souza<sup>b</sup>,  
11 Carlos Roberto Teixeira<sup>a</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>b</sup>.

12  
13 <sup>a</sup>Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, Escola de Medicina Veterinária e Ciência  
14 Animal, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

15 <sup>b</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Escola de Medicina  
16 Veterinária e Ciência Animal UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São  
17 Paulo, Brasil.

18 <sup>c</sup>Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University  
19 of Calgary, Calgary, AB, Canadá.

20  
21 **\*Correspondência:** Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária,  
22 Escola de Medicina Veterinária e Ciência Animal (UNESP) - Universidade Estadual  
23 Paulista, Rua Prof. Dr. Walter Maurício Correa, s/n, Botucatu, São Paulo 18681-681,  
24 Brasil. Tel: 14 3880- 2121, E-mail: [jaque.veterinaria@live.com](mailto:jaque.veterinaria@live.com)

25  
26  
27  
28 **Resumo**

29  
30 O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), é uma espécie suscetível a problemas como  
31 predação, caça e atropelamentos, apesar de ser considerado uma espécie de menor  
32 preocupação, segundo a *International Union for Conservation of Nature* (IUNC -redlist).  
33 São escassos os dados científicos sobre os parâmetros reprodutivos dessa espécie, são  
34 animais que podem servir como modelo experimental para espécies seriamente ameaçadas,

35 visto que grandes dificuldades são encontradas para a colheita seminal em canídeos  
36 silvestres. O objetivo do trabalho foi realizar o condicionamento dos animais à colheita  
37 de sêmen por estimulação digital do pênis, relatar as características seminais para a  
38 espécie, mensurar volume testicular e dimensões da próstata por ultrassom, além de  
39 relatar parâmetros Dopplerfluxométricos. Utilizamos machos adultos (n=5), com idade  
40 média = 3 anos, (variando de 2 a 5 anos), pesando em média 7kg mantidos em cativeiro.  
41 O condicionamento teve início em maio de 2018, sendo que foram utilizados 13  
42 ejaculados para as avaliações. Média e desvio padrão foram calculados ( $\pm$  DP). Com  
43 volume médio de  $393,2 \pm 178,0 \mu\text{L}$  e concentração de  $463,8 \pm 594,5 \times 10^6$   
44 espermatozoides/mL,  $203.892,5 \pm 296.037,2$  espermatozoides/ejaculado, motilidade total  
45  $68,0 \pm 6,2\%$ , progressiva  $48,8 \pm 5,2\%$  e rápidos  $57,2 \pm 6,8\%$ . Na avaliação morfológica  
46 foi encontrada alta prevalência de defeitos de cabeça (acrossomo, pequena anormal,  
47 diadema *defect* e formas teratológicas). O volume testicular  $2,2 \pm 0,7 \text{ cm}^3$  para o testículo  
48 esquerdo e  $2,1 \pm 0,7 \text{ cm}^3$  testículo direito, próstata com dimensão craniocaudal de  $2,3 \pm$   
49  $0,4 \text{ cm}$  e dorsoventral de  $1,5 \pm 0,3 \text{ cm}$ . Na avaliação ultrassonográfica modo Triplex  
50 Doppler velocidade do pico sistólico (VPS) com maior média na artéria supra testicular  
51 e menor na artéria intratesticular ambas no testículo direito. Concluímos que o  
52 condicionamento de *C. thous* à colheita de sêmen por estimulação digital do pênis é  
53 possível, o método é eficiente para a espécie, proporciona amostras viáveis, passíveis de  
54 avaliação; a técnica da ultrassonografia mostrou-se apropriada para as mensurações  
55 testiculares e prostáticas, a técnica ultrassonográfica modo Triplex Doppler foi capaz de  
56 mensurar o fluxo sanguíneo das artérias de interesse.

57

58 **Palavras-chave:** 1. *Cerdocyon thous*, 2. Reprodução animal, 3. Ultrassonografia, 4.  
59 Sêmen, 5. Condicionamento animal.

60

61

62

63

64

65

66

## 67 1. Introdução

68 Primeiro canídeo sul americano descrito, o cão selvagem *Cerdocyon thous*  
69 (Linnaeus,1766), mais conhecido como cachorro-do-mato, encontra-se distribuído na  
70 maior parte da América do Sul; Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, sudeste da  
71 Bolívia, Paraguai, Uruguai, nordeste da Argentina e quase todo o Brasil, com exceção da  
72 Amazônia [1].

73 De hábitos crepusculares e noturnos, os cachorros-do-mato são onívoros, gregários,  
74 podendo ser encontrados em pares ou em grupos familiares estendidos; são  
75 monogâmicos, com comportamento forrageiro [2].

76 Apesar da espécie não ser considerada ameaçada de extinção [3], o número de  
77 indivíduos vem diminuindo progressivamente, devido à fragmentação do habitat, pressão  
78 antrópica, caça e atropelamento nas rodovias [4,5]. Esse cenário vem causando a perda  
79 de precioso patrimônio genético [6] e suscita a necessidade de desenvolvimento de  
80 estratégias voltadas à conservação à espécie [7].

81 As biotécnicas reprodutivas são ferramentas importantes para a manutenção da  
82 biodiversidade e enriquecimento genético das populações [8]. Contudo, para que sejam  
83 implementadas com sucesso é indispensável o conhecimento anatômico e fisiológico da  
84 espécie em questão [9], principalmente quando buscamos aplicar biotécnicas voltadas  
85 preservação de amostras seminais, sendo nestes casos imprescindível que estas sejam  
86 viáveis, para que então possam ser utilizadas nos programas de reprodução assistida [10].

87 Um obstáculo ao uso das biotécnicas reprodutivas em canídeos selvagens é a  
88 contaminação por urina das amostras seminais colhidas por eletroejaculação, o que as  
89 torna inviáveis [11,12]. Várias tentativas sem sucesso vêm sendo feitas buscando a  
90 adequação da técnica de eletroejaculação aos canídeos selvagens, envolvendo a  
91 modificação dos protocolos anestésicos [13], posição do eletrodo na ampola retal, uso de  
92 correntes elétricas contínuas ou alternadas e sequências de eletroestimulação [14]. Apesar  
93 de existir um relato de colheita seminal por eletroejaculação em cachorro-do-mato, a  
94 amostra obtida apresentou-se contaminada por urina, e os espermatozoides presentes  
95 apresentavam-se imóveis [12].

96 Devido ao insucesso da eletroejaculação em canídeos selvagens e a relativa  
97 facilidade de manejo e docilidade de algumas espécies, tais como o lobo-guará  
98 (*Chrysocyon brachyurus*) [15,16] e a raposa-do-ártico (*Vulpis lagopus*) [17], a técnica de  
99 colheita seminal por estimulação digital do pênis, empregada no cão doméstico [18], vem

100 sendo empregada com sucesso nessas espécies, e portanto, apresenta-se como uma  
101 alternativa possível para a colheita seminal no *C. thous*.

102 A ultrassonografia é uma importante ferramenta para o estudo dos órgãos  
103 constituintes do aparelho genital masculino, sendo útil no diagnóstico de alterações  
104 anatômica e vasculares [19,20]. Contudo, existem poucos estudos ultrassonográfico do  
105 aparelho genital masculino do *C. thous*, todos limitado a avaliação ultrassonografica  
106 modo B

107 O objetivo do presente estudo foi avaliar a possibilidade do condicionamento de  
108 machos adultos *C. thous* à colheita seminal por estimulação digital do pênis e descrever  
109 as características seminais, as dimensões e a arquitetura ultrassonográfica testicular e  
110 prostática, bem como o padrão de vascularização testicular e do cordão espermático nesta  
111 espécie.

## 112 **2. Material e Métodos**

113 O estudo foi conduzido de acordo com o Conselho Nacional de Controle e  
114 Experimentação Animal, sob o protocolo 0190/2017, aprovado pelo Comitê de Ética na  
115 Utilização de Animais e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade  
116 (SISBIO) sob a permissão número: 60086.1.

117

### 118 *2.1. Animais*

119 Foram avaliados, durante os meses de julho a agosto de 2019, cinco cachorros-do-  
120 mato (*C. thous*) machos adultos, com idade entre 3 e 5 anos, pesando em média 7 kg. Os  
121 animais, todos provenientes de vida livre, foram resgatados em situação de risco e  
122 chegaram ainda filhotes ou jovens ao Centro de Medicina e Pesquisa em Animais  
123 Selvagens (CEMPAS) da FMVZ – Unesp, Botucatu/SP. No CEMPAS os animais vêm  
124 sendo mantidos de modo individual ou em duplas, onde mantêm contato com médicos  
125 veterinários e tratadores. A alimentação oferecida consistiu em frutas, ração comercial  
126 para cães, carne fresca, vísceras e água *ad libitum*.

127

### 128 *2.2. Condicionamento dos animais à colheita seminal por manipulação digital do pênis*

129 O condicionamento à colheita seminal por estimulação digital do pênis teve início  
130 no mês de julho (inverno) de 2018 e estendeu-se até junho (inverno) de 2019.

131 Todas as atividades de condicionamento ocorreram dentro do recinto onde os  
132 animais estavam alocados. Quando alojados em duplas, durante o condicionamento de  
133 um indivíduo o outro era mantido em caixas de transporte, permanecendo, contudo, no  
134 recinto.

135 Os procedimentos foram realizados diariamente ou a cada dois dias. Inicialmente  
136 os animais foram familiarizados com a equipe de trabalho, que era composta por duas  
137 pessoas permanentes; o contato inicial foi realizado com a equipe permanecendo fora do  
138 recinto para o reconhecimento olfativo. Posteriormente adentrou-se ao recinto, e  
139 progressivamente o tempo de permanência foi aumentando. Quando os animais passaram  
140 a permitir a aproximação, iniciou-se o condicionamento para o consentimento do contato  
141 físico, que se iniciou pela cabeça e progressivamente se estendeu a outras áreas do corpo,  
142 com flanco, pelve e pênis.

143 Uma vez condicionados a permitir o contato peniano, iniciaram-se os  
144 procedimentos de colheita seminal, empregando-se a técnica preconizada ao cão  
145 doméstico [18], que resumidamente consistia em estimular o pênis até a obtenção da  
146 ereção, quando este era retirado do interior do prepúcio, exteriorizando-se o bulbo, que  
147 era mantido sob pressão digital constante até que fosse obtida a ejaculação ou se  
148 observasse a perda da ereção.

149

### 150 2.3. *Análise seminal*

151 O volume do ejaculado foi mensurado com auxílio de um pipetador automático; o  
152 aspecto foi determinado visualmente, classificado de aquoso a leitoso, e a coloração  
153 registrada como translúcida, opalescente ou esbranquiçada.

154 A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer sob  
155 microscopia de luz (aumento 400 X) após diluição (1:10) com formol salina. Os  
156 resultados estão apresentados como o número de espermatozoides/mL.

157 As variáveis da cinética espermática foram avaliadas pelo sistema CASA  
158 (Haminton-Thorne Computer-assisted sperm analysis, CASA System, versão 10 Ivos,  
159 HTR-IVOS 10 Analyzer, Hamilthon Thorne Research, Bevely, MA, USA). A cinética  
160 espermática foi avaliada por seleção automática de campo microscópico na temperatura  
161 de 38°C, em câmara de Markler, utilizando-se o *set up* para cães domésticos, de acordo  
162 com a configuração do Centro de Estudos em Reprodução Animal (CERAN, FMVZ,  
163 UNESP, Botucatu, Brasil) que incluiu a captura de imagem a 60 Hz, captura de imagem  
164 de 30 quadros/segundo, contraste mínimo das células: 30, tamanho mínimo da célula: 30

165 pixels, intensidade celular: 40, VAP cut off: 70,0  $\mu$ /s, STR cut off: 80,0%; VAP cut off  
166 for slow cells: 30  $\mu$ /s), VSL cut off for static cells:20  $\mu$ /s), light intensity: 3,600, light/  
167 photometer: 125, vídeo source/dark field: 60 Hz, static intensity pattern, min e max,  
168 respectively, 0,48 and 1,45), alogation static pattern, min e max, respectively: 0 e 97 [18].

169 Foram avaliadas a motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%),  
170 velocidade média do trajeto (VAP  $\mu$ m/s) velocidade retilínea (VSL,  $\mu$ m/s), velocidade  
171 curvilínea (VCL -  $\mu$ m/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu$ m),  
172 frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

173 Para avaliação da morfologia dois métodos foram utilizados: preparações secas,  
174 esfregaços corados pela técnica de Karras – modificado [21], avaliadas por microscopia  
175 de luz, aumento de 1000X; ou preparações úmidas dos espermatozoides diluídos em  
176 formol salino tamponado previamente aquecido, depositadas entre lâmina e lamínula e  
177 avaliadas sob microscopia de luz de contraste de interferência diferencial (DIC), aumento  
178 de 1000x (Eclipse 80i, Nikon) [22]. Independente do método, foram contadas 100 células,  
179 que foram classificadas como normais ou portadoras de anormalidades morfológicas  
180 maiores ou menores [23]. Os resultados estão expressos na forma de porcentagem.

181

#### 182 2.4. *Morfometria espermática*

183 A morfometria espermática foi realizada sob microscopia de luz, aumento de  
184 1000X, empregando-se o software LAS EZ (Leica®, Leica Microsystems, Wetzlar,  
185 Alemanha). Foram avaliadas 100 células morfologicamente normais de cada indivíduo  
186 em esfregaços corados pela técnica de Karras-modificado. Em cada espermatozoide  
187 registrou-se: largura da cabeça, comprimento de cabeça, comprimento da peça  
188 intermediária, comprimento total da cauda e comprimento total do espermatozoide [24].

189

#### 190 2.5. *Avaliação ultrassonográfica dos testículos e próstata*

##### 191 Ultrassonografia modo B

192 Após jejum alimentar e hídrico, respectivamente, de 12 e 6 horas, os animais foram  
193 contidos fisicamente, com o auxílio de puçá, e submetido à contenção química com  
194 midazolam i.m. (0,5mg/kg - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltd., São Paulo,  
195 Brasil) e ketamina i.m. (10 mg/kg - Syntec, Cotia, São Paulo, Brasil) [25].

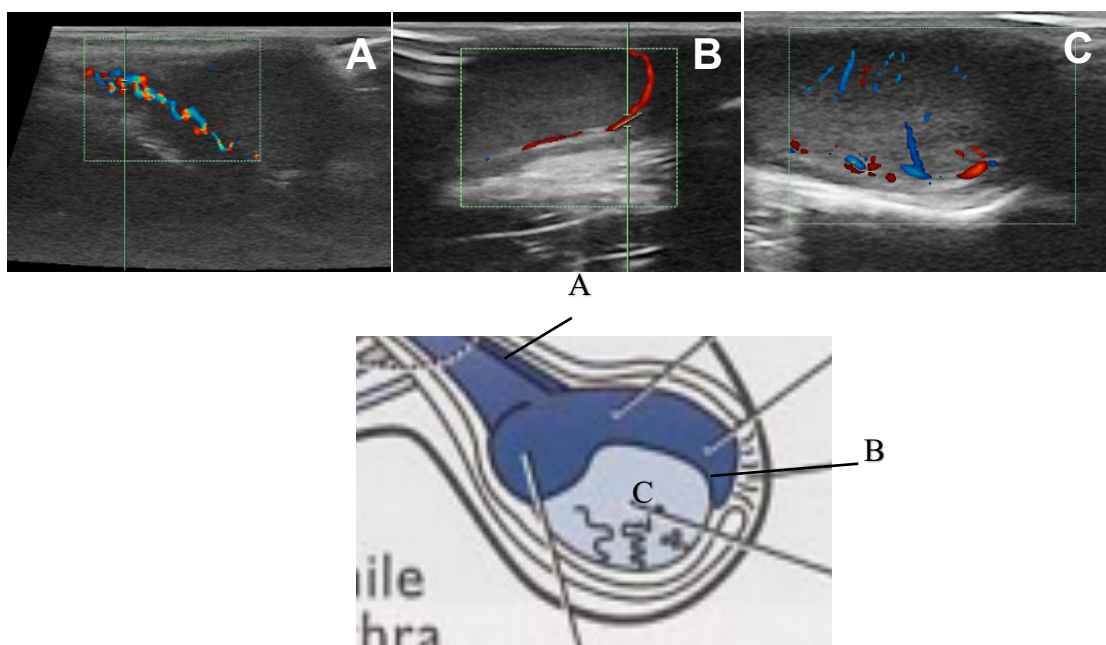
196 A avaliação dos testículos e próstata foi realizada por ultrassonografia Modo B  
197 (MyLab Alpha Unit - Esaote Healthcare, Sao Paulo, SP, Brazil) com transdutor linear  
198 multifrequencial (4-13 MHz); a cada exame foram avaliados: ecogenicidade, ecotextura

199 e volume testicular, em dois planos, longitudinal e transversal; o volume foi calculado  
 200 utilizando a fórmula: comprimento x largura x espessura x 0,5236 (22).

### 201 Ultrassonografia Doppler

202 O modo Doppler colorido foi inicialmente realizado para o mapeamento vascular.  
 203 Posteriormente foi realizado o Doppler espectral, identificando-se a representação das  
 204 onda do fluxo arterial, e realizando-se a mensuração em três ondas semelhantes  
 205 subsequentes com um ângulo de insonação inferior a 60°.

206 O tríplex Doppler forneceu informações qualitativas e semi quantitativas,  
 207 identificando-se o traçado espectral característico e mensurando a velocidade do pico  
 208 sistólico (VPS), índice de resistividade (IR) e índice de pulsatilidade (IP). Foram  
 209 avaliadas as seguintes artérias: supra testicular, localizada no cordão espermático;  
 210 capsular, próxima à cauda do epidídimo, e intratesticular (Fig.1), de acordo com o  
 211 proposto por Ortiz-Rodriguez et al. [26].



226 **Fig. 1.** Posicionamento do transdutor durante avaliação ultrassonográfica dos testículos de  
 227 cachorro-do-mato (*C. thous*), para avaliação das artérias supra testicular (A), localizada no cordão  
 228 espermático, capsular (B), próxima à cauda do epidídimo, e intratesticular (C).

229  
 230 Para a avaliação prostática Modo B, o transdutor foi posicionado de forma  
 231 longitudinal por via abdominal, sendo movido caudalmente ao colo da bexiga até se obter  
 232 a imagem completa da próstata; uma vez identificada, foram mensurados seus

233 comprimento e largura. Nos animais em que a próstata estava localizada intrapélvica,  
234 impossibilitando a avaliação ultrassonográfica, foi realizada palpação transretal para  
235 deslocá-la cranialmente, tornando assim possível sua mensuração.

236 Para todas as variáveis foram calculadas a média, como medida de tendência  
237 central, e o desvio padrão, como medida da variabilidade dos dados.

### 238 **3. Resultados**

239 Após 30 dias de visitas constantes, com intervalos médios de dois dias, todos os  
240 animais permitiram contato físico e a partir de 40 dias três deles começaram a permitir a  
241 manipulação peniana. Em 50 dias, 2 animais (A e B), ambos com 3 anos de idades,  
242 ejacularam, empregando-se a técnica de colheita de estimulação digital. Os demais, até o  
243 presente momento (setembro 2019), permitem a manipulação do pênis, apresentam  
244 ereção, mas sem ejaculação.

245 Uma vez iniciada a manipulação peniana os machos apresentaram vocalização e  
246 sequencialmente ereção, permissão para exposição do pênis, ingurgitamento do bulbo e  
247 reflexos pélvicos de cópula. Posteriormente, os reflexos pélvicos cessavam e os machos  
248 levantavam um dos membros posteriores; nesse momento era realizado o movimento de  
249 retroflexão do pênis em 180°, que passava a ficar direcionado em direção caudal. De  
250 maneira geral, durante todas as etapas da colheita seminal os animais permaneceram  
251 dóceis, exceto na fase final, após a retroflexão do pênis, quando o volume ejaculado  
252 diminuía, os machos se tornaram agressivos e inquietos.

253 O ejaculado apresentou duas frações: a primeira, eliminada na forma de jato,  
254 possuía aspecto translúcido; a segunda, com aspecto leitoso esbranquiçado, foi expelida  
255 lentamente, formando gotas na região do óstio uretral externo; o tempo médio de colheita  
256 foi de 6 minutos, sendo que após 10 minutos observou-se o término de ereção e regressão  
257 do tamanho do bulbo peniano.

258 O volume do ejaculado, concentração espermática, número de espermatozoides por  
259 ejaculado, motilidade total e progressiva, bem como o percentual de espermatozoides  
260 rápidos estão expressos na Tabela 1, na forma de valores individuais de cada ejaculado,  
261 média e desvio padrão.

262 O espermatozoide de *C. thous* apresentou cabeça ovalada, com o acrossomo  
263 ocupando aproximadamente dois terços da área total da cabeça. Os resultados das  
264 avaliações da morfologia espermática, realizadas sob microscopia de luz DIC e pela  
265 técnica de Karras modificado, estão apresentados na Tabela 2 e ilustrados nas Figs. 2 e 3.

266           A média e desvio padrão das medidas espermáticas foram: largura da cabeça:  $3,67 \pm$   
267  $0,38 \mu\text{m}$ , comprimento da cabeça:  $5,53 \pm 0,47 \mu\text{m}$ , comprimento do capuchão acrossomal:  
268  $3,55 \pm 0,74 \mu\text{m}$ , comprimento de peça intermediária:  $10,34 \pm 2,57 \mu\text{m}$ , comprimento da  
269 cauda:  $47,29 \pm 3,65 \mu\text{m}$ , e comprimento total do espermatozoide:  $62,45 \pm 5,24 \mu\text{m}$ .

270 **Tabela 1**271 Valores individuais e médios (desvio padrão) das características seminais de cachorro-do-mato (*C. thous*).

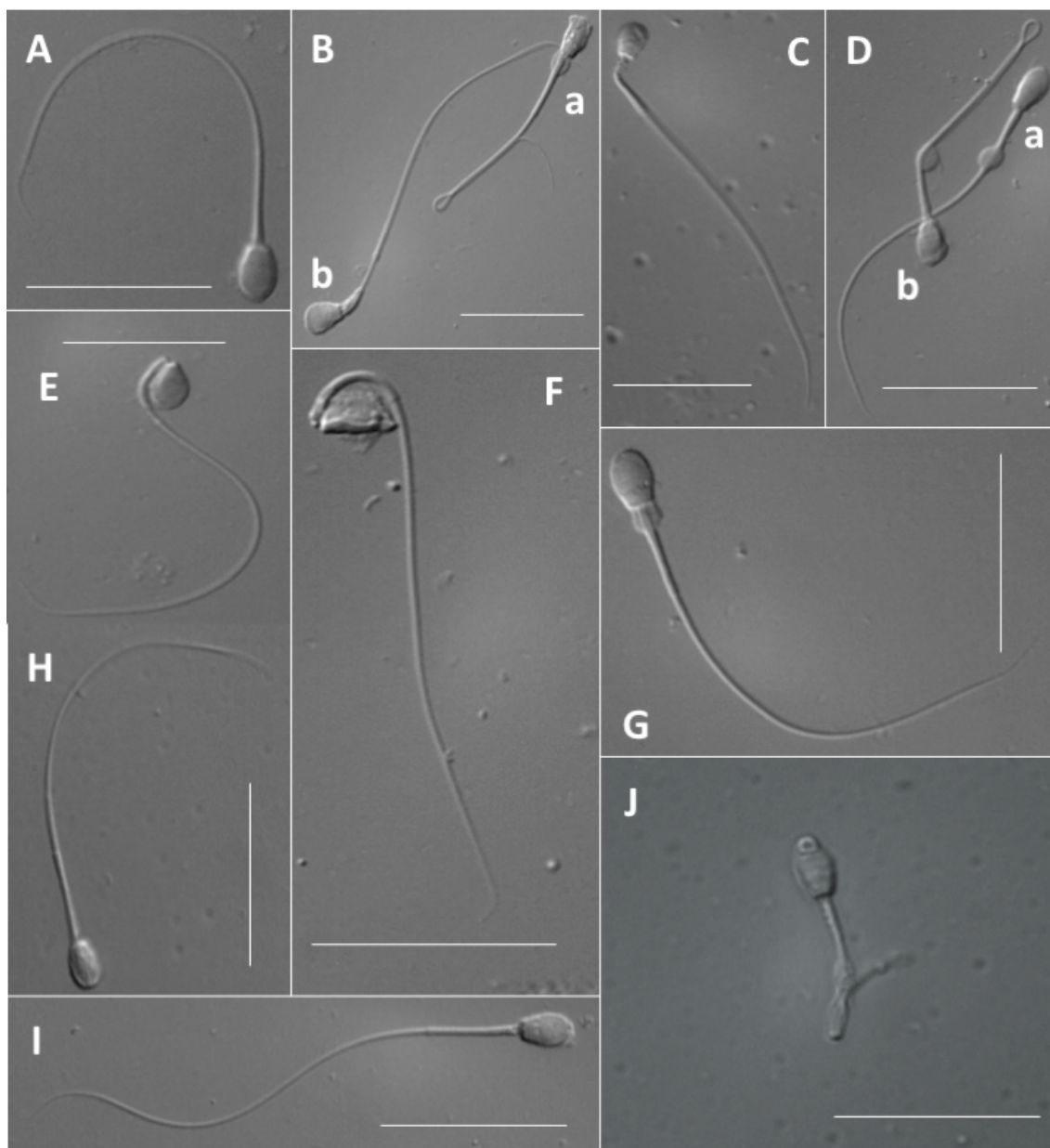
<b>Animal</b>	<b>Ejaculado</b>	<b>Vol</b> ( $\mu\text{L}$ )	<b>Conc</b> (x 106/mL)	<b>NTE</b> (x 10 <sup>6</sup> espermatozoides)	<b>MT</b> (%)	<b>MP</b> (%)	<b>RAP</b> (%)
A	1	80	152,20	12.176	67	42	52
	2	480	2242,50	1.076.400	69	55	51
	3	720	138,70	99.864	80	58	71
	4	500	425,00	212.500	73	52	63
	5	102	242,00	24.684	70	53	64
	6	450	259,00	116.550	57	43	50
Média (DV)		388,7 (249,6)	576,6 (822,5)	275,3 (397,0)	69,3 (7,6)	50,5 (6,5)	58,5 (8,7)
B	1	470	421,0	197.870	73	50	62
	2	500	88,2	44.100	66	46	54
	3	440	210,7	92.708	72	50	61
	4	490	1095,0	536.550	67	47	54
	5	210	177,0	37.170	68	50	60
	6	310	161,0	49.910	64	49	53
	7	360	417,0	150.120	58	40	48
Média (DV)		397,1 (108,3)	367,1 (345,5)	158,22 (373,6)	66,9 (5,0)	47,4 (3,6)	56,0 (5,1)
Média Total (DV)		393,2 (178,4)	463,7 (594,4)	217,4 (304,0)	68 (6,2)	48,8 (5,1)	57,2 (6,8)

272 Abreviações: A e B: identificação dos animais; Números ao lado das letras (A e B): número do ejaculado; Vol: volume; Conc: concentração; NTE:  
 273 espermatozoides por ejaculado; MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; RAP: percentagem de espermatozoides rápidos; DV: desvio padrão.

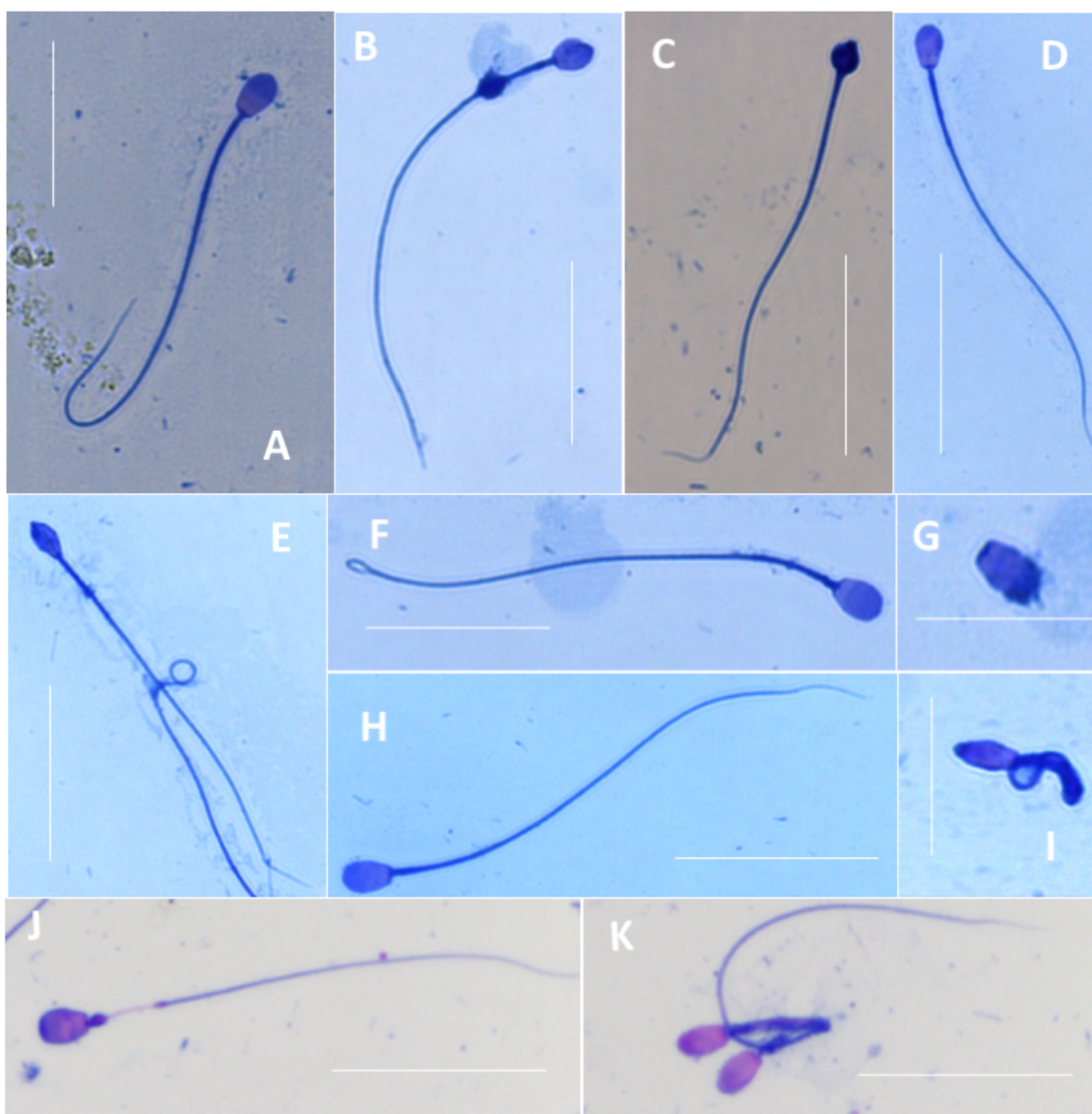
274 **Tabela 2**

275 Valores médios e desvio padrão dos defeitos morfológicos espermáticos de cachorro-do-  
 276 mato (*C. thous*) avaliados pelo método Karras modificado ou em preparação úmida sob  
 277 microscopia de luz de contraste de interferência diferencial (DIC).

Morfologia espermática [27]	Karras Modificado	DIC
Normais	2,0 (1,0)	0,0 (0,0)
<i>Defeitos maiores</i>	96,8 (3,7)	97,8 (2,6)
Acrossomo	13,2 (7,1)	2,3 (1,2)
Formato e contorno	0,0 (0,0)	4,8 (3,8)
Sub. desenvolvida	0,0 (0,0)	2,9 (2,1)
Isolada patológica	4,6 (3,4)	2,3 (1,3)
Estreita na base	3,5 (1,9)	1,4 (0,5)
Piriforme	1,3 (0,5)	1,0 (0,0)
Pequena Anormal	35,6 (11,0)	42 (22,4)
Pouch formation	3,0 (1,7)	3,7 (1,2)
Diadema defect.	10,8 (7,2)	3,8 (2,0)
Knobbed	4,7 (1,7)	5,3 (7,3)
Gota citoplasmática proximal	1,6 (1,2)	0,0 (0,0)
Formas teratológicas	14,8 (10,1)	38,5 (25,1)
Desfibrilação	1,3 (0,5)	1,0 (0,0)
Fratura	2,3 (1,7)	2,0 (0,0)
Edema	2,3 (1,6)	1,0 (0,0)
Pseudogota	2,5 (2,1)	1,0 (0,0)
Fortemente dobrada ou enrolada	2,3 (1,4)	1,0 (0,0)
Dobrada com gota	3,0 (0,0)	2,5 (0,7)
Enrolado na cabeça	3,4 (3,8)	0,0 (0,0)
<i>Defeitos menores</i>	3,2 (3,9)	2,1 (2,6)
Delgada	2,0 (0,6)	2,3 (1,5)
Gigante	1,3 (0,5)	0,0 (0,0)
Peq. normal	1,0 (0,0)	5,7 (2,5)
Abaxial	1,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Dobrada ou enrolada	1,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Gota citoplasmática distal	3,4 (3,7)	3,0 (0,0)
Total de defeitos	100,0 (0,0)	99,9 (0,3)



**Fig. 2.** Morfologia espermática de cachorro-do-mato (*C.thous*) avaliada sob microscopia de luz de contraste de interferência diferencial (DIC). (A) espermatozoide normal; (Ba) contorno anormal de cabeça, gota citoplasmática proximal, cauda fortemente dobrada; (Bb) contorno anormal de cabeça (piriforme), edema e aplasia segmentar de peça intermediária; (C) cabeça pequena anormal; (Da) implantação abaxial da cauda e gota citoplasmática distal; (Db) contorno anormal de cabeça, gota citoplasmática distal e cauda fortemente dobrada; (E) fratura de colo; (F) forma teratológica; (G) *diadema defect* e gota citoplasmática proximal; (H) cabeça delgada; (I) *diadema defect.*; (J) *pouch formation*, gota citoplasmática distal, cauda fortemente dobrada.



**Fig. 3.** Morfologia espermática de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) observada pelo método de Karras modificado. (A) espermatozoide normal; (B) contorno anormal e gota citoplasmática distal; (C) pequena anormal; (D) *diadema defect*; (E) forma teratológica; (F) implantação abaxial e cauda dobrada; (G) cabeça isolada patológica; (H) implantação abaxial; (I) pequena anormal e cauda fortemente enrolada; (J) aplasia segmentar de peça intermediária; (K) forma dupla.

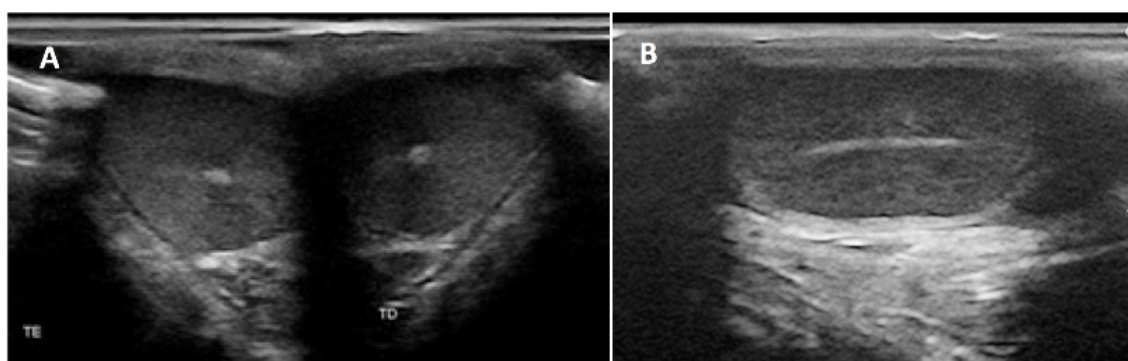
Espermatozoides com implantação abaxial de cauda foram frequentemente encontrados, assim como gota citoplasmática distal e anormalidades morfológicas de cauda; contudo, devido ao método de contagem dos defeitos, que sempre priorizava o registro do defeito mais grave de cada espermatozoide, esses achados ficaram subestimados.

Na avaliação física, as gônadas, todas localizadas dentro da bolsa escrotal, apresentaram-se simétricas, de consistência fibroelástica, e sem aderências entre elas e a

bolsa escrotal. Quando avaliadas por ultrassonografia todas também apresentaram margens regulares, ecotextura homogênea e linha mediastinal hiperecogênica evidente. Os volumes dos testículos direito e esquerdo foram, respectivamente,  $2,2 \pm 0,7 \text{ cm}^3$  e  $2,1 \pm 0,7 \text{ cm}^3$ . As imagens ultrassonográficas dos testículos estão apresentadas na Fig. 4.

Antes das avaliações ultrassonográficas da próstata, esta foi palpada por via transretal. Essa manobra foi particularmente útil para a sua localização, por acesso ultrassonográfico abdominal, nos casos de pouca repleção vesical. Em todos os animais foi possível a visualização da próstata por abordagem abdominal, na região hipogástrica, caudal à bexiga urinária e ventral ao cólon descendente distal. A glândula apresentou margens regulares, ecotextura homogênea, e aspecto bilobada com a uretra prostática ao centro. As medidas e as imagens prostáticas estão apresentadas, respectivamente, na Tabela 3 e na Fig. 5.

Na avaliação Doppler espectral as artérias supra testiculares e capsulares apresentaram fluxo sanguíneo de característica bifásica, com picos sistólicos evidentes, seguidos por diminuição gradual do fluxo diastólico, caracterizando assim baixa resistência vascular. As artérias intratesticulares exibiram tendência a apresentar padrões monofásicos, sem diástole marcada. Os resultados velocimétricos e seus índices estão apresentados na Tabela 4 e ilustrados nas Fig. 6 e 7.



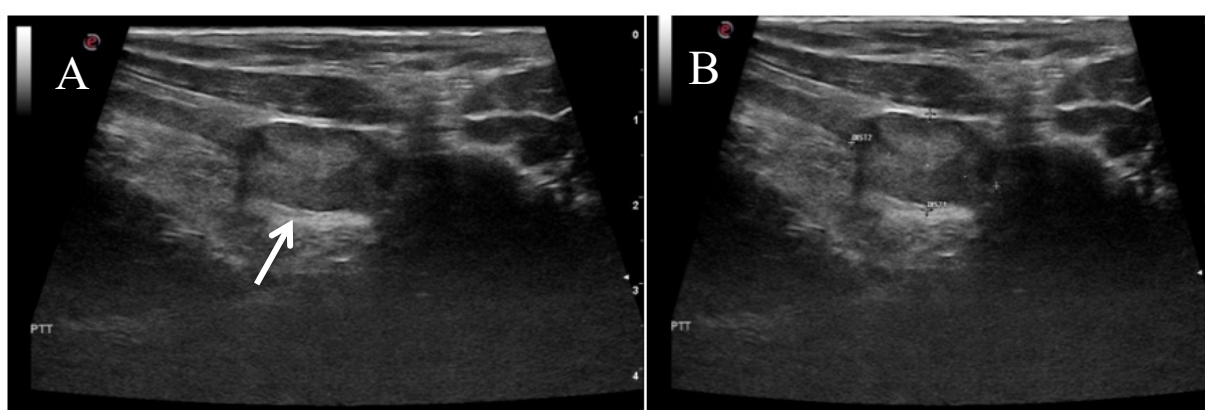
**Fig. 4.** Imagem ultrassonográfica modo B dos testículos de cachorro-do-mato (*C. thous*). (A) secção transversal dos testículos evidenciando o mediastino como um ponto hiperecogênico central; (B) secção testicular longitudinal, evidenciando mediastino como uma linha hiperecogênica central. Nas duas imagens observa-se o aspecto ultrassonográfico homogêneo do parênquima testicular.

**Tabela 3**

Dimensões individuais e valores médios (desvio padrão) da próstata de cachorro-do-mato (*C. thous*) mensuradas por ultrassonografia modo B.

Animais	A	B	C	D	E	Média (DV)
CC (cm)	2,4	1,7	2,3	2,1	2,8	2,3 (0,4)
DV (cm)	1,2	1,4	1,4	1,4	2,0	1,5 (0,3)

Abreviações: CC: crâniocaudal, DV: dorsoventral.



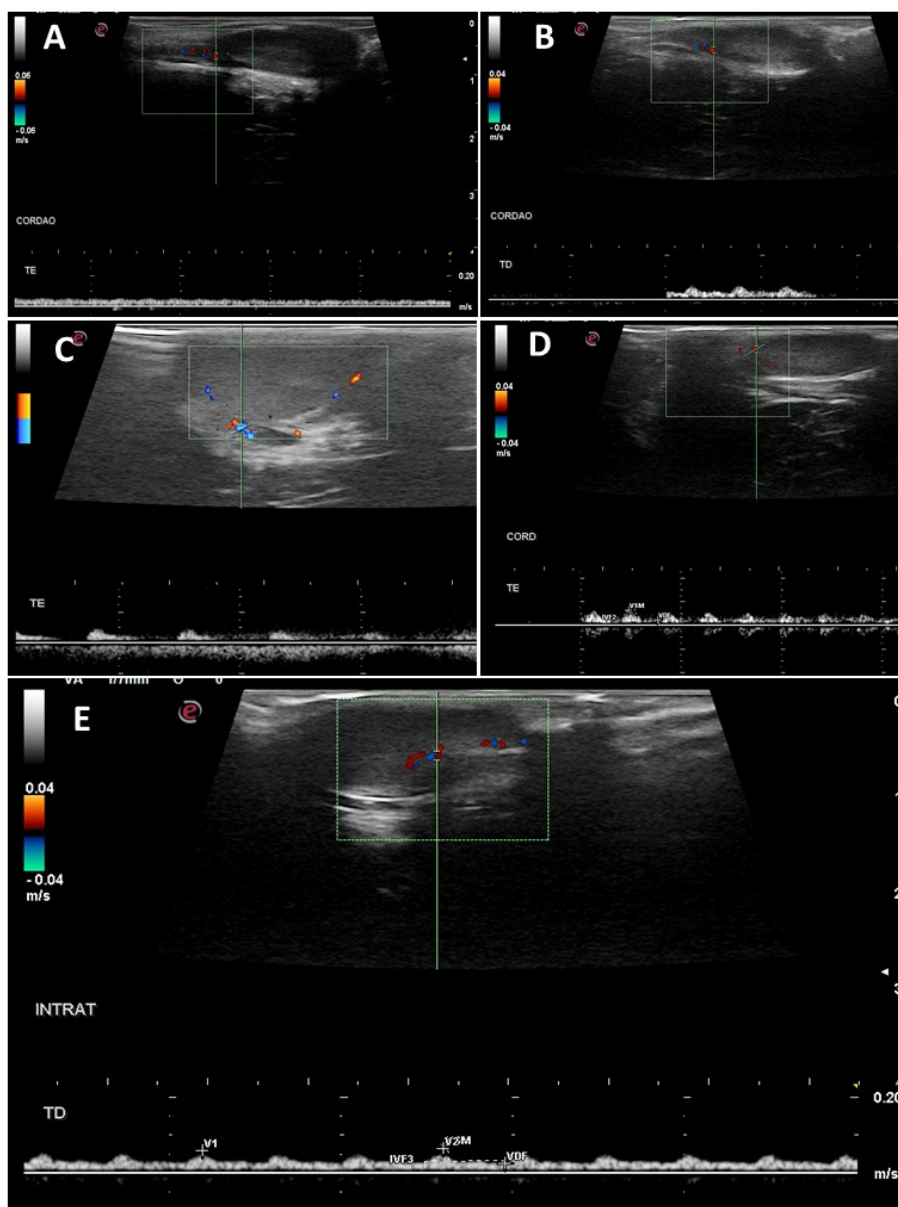
**Fig. 5.** Imagem ultrassonográfica modo B da próstata de cachorro-do-mato (*C. thous*). (A) (seta) evidenciando localização da glândula acessória; (B) mensuração da próstata.

**Tabela 4**

Valores médios e desvio padrão dos índices Dopplerfluxométricos de artérias testiculares de cachorro-do-mato (*C. thous*).

Variáveis	Testículo esquerdo			Testículo direito		
	VPS (cm/s)	IR (cm/s)	IP (cm/s)	VPS (cm/s)	IR (cm/s)	IP (cm/s)
Artéria supra- testicular	13,70 (4,07)	0,62 (0,05)	1,03 (0,15)	14,08 (4,42)	0,62 (0,02)	1,05 (0,14)
Artéria capsular	13,08 (2,22)	0,55 (0,06)	0,88 (0,20)	11,36 (2,59)	0,59 (0,04)	1,05 (0,17)
Artéria intratesticular	11,66 (2,48)	0,51 (0,07)	1,00 (0,20)	9,00 (1,53)	0,61 (0,06)	1,06 (0,09)

Abreviaturas: VPS: velocidade de pico sistólico; IR: índice de resistividade; IP: índice de pulsatilidade.



**Fig. 6.** Imagens representativas das avaliações ultrassonográfica testicular de cachorro-do-mato (*C. thous*), modo Triplex Doppler. (A) Vascularização do cordão espermático, captação de ondas monofásicas características de fluxo venoso; (B) artéria testicular no cordão espermático, com ondas de padrão bifásico de baixa intensidade; (C) artéria capsular, com ondas de padrão bifásico, (D) artéria testicular; (E) artéria intratesticular, com ondas de padrão bifásico.

#### 4. Discussão

Este estudo, de modo inédito, descreve a possibilidade do condicionamento de cachorro-do-mato para a colheita seminal por estimulação digital, demonstrando a possibilidade do método ser aplicado com sucesso a indivíduos dessa espécie, assim como já demonstrado em lobos guará [15,16] e em raposas-do-ártico [17].

Contudo, apenas dois cachorros-do-mato apresentaram a sequência completa de reflexos, que culminaram com a ejaculação. Esse resultado pode estar relacionado ao local em que os animais estavam alojados durante o estudo. O CEMPAS, é um centro localizado dentro do Hospital Veterinário da FMVZ/Unesp. O local apresenta grande movimentação de alunos, funcionários e técnicos. Durante os procedimentos de colheita, ficou evidente que barulhos de aparecimento súbito, bem como a movimentação das pessoas interferiram no processo, fazendo com que alguns animais entrassem em estado de alerta e perdessem a ereção. Recomenda-se, portanto, que as tentativas de colheitas sejam feitas em ambientes reservados, isolados e calmos. Outro fator que interferiu no processo de condicionamento, foram as mudanças de recintos a que os animais foram submetidos. que isto acontecia, observa-se que os mesmos se apresentavam mais agitados, alertas e agressivos, provavelmente devido ao processo adaptativo ao novo ambiente.

A técnica de colheita utilizada neste estudo resultou na obtenção de amostras seminais contendo espermatozoides móveis, permitindo a realização da avaliação cinética, funcional e morfológica do sêmen. Este é o primeiro relato das características seminais de *C. thous*, obtidas a partir de ejaculados não contaminados com urina.

O método de colheita permitiu a caracterização da sequência da expulsão do ejaculado, que apresentou apenas duas frações: uma de aspecto límpido, eliminada rapidamente, e outra de aspecto leitoso, eliminada lentamente, aspectos semelhantes aos descritos para as duas primeiras frações do ejaculado do cão [28]. Contudo, as frações ejaculatórias diferiram e em número com as observada nos cães domésticos, nos quais o ejaculado é composto por três frações [29,30], e no lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), que apresenta apenas uma fração [16].

Um comportamento importante observado durante as colheitas seminais foi o progressivo aumento da agressividade e das tentativas dos animais de se desvencilharem da contenção, à medida que terminava a eliminação da segunda fração espermática. Esse comportamento pode estar relacionado ao fato do *C. thous* ser uma presa potencial quando em vida livre. Após o término da segunda fração os machos tentavam evadir antes do desengurgitamento total do bulbo peniano, o que torna o coito mais rápido e pode ser uma importante estratégia de redução de risco de predação.

O volume ejaculado *C. thous*, com média de 393,2  $\mu$ L, foi próximo ao observado no lobo-guará (0,5 a 1,3 mL), [16] sendo, contudo, inferior ao relatado para o cão doméstico, cujo ejaculado, quando consideradas suas três frações, varia de 1 a 40 mL

[28]. Todavia, quando se considera apenas a segunda fração do ejaculado canino, que variar de 0,5 a 1,0 mL [31], o volume obtido no nosso estudo não foi tão discrepante. O volume ejaculado no cão varia em função da idade e do tamanho dos animais [28]. Os achados do presente estudo sinalizam que o menor volume do ejaculado do cachorro-do-mato, pode estar relacionado ao seu menor peso (7 kg), quando comparado aos dos cães (20,6 a 54,1 kg – [20]) e dos lobos guará (25 kg – [16]).

O volume ejaculado dos canídeos recebe expressiva contribuição do fluido prostático, que é responsável por cerca de 95% de seu volume total [32], sendo portanto influenciado pelo tamanho e funcionalidade dessa glândula. Cães adultos, pesando acima de 25 kg apresentam próstata com dimensões médias de 3,09 cm por 2,93 cm (comprimento x altura) [33] tamanho este, superior ao observado nos animais do presente estudo (2,3 x 1,5 cm). A diferença de tamanho prostático pode ser uma importante explicação para o baixo volume ejaculado pelo *C. thous*.

O tamanho prostático observado neste estudo foi discretamente maior do que o já descrito para cachorros do mato com idade variando 8 meses a 1 ano [1]. Como o tamanho prostático é influenciado pela idade e maturidade sexual [34], o fato de termos utilizados animais de 3 a 5 anos no nosso estudo pode ser a razão da diferença observada.

A motilidade espermática total observada nos ejaculados cachorro-do-mato, apesar do elevado percentual de espermatozoides apresentando alterações morfológicas, foi apenas discretamente menor à observada no lobo-guará (76.1%) [16], raposa-do-ártico (> 70%) [17] e cão doméstico (88 – 96%) [20,35], submetido ao mesmo método de colheita do sêmen.

O comprimento e a largura da cabeça dos espermatozoides do *C. thous* foram similares as descritas para cães domésticos (respectivamente, 5,4 e 3,5  $\mu\text{m}$ ) [36] e lobos-vermelho (5,69 e 3,81 $\mu\text{m}$ ) [37], e menores que as descritas para as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*; 6,85 e 4,0  $\mu\text{m}$ ) [38] e Great anteater (*Myrmecophaga tridactyla*; 9,2; 5,1  $\mu\text{m}$ ) [24].

A concentração espermática, o número total de espermatozoides no ejaculado e o tamanho testicular do cachorro-do-mato foram, respectivamente, de aproximadamente 32%, 21,89% e 18% dos observados em cão doméstico pesando 33-42 kg [35].

Considerando que o volume testicular está diretamente relacionado com o número de espermatozoides no ejaculado, uma vez que o tamanho do testículo reflete o volume ocupado pelo componente responsável pela espermatogênese, os túbulos seminíferos [40, 41], essa comparação sugere que a técnica empregada neste estudo para a colheita do

sêmen do cachorro-do-mato foi adequada para a obtenção de um ejaculado representativo da espécie. Considerando ainda o número total de espermatozoides por ejaculado obtidos neste estudo e o observado em ejaculados de cachorro-do-mato ao lobo-guará [16], a produção espermática do cachorro-do-mato foi muito superior, visto que o lobo guará tem volume testicular cerca de 6 vezes maior e ejacula apenas cerca de 52% do número de espermatozoides presentes no ejaculado do cachorro-do-mato.

O alto percentual de defeitos espermáticos encontrados em nosso estudo também foi descrito em outras espécies selvagens, como coiotes (*Canis latrans*) [40], cão-selvagem-africano (*Lycaon pictus*) [41], lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) [16], lobo-vermelho (*Canis rufus*) [42], tamadua (*Myrmecophaga tridactyla*) [24,43] e onça pintada (*Panthera onca*) [44]. Essa ocorrência pode ser influenciada por fatores, tais com a sazonalidade reprodutiva observada em carneiros [45], pôneis [46] e lobos-guará [16]; distúrbios hormonais, afecções testiculares e alterações senis [47], longos intervalos entres as cópula/ejaculações [48]. Como os animais no presente estudo apresentaram excelente libido, eram jovens e saudáveis, e não apresentavam sinais clínicos de afecções reprodutivas, é pouco provável que as anormalidades morfológicas encontrados fossem em decorrência desses motivos. Em relação a sazonalidade, não existe consenso na literatura sobre a sazonalidade reprodutiva do cachorro-do-mato, contudo, as colheitas seminais foram realizadas nos meses de julho e agosto de 2019, época considerada como favorável a reprodução desses animais [2,49] e, portanto, se houve efeito sazonal, esse foi positivo.

Outra possibilidade para a presença de elevado número de formas anormais nos ejaculados é baixa variabilidade genética das populações [48,50–52], posto que a espermatogênese anormal é também associada a genes específicos, podendo ser portanto de origem hereditária [53–55]. O fato dos animais estudados serem oriundos da mesma região sugere que essa é uma possibilidade que não pode ser descartada.

Defeitos de cabeça como: *diadema defect* e *pouch formation*, constantemente presentes no ejaculados deste estudo, que estão associadas à falha na condensação da cromatina [53–55] e indicam que houve dano ao material genético [56], são considerados defeitos primários [57] não compensatórios [53–55]. Esses defeitos podem ser consequência de insultos, como o estresse térmico, que quando mantidos de modo permanente, podem agravar ainda mais o quadro [55].

Não foram observados defeitos espermáticos exclusivos, e sim uma variedade de alterações concomitantemente, sugerindo que estes pode estar relacionados à fatores

ambientais [27]. Fatores ambientais como as condições inadequadas de cativeiro, que resultem em estresse constante [58] e/ou deficiência nutricional [59] podem ser responsáveis por importantes alterações reprodutivas que interferem diretamente na eficiência reprodutiva das espécies [60,61]. As dietas oferecidas aos animais silvestres em cativeiro são muitas vezes formuladas a partir das oferecidas aos animais de produção, e muitas vezes não atendem exigências nutricionais espécie-específica [62]. A suplementação vitamínica e mineral para animais cativos tem sido implementada com sucesso, proporcionando melhora da qualidade seminal em onça-pintada (*Panthera onca*), reduzindo o percentual de defeitos primários [59].

Estudo andrológicos em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), demonstraram que animais de vida livre apresentam maior porcentagem de formas espermáticas normais [24], quando comparados a animais cativos [43], sinalizam para a importância da influência do cativeiro na qualidade seminal.

A implantação abaxial de cauda, que foi um achado comum no cachorro-do-mato, apresentou-se com aspectos semelhantes ao descrito em equinos, ou seja, sem a presença de cauda acessória ou fossa de implantação secundária [63]. A implantação abaxial de cauda também foi relatada em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) como um achado constante nas amostras seminais em animais de vida livre [24] e em cativeiro [43].

A avaliação ultrassonográfica modo B do parênquima testicular do *C. thous* revelou que este apresenta aspecto semelhante ao dos outros mamíferos, como cães [35], bovinos [19,75] e gatos [76], apresentando ecogenicidade homogênea, modificada apenas pela presença da linha mediastinal hiperecótica. Apesar da ultrassonografia testicular apresenta-se como um importante método auxiliar nas avaliações andrológicas dos animais [56,57,60], ela não pode ser parâmetro isolado para seleção reprodutiva, pois cães com padrão ecográfico modo B sem alterações podem ser inférteis [79]. Contudo, no presente estudo esta avaliação foi importante para certificar que os animais estudados não apresentavam alterações morfológicas importantes nos órgãos reprodutivos.

Por meio da avaliação Doppler colorido foi possível determinar o aspecto tortuoso da artéria supra testicular, já descrito em garanhões e cães [26,80]. As velocidades de pico sistólico foram maiores nas artérias supra testiculares e menores nas capsulares, semelhante ao descritos em cães domésticos [80]. Dessa forma os valores encontrados servirão de parâmetros de normalidade na avaliação do VPS em *C. thous* e mais estudos serão necessários para identificar se a infertilidade dessa espécie, causa

redução do VPS das artérias supra testiculares e capsular assim como em caninos domésticos.

Quanto ao IR e IP na artéria supra testicular, os valores encontrados foram superiores quando comparados a literatura consultada para cães com peso entre 10 e 13kg [35]. Mas esses índices não diferiam em animais férteis ou inférteis em estudos pretéritos, pois pode haver redução do fluxo sanguíneo sem alteração da resistência do leito vascular [20].

Estes dados podem auxiliar na avaliação reprodutiva de forma não invasiva. Assim como, os índices de velocidade do pico sistólico e de resistividade, são considerados parâmetros importantes para se inferir a fertilidade em homens [81].

Os resultados deste estudo indicam que os valores dos índices obtidos estão dentro do esperado, pois o pico da velocidade sistólica na artéria supra testicular foi superior as demais artérias avaliadas, um achado comum em cães domésticos, e os valores obtidos para o peso do *C. thous* e volume testicular parecem próximos aos observados em cães, onde animais com maior peso e volume testicular apresentam índices menores, quando comparados aos cães menores com menor volume testicular [35].

Este estudo demonstrou a possibilidade de condicionamento de machos *C. thous* cativos para a colheita seminal pela técnica de estimulação digital, e permitiu a obtenção de ejaculados livres da contaminação por urina, permitindo assim a determinação das características seminais dessa espécie. A avaliação ultrassonográfica modo B permitiu a mensuração de testículos e próstata e forneceu informações relacionada aos padrões ultrassonográficos destes órgãos. A avaliação Doppler permitiu a caracterização dos padrões de fluxo sanguíneo dos testículos, dados estes que poderão servir de parâmetros para futuras avaliações andrológicas e desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas nesta espécie.

## Referências

- [1] Berta A. *Cerdocyon thous*. Am Soc Mammal 1982;71:3–6. doi:10.1644/870.1.Key.
- [2] Brady CA. Reproduction, growth and parental care in Crab-eating foxes. Int Zoo Yearb 1978;18:130–4. doi:10.1111/j.1748-1090.1978.tb00243.x.
- [3] Courtenay O, Maffei L. Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*). Canids Foxes, Wolves, Jackals Dogs Status Surv Conserv Action Plan 2004:32–8.
- [4] Valadão M, Bastos LF, Castro CP. Atropelamentos de vertebrados silvestres em quatro rodovias no Cerrado, Mato Grosso, Brasil. Multi-Science J 2018;1:62–74.
- [5] Orlandin E, Piovesan M, Favretto MA, D’Agostini FM. Mamíferos de Médio e Grande Porte Atropelados no Oeste de Santa Catarina, Brasil. Biota Amaz 2015;5:125–30. doi:10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n4p125-130.
- [6] Henry-Silva GG. A importância das unidades de conservação na preservação da diversidade biológica. 2005 2005;12:127–51.
- [7] Machado LC. Biologia da reprodução do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e criopreservação do material genético para enriquecimento de banco de germoplasma animal. Universidade de São Paulo, 2016.
- [8] Hilsdorf AWS, Costa AM, Mittelman A, Salomão AN, Tombolato AFC, Martins AL, et al. Conservação de Recursos Genéticos no Brasil. 1st ed. Brasília: Embrapa; 2012.
- [9] Morato RG, Rodrigues FHG, Eizirik E, Mangini PR, Azevedo FCC, Marinho-Filho J. Manejo e conservação de carnívoros neotropicais. 2nd ed. São Paulo: IBAMA; 2006.
- [10] da Paz RCR. Reprodução assistida em canídeos e procionídeos neotropicais. Rev Bras Reprodução Anim 2015;39:77–82.
- [11] da Paz RC. Reprodução assistida em canídeos e procionídeos neotropicais 2015:77–82.
- [12] Assumpção TI de, Santos ALQ, Canelo EA. Biometria testicular e características morfológicas dos espermatozoides de cachorros-do-mato *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 (Carnivora, Canidae). Rev Bras Ciência Veterinária 2017;24:99–103. doi:10.4322/rbev.2017.020.
- [13] Souza NP, Guimarães LDA, Paz RCR. Dosagem hormonal e avaliação testicular em cachorro-do-mato (*Cerdocyun thous*) utilizando diferentes protocolos

- anestésicos. Arq Bras Med Vet e Zootec 2011;63:1233–6.
- [14] Castelo TS, Silva AR. Eletroejaculação em mamíferos silvestres: principais fatores que afetam sua eficiência. Rev Bras Reprodução Anim 2015;38:208–13.
- [15] Mascarenhas RM, Júnior MC, Borboleta LR, Ribeiro ECS, Bittencourt VL, Paula TAR. Condicionamento para coleta de sêmen através de manipulação digital em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) 2002:2002.
- [16] Teodoro LO, Melo-Junior AA, Spercoski KM, Morais RN, Souza FF. Seasonal Aspects of Reproductive Physiology in Captive Male Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1815). Reprod Domest Anim 2012;47:250–5. doi:10.1111/rda.12071.
- [17] Stasiak K, Kondracki S, Iwanina M. Relationship of arctic fox (*Alopex lagopus* L.) sperm morphology with age of males, sperm concentration, ejaculate volume and acrosin activity. Ann Anim Sci 2018;18:741–52. doi:10.2478/aoas-2018-0023.
- [18] Araujo MS, Paulo OL de OH, Paranzini CS, Scott C, Papa FO, Dell'Aqua C de PF, et al. Insights into the influence of canine breed on proteomic of the spermatozoa and seminal plasma. School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, 2019.
- [19] Cardilli DJ, Toniollo GH, Pastore AA, Canola JC, Oliveira JA, Mercadante MEZ. Ultrassonografia testicular em bovinos jovens da raça Nelore criados em sistema extensivo. Arq Bras Med Vet e Zootec 2012;64:75–82. doi:10.1590/S0102-09352012000100012.
- [20] Moxon R, Bright L, Pritchard B, Bowen IM, de Souza MB, da Silva LDM, et al. Digital image analysis of testicular and prostatic ultrasonographic echogenicity and heterogeneity in dogs and the relation to semen quality. Anim Reprod Sci 2015;160:112–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.07.012.
- [21] Papa F, Alvarenga M, Bicudo S, Lopes M, Ramires P. Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Sthyphnodendrum barbatiman*). Arq Bras Medicina Veterinária e Zootec 1988:23.
- [22] Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 1st ed. Iowa: USA: Iowa State University Press; 1989.
- [23] (CBRA) CB de RA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3rd ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.
- [24] Luba C do N, Boakari YL, Costa Lopes AM, da Silva Gomes M, Miranda FR,

- Papa FO, et al. Semen characteristics and refrigeration in free-ranging giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *Theriogenology* 2015;84:1572–80. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.041.
- [25] Minter LJ, DeLiberto TJ. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. *Theriogenology* 2005;64:1898–912. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.03.026.
- [26] Ortiz-Rodriguez JM, Anel-Lopez L, Martín-Muñoz P, Álvarez M, Gaitskell-Phillips G, Anel L, et al. Pulse Doppler ultrasound as a tool for the diagnosis of chronic testicular dysfunction in stallions. *PLoS One* 2017;12:1–21. doi:10.1371/journal.pone.0175878.
- [27] Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram (author's transl). *Nord Vet Med* 1972;25:91.
- [28] Feldman EC, Nelson RW. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p.529-546. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996.
- [29] England GCW, Allen WE. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. *Theriogenology* 1992;37:373–81. doi:10.1016/0093-691X(92)90195-W.
- [30] Barsanti JA, Finco DR. Canine prostatic diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1986;16:587–99. doi:10.1016/S0195-5616(86)50063-2.
- [31] Silva AR. Avaliação andrológica de cães e gatos. *Rev Bras Reprod Anim* 2002;5:52–5.
- [32] Isaacs WB, Shaper JH. Isolation and Characterization of the Major Androgen-dependent Glycoprotein of Canine Prostatic Fluid. *J Biol Chem* 1983;258:6610–5. doi:10.1139/o67-089.
- [33] Junior RM. Padronização das medidas da próstata de cães de diferentes pesos e idades pelo exame ultra-sonográfico. Diss - Univ São Paulo Fac Med Veterinária e Zootec Dep Cir 2006 2006:85 f.
- [34] Senger P. *Regulation of reproduction. Pathways to pregnancy parurition*. 2nd ed., Washington: 2003, p. 102–27.
- [35] Souza MB, Mota Filho AC, Sousa CVS, Monteiro CLB, Carvalho GG, Pinto JN, et al. Triplex doppler evaluation of the testes in dogs of different sizes. *Pesqui Vet Bras* 2014;34:1135–40. doi:10.1590/S0100-736X2014001100017.

- [36] Núñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ. Do computer-assisted, morphometric-derived sperm characteristics reflect DNA status in canine spermatozoa? *Reprod Domest Anim* 2005;40:537–43. doi:10.1111/j.1439-0531.2005.00628.x.
- [37] Lawrence M, Mastromonaco G, Goodrowe K, Santymire RM, Waddell W, Schulte-Hostedde AI. The effects of inbreeding on sperm morphometry of captive-bred endangered mammals. *Can J Zool* 2017;95:599–606. doi:10.1139/cjz-2016-0291.
- [38] Batalha LM, Oba E. Caracterização morfométrica e morfológica de célula espermática de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Arch Vet Sci* 2006;11:66–72. doi:10.5380/avs.v11i1.5613.
- [39] Martínez ML, Da Silva Verneque R, Teodoro RL, De Oliveira Paula LR, Cruz M, De Paula Campos J, et al. Correlations among Semen Quality Traits and Scrotal Circumference of Sires of the Gyr Breed. *Rev Bras Zootec* 2000;29:700–6.
- [40] Minter LJ, DeLiberto TJ. Seasonal variation in serum testosterone, testicular volume, and semen characteristics in the coyote (*Canis latrans*). *Theriogenology* 2008;69:946–52. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.01.010.
- [41] Van den Berghe F, Paris DBBP, Van Soom A, Rijsselaere T, Van der Weyde L, Bertschinger HJ, et al. Reproduction in the endangered African wild dog: Basic physiology, reproductive suppression and possible benefits of artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2012;133:1–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.06.003.
- [42] Goodrowe KL, Hay MA, Platz CC, Behrns SK, Jones MH, Waddell WT. Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1998;53:299–308. doi:10.1016/S0378-4320(98)00119-5.
- [43] Mendonça MAC. Análise descritiva do perfil espermático do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) de cativeiro. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2010.
- [44] Morato R, Guimarães M, Nunes A, Carciofi A, Ferreira F, Barnabe V, et al. Semen collection and evaluation in the jaguar (*Panthera onca*). *Brazilian J Vet Res Anim Sci* 1998;35:00–00. doi:10.1590/S1413-95961998000400007.
- [45] Toazza R, Casali R, Ohlweiler LU, Gregianin P, Mezzalira A. Patologias espermáticas em carneiros de raças leiteiras: efeito da sazonalidade. 2016:13–5.
- [46] Lucena CAO, Maia MS, Maia JJA, Silva GF, Sousa TML, Moura CEB. Influência Da Época Do Ano Sobre Os Parâmetros Seminais De Garanhões Pônei. *Acta Vet*

Bras 2014;8:2007–8.

- [47] Shiomi HH. Aspectos seminais de suínos da raça piau: Sazonalidade e criopreservação. Universidade Federal de Viçosa, 2018.
- [48] Wildt DE, Howard JG, Hall LL, Bush M. Reproductive Physiology of the Clouded Leopard: I. Electroejaculates Contain High Proportions of Pleiomorphic Spermatozoa throughout the Year<sup>1</sup>. Biol Reprod 2005;34:937–47. doi:10.1095/biolreprod34.5.937.
- [49] Lockyear KM, MacDonald SE, Waddell WT, Goodrowe KL. Investigation of captive red wolf ejaculate characteristics in relation to age and inbreeding. Theriogenology 2016;86:1369–75. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.080.
- [50] Silva T. O uso de altrenogest para protocolos de reprodução assistida em gato-domato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) Minhas citações 2009:96.
- [51] Rodrigues FM. Genética da Conservação em duas Espécies de Canídeos do Parque Nacional das Emas-GO 2004:1–152.
- [52] Sarti P. Avaliação morfológica do testículo e da espermatogênese de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) adultas. Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- [53] Sironen A, Uimari P, Nagy S, Paku S, Andersson M, Vilkki J. Knobbed acrosome defect is associated with a region containing the genes STK17b and HECW2 on porcine chromosome 15. BMC Genomics 2010;11:699. doi:10.1186/1471-2164-11-699.
- [54] Larsen RE, Chenoweth PJ. Diadem/crater defects in spermatozoa from two related angus bulls. Mol Reprod Dev 1990;25:87–96. doi:10.1002/mrd.1080250115.
- [55] Chenoweth PJ. Genetic sperm defects. Theriogenology 2005;64:457–68. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.005.
- [56] Senger P. The organization and function of the male reproduction system. Pathways to pregnancy parurition. 2nd ed., Washington: Current conceptions; 2003, p. 44–79.
- [57] BLOM E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. Fertil Steril 1950;1:223–38. doi:10.1016/s0015-0282(16)30183-2.
- [58] Beletti M. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. Rev Bras Reprodução Anim 2013;37:92–6.
- [59] Silva RT da, Mendes Júnior JOB, Beletti ME. Compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides na produção de embriões <em>in

- vitro</em> utilizando touros zebuínos. Acta Sci Anim Sci 2009;30. doi:10.4025/actascianimsci.v30i4.1002.
- [60] Orsini H, Bondan EF. Fisiopatologia do estresse em animais selvagens em cativeiro e suas implicações no comportamento e bem-estar animal – revisão da literatura. Rev Inst Ciência Saúde 2006;24:7–13.
- [61] Da Paz RCR, Gonçalves RM, Carciofi AC, Guimarães MABV, Pessuti C, Santos EF, et al. Influence of nutrition on the quality of semen in Jaguars *Panthera onca* in Brazilian zoos. Int Zoo Yearb 2006;40:351–9. doi:10.1111/j.1748-1090.2006.00351.x.
- [62] Leite DMG. Efeitos negativos do estresse sobre o desempenho reprodutivo 2002:1–16.
- [63] Pizzutto C. O enriquecimento ambiental como ferramenta para melhorar a reprodução e o bem-estar de animais cativos. Rev Bras Reprodução Anim 2009;33:129–38.
- [64] Lima FC dos S, Menezes BB de. Interferentes no consumo de dietas em animais silvestres cativos. Ximostira científica famez / ufms, campo grande: anais da ximostira científica famez / ufms, campo grande,2018; 2018, p. 1–7.
- [65] Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay SK. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. J Androl 2000;21:53–7. doi:10.1002/j.1939-4640.2000.tb03275.x.
- [66] Dinsdale D, Williams RB. Ultrastructural changes in the sperm-tail of zinc-deficient rats. J Comp Pathol 1980;90:559–66. doi:10.1016/0021-9975(80)90104-8.
- [67] Wong WY, Flik G, Groenen PMW, Swinkels DW, Thomas CMG, Copius-Peereboom JHJ, et al. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. Reprod Toxicol 2001;15:131–6. doi:10.1016/S0890-6238(01)00113-7.
- [68] Barth AD. Abaxial tail attachment of bovine spermatozoa and its effect on fertility. Can Vet J 1989;30:656–62.
- [69] Amann RP, Seidel GE, Mortimer RG. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. Theriogenology 2000;54:1499–515. doi:10.1016/S0093-691X(00)00470-2.
- [70] Freneau G. Aspectos da morfologia espermática em touros. Rev Bras Reprodução

- Anim 2011;35:160–70.
- [71] Brito LFC. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. Clin Tech Equine Pract 2007;6:249–64. doi:10.1053/j.ctep.2007.09.004.
- [72] Lischke A, Pang G, Gulian M, Song F. Analysis of sperm chromatin structure in blue foxes (*Alopex lagopus*) and silver foxes (*Vulpes vulpes*). Livest Sci 2019. doi:10.1016/j.livsci.2019.103869.
- [73] Saacke RG. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. Theriogenology 2008;70:473–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.012.
- [74] Jalkanen L. Sperm abnormalities in silver fox (*Vulpes vulpes*) semen selected for artificial insemination. J Reprod Fertil Suppl 1993;47:287–90.
- [75] Cardilli DJ, Toniollo GH, Pastore AA, Canola JC, Mercadante MEZ, Oliveira JA. Padrão Ultrassonográfico Do Parênquima, Mediastino E Túnicas Testiculares Em Bovinos Jovens Da Raça Nelore. Ciência Anim Bras 2010;11:899–905. doi:10.5216/cab.v11i4.6599.
- [76] Brito MBS de. Ultrassonografia modo B de alta resolução, modo doppler e uso de contraste de microbolhas na avaliação testicular de gatos domésticos. Universidade estadual “Júlio de Mesquita Filho”– Unesp, 2015.
- [77] Gunzel-Apel A-R, Mohrke C, Nautrup CP. Colour-coded and pulsed doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: Physiological and pathological findings. Reprod Domest Anim 2001;36:236–40. doi:10.1046/j.1439-0531.2001.00288.x.
- [78] Samir H, Sasaki K, Ahmed E, Karen A, Nagaoka K, El Sayed M, et al. Effect of a single injection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and human chorionic gonadotropin (hCG) on testicular blood flow measured by color doppler ultrasonography in male Shiba goats. J Vet Med Sci 2015;77:549–56. doi:10.1292/jvms.14-0633.
- [79] Da Silva LDM, De Souza MB, De Freitas LA, Da Cunha Barbosa C. Aplicações da ultrassonografia Doppler na avaliação reprodutiva de cães. Acta Vet Bras 2014;8:275–83.
- [80] de Freitas LA, Pinto JN, Silva HVR, Uchoa DC, Mota Filho AC, da Silva LD. Prostatic and Testicular Doppler and Echobiometry in Boxer Dogs. Acta Sci Vet 2013;41.
- [81] Biagiotti G, Cavallini G, Modenini F, Vitali G, Gianaroli L. Spermatogenesis and

spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery. *BJU Int* 2002;90:903–8. doi:10.1046/j.1464-410X.2002.03033.x.

# **CAPÍTULO 3**

## REVISÃO DE LITERATURA

### 5.1. *Cerdocyon thous*

Atualmente das espécies de mamíferos descritas na literatura, 652 ocorrem em território brasileiro, que representa aproximadamente 12% da mastofauna do mundo, e faz do Brasil o país mais rico em diversidade de mamíferos da Região Neotropical. Na Mata Atlântica ocorrem naturalmente cerca de 250 espécies, sendo que cerca de 22% são endêmicas deste bioma [32]. A família Canidae conta com 13 gêneros e 35 espécies [33]. Os representantes atuais da família Canidae são tradicionalmente agrupados em três subfamílias: a) subfamília Caninae, com os gêneros *Canis*, *Alopex*, *Vulpes*, *Fennecus*, *Urocyon*, *Nyctereutes*, *Dusicyon*, *Cerdocyon*, *Atelocynus* e *Chrysocyon*; b) subfamília Simocyoninae, com os gêneros *Speothos*, *Cuon* e *Lycaon*; e c) subfamília Otocyoninae, com o gênero *Otocyon* [34].

O *C. thous*, conhecido popularmente como cachorro-do-mato, foi o primeiro canídeo sul americano descrito na literatura, com ampla distribuição geográfica no continente e que possui facilidade em se adaptar a condições climáticas extremas [1,35].

São animais de porte médio, pesando de 4 a 7 Kg, de hábitos crepusculares e noturnos não apresentam dimorfismo sexual, organizado em sociedade monogâmicas, sendo aparentemente tolerante a perturbações antrópicas, porém não à urbanização [1,35].

Apesar de classificado pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) em situação menos preocupante, least concern (LC) [36], apresenta declínio de sua população, fato este provavelmente associado a com sua intensa interação antrópica que resulta em altos índices de atropelamento e abate por caça [4,37].

Por serem animais onívoros e oportunistas, seu hábito alimentar lhe confere grande importância ecológica, influenciando diretamente na dinâmica do ecossistema como dispersor de sementes [35], de *Eugenia umbeliflora* que ingeridas por cachorro-do-mato germinam mais rápido [38], espécie de planta muito utilizada como anti-hipertensivo e antirreumático na cultura popular [39]. O cachorro-do-mato é ainda um predador que tem papel importante como regulador populacional de pequenos roedores [38].

O cachorro-do-mato é monogâmico [35], atinge a maturidade sexual por volta de um ano de idade, e os acasalamentos ocorrem nos meses de agosto e setembro, com gestação durando por volta de 59 dias, com uma ninhada que pode variar de 2 a 5 filhotes [40].

### 5.2. *Conservação dos canídeos silvestres*

O Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade tanto em sua fauna quanto em flora. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2019) há o registro de 114.848 espécies, com 8.964 vertebrados, sendo 720 mamíferos. Contudo, 1.173 estão ameaçadas de extinção, os mamíferos contam com um total de 110 espécies incluídas nesta lista. Sendo assim, o MMA (2018) criou a estratégia nacional para conservação de espécies ameaçadas de extinção pela Portaria nº 444, busca desta forma, colocar todas as espécies ameaçadas de extinção sob alguma medida de conservação até 2022. Criando o Programa Nacional de Conservação das Espécies Ameaçadas de Extinção (Pró-Espécies).

As pesquisas direcionadas para a manutenção de carnívoros selvagens teve início há muitas décadas, porém somente algumas espécies de canídeos estão incluídas em programas de reintrodução e reprodução em cativeiro, já que possuem *status* de maior preocupação diante dos levantamentos [41].

A ação antrópica nociva na natureza como o aquecimento global, fragmentação das florestas, degradação dos ambientes naturais, levando ao processo de extinção de muitas espécies [42], conseqüentemente a perda de indivíduos, reduz a variabilidade genética das populações [6,42–45], aumentando assim a possibilidade desta população apresentar uma alta incidência de alelos deletérios devido à endogamia destas populações reduzidas [44].

A *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) reconheceu o papel fundamental que a reprodução em cativeiro pode desempenhar para a conservação, propõe que vertebrados com menos de 1000 indivíduos na natureza devem ser considerados para programas de reprodução em cativeiro [46]. O objetivo é preservar, nos próximos 200 anos, pelo menos 90% da variabilidade genética existente na população de origem.

Atualmente no Brasil apenas um canídeo brasileiro, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), é considerado quase ameaçado, *near threatened* (NT), segundo a (IUCN), que em sua última atualização em 2015, refere que existem 17.000 indivíduos adultos na natureza [47]. Aqueles indivíduos que conseguem permanecer nestas áreas degradadas muitas vezes sofrem com a alteração da sincronicidade reprodutiva, podem ainda, vir à óbito decorrente da caça ou atropelamentos [5,37,48–50].

Desta forma, podemos selecionar indivíduos e utilizar gametas de vários animais para o incremento genético nestas populações [51] evitando assim, a perda da variabilidade gênica[52]. Realizando a manutenção e preservação genética das espécies, é possível colher amostras de germoplasma de duas formas: *ex situ*, quando mantemos estes indivíduos fora do seu ambiente natural; ou *in situ*, quando são mantidos em seu habitat. Em biotecnologias do sêmen existem duas possibilidades de manutenção da genética: *in vivo*, já utilizando em programas de inseminação artificial ou transferência de embrião; e *in vitro*, reservando este material, com a formação de bancos de germoplasma [52,53] facilitando sua aplicabilidade e aproveitando ao máximo a genética do indivíduo.

Com diversos relatos na literatura sobre a elevada incidência de defeitos espermáticos, que são associados à homozigose das espécies selvagens [42,54–56], que pode ainda ser responsável por redução na adaptabilidade, crescimento e desenvolvimento [52], o investimento em biotecnologias reprodutivas podem auxiliar estas populações.

### 5.3. Biotecnologia do sêmen em canídeos selvagens

O uso de biotecnologias reprodutivas aparece então como uma oportunidade de introduzir novos espécimes em um grupo, aumentar a variabilidade genética das populações remanescentes, além de formar uma reserva biológica capaz de reintroduzir futuramente espécies que estejam extintas *in situ* [22,52,57–60].

A formação de bancos de germoplasma é uma estratégia importante para a manutenção da diversidade genética, que poderá ser utilizada na reprodução destes indivíduos ameaçados. Há ainda a possibilidade de uma reserva biológica que supera a capacidade de mantenedores como os zoológicos[15,61,62].

As biotecnologias utilizadas em espécies silvestres geralmente são extrapoladas de espécies domésticas, porém essas técnicas de reprodução assistida não são necessariamente eficientes para as espécies selvagens, uma vez que, não são animais domesticados, sendo mais sensíveis às interações, que causam estresse e conseqüentemente, pode gerar alterações, hormonais, do comportamento reprodutivo e da fisiologia reprodutiva [63]. Além disso, os mecanismos reprodutivos entre grupos de animais são altamente variados, podem ser distintos até mesmo entre os indivíduos da mesma espécie [49].

Contudo, ainda é necessário desenvolver técnicas eficientes para a colheita de sêmen em várias espécies selvagens, devido às diferenças espécie-específicas, que tornam a reprodução e a colheita de sêmen ainda mais difícil [64].

#### *5.4. Colheita do sêmen em canídeos silvestres*

Existem vários fatores que podem interferir na reprodução dos animais selvagens, fatores intrínsecos como dominância e sazonalidade; e extrínsecos como a oferta de alimento, organização social, fragmentação de florestas, proximidade com humanos [65,66], densidade populacional, condição corporal, área disponível para forrageiro e a proporção macho : fêmea [67].

##### *5.4.1. Sazonalidade em canídeos silvestres*

A variação da claridade entre dias mais curtos e dias mais longos, é captada por células fotorreceptoras da retina, recebida nos núcleos supra quiasmáticos, localizados no hipotálamo e por vias eferentes neurais e humorais transmitem as informações, fazendo com que a produção de melatonina ocorra [68].

A melatonina é um hormônio secretado pela glândula pineal, responsável por sinalizar ao organismo quando a noite chega. Em circunstâncias normais, suas concentrações plasmáticas são maiores durante o inverno (noites longas) [68].

Esta variação é uma sinalização transitória que organiza as funções dependentes da duração do dia, definindo estações ao longo do ano, que são importantes para a adaptação dos organismos como comportamento, reprodução e troca da pelagem em algumas espécies [67,69].

Os ritmos biológicos reprodutivos podem ser alterados para a adaptação de uma espécie, e ser ajustáveis para os indivíduos, diante de pressões ambientais. Portanto, exige um planejamento experimental, para que a coleta de dados e análise dos mesmos sejam fidedignos à dinâmica destes organismos, visto que a variabilidade, é natural aos sistemas vivos [67].

Nascimentos geralmente ocorrem em estações que proporcionem melhores condições para a sobrevivência da prole nas espécies selvagens, sendo assim, geralmente apresentam um período reprodutivo determinado. Contudo, a sazonalidade reprodutiva em cativeiro pode ser alterada dificultando a implementação de programas de reprodução assistida [70].

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) apresenta uma sazonalidade bem marcada no hemisfério sul, com melhor qualidade espermática nos meses de março a julho [26]. Já no hemisfério norte, esta mesma espécie, apresenta um período reprodutivo que vai de outubro a janeiro [71], evidenciando a influência direta das regiões na sazonalidade reprodutiva destes animais.

Em lobo-guará, utilizando a técnica de estimulação digital do pênis a porcentagem de espermatozoides apresentando defeitos dentro da estação reprodutiva foi de 50,1%, fora da estação de 65,7% [26], comprovando > % de defeitos, mesmo com o uso da técnica de colheita por estimulação digital do pênis, que possibilita a obtenção de um ejaculado livre da contaminação por urina.

A raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) apresenta uma atividade testicular bem definida, com maior atividade entre os meses de fevereiro a março no hemisfério norte [70]. Já a raposa-do-ártico (*Alopex lagopus l.*) a estação reprodutiva se estende até o mês de abril [72].

Diferentemente da espécies citadas anteriormente, em cativeiro, as fêmeas de cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) podem ser ocasionalmente poliétricas, com atividade reprodutiva ao longo do ano no hemisfério Norte [73].

Estudos descrevem épocas distintas de atividade reprodutiva para o *C. thous*, na Amazônia observou-se apenas um estro por ano em animais de vida livre, com início dos nascimentos de agosto a setembro [2]. No Sul do país, em um fragmento da Mata

Atlântica, no Parque Estadual de Itapuã, animais de vida livre, produzem uma prole por ano com nascimentos nos meses de outubro a dezembro [45]. Na Virginia, Estados Unidos, os nascimentos ocorreram ao longo do ano, sem sazonalidade marcada [73]. No mesmo parque outro estudo realizado descreve dois partos por ano [40], o que sugere ausência de sazonalidade da espécie. Apesar das variações indicarem ausência de sazonalidade, os estes relatos podem representar uma resposta a interferências; do cativeiro, disponibilidade de alimento, e pressão ambiental [74].

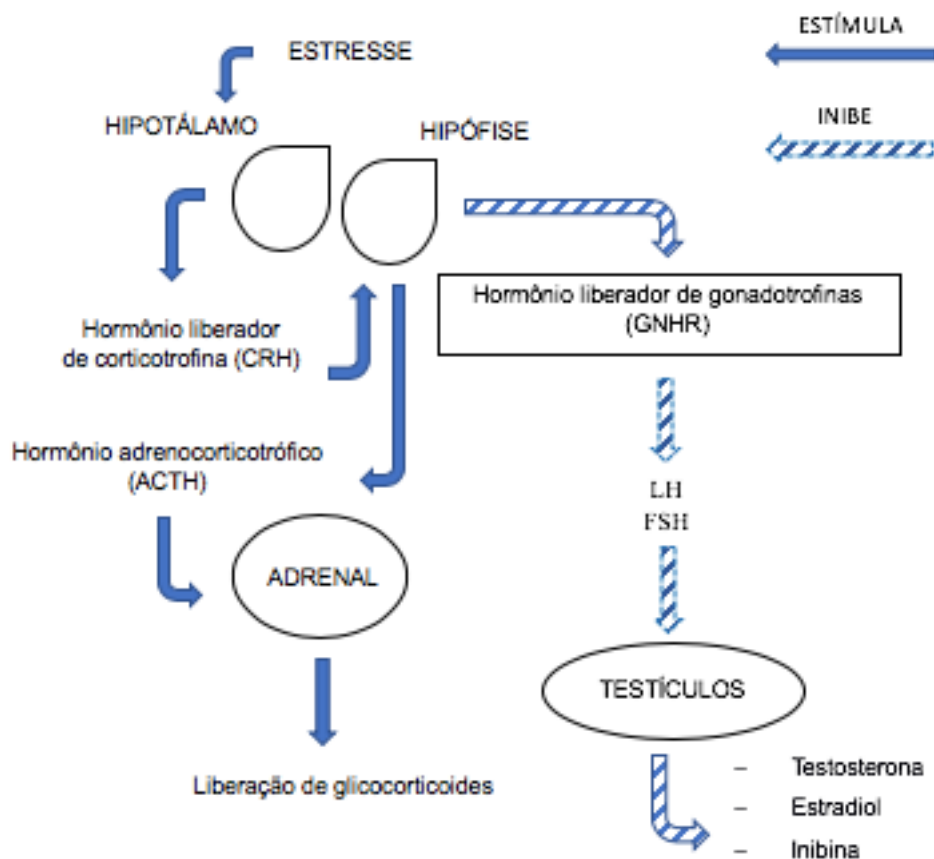
#### 5.4.2. Cativeiro, estresse e dominância em canídeos selvagens

O cativeiro deve proporcionar uma dieta similar aquela ingerida em vida livre, considerando a época do ano e fase da vida, tendo em mente que animais cativos gastam menos energia que animais de vida livre [75].

Cuidados devem ser tomados evitando o sobrepeso e a desnutrição, pois são fatores que levam à redução da concentração [76] e da motilidade espermática total [77].

Diante da mudança de habitat, novos estímulos são apresentados ao indivíduo, gerando estresse, e apesar da resposta ao estressor ser individuo dependente, estas interferências geram algum nível de estresse [78].

O estresse pode ser classificado de duas formas: eustresse, quando ocorre aumento dos níveis de glicocorticoide por um período curto, apenas para gerar uma resposta imediata (luta ou fuga), ou distresse, quando o agente estressor permanece, mantendo altos níveis de glicocorticoides por longos períodos, gerando danos fisiológicos ao indivíduo [79] (Figura 1) e podem ser responsáveis por alterações na saúde e bem-estar, frequentemente relacionados à situação de estresse crônico [78].



**Figura 1.** Eixo Hipotálamo-hipófise-gonadal, inibição hormonal diante do estresse. Adaptado de [79].

A dominância é estressante, está associada à organização social de algumas espécies de canídeos, onde disputas estabelecem a dominância no grupo. O início da estação reprodutiva também pode sinalizar o início das disputas pela dominância do grupo, onde há presença de comportamentos mais agressivos; onde o vencedor terá melhores possibilidades de gerar descendentes [80].

O estresse gerado pelas disputas territoriais e reprodutivas, causa o aumento dos níveis de glicocorticoide circulante [63,65]. Este aumento em níveis constantemente elevados podem causar supressão hormonal [63], inibindo a produção dos andrógenos testiculares [81], reduzindo os níveis de testosterona (Figura 1) [82].

Interessantemente, em lobo-cinzento (*Canis lupus*) e cachorro-selvagem-africano (*Lycan pictus*), machos alfa mesmo com elevados níveis de glicocorticoides circulantes, mantem os maiores níveis de testosterona quando comparados aos subordinados, não

houve supressão reprodutiva [63,65], o que desperta a necessidades de mais estudos para o correto entendimento do mecanismo fisiológico reprodutivo nos canídeos [83].

Aumento dos níveis de testosterona associados a altos níveis de glicocorticoides durante a estação reprodutiva foram descritos em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) [17], lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), [26].

Estudos afirmam que a supressão reprodutiva ocorra a nível cognitivo e não hormonal [80].

Altos níveis de glicocorticoides presentes nos animais que vivem em sociedade hierárquica é considerado “estresse social”, e um custo da dominância, não uma consequência de subordinação. Sociedades com organizações similares podem não apresentar o mesmo comportamento [63], em cativeiro este comportamento pode ser agravado, gerando até mesmo auto mutilação [75], mas é tido como necessário para a adaptação [79].

O enriquecimento ambiental surge como uma ferramenta, que visa aproximar as características do cativeiro com o habitat natural de cada animal, tornando o ambiente atrativo e diversificado, evitando a ociosidade e, conseqüentemente, o estresse [54], Proporcionando assim melhores taxas reprodutivas em animais cativos [84].

#### 5.4.3. Eletroejaculação em canídeos selvagens

A técnica de eleição para a colheita de sêmen em animais selvagens é a eletroejaculação, baseada na estimulação elétrica da glândula acessória, de forma controlada sob o reflexo ejaculatório, por meio de uma sonda composta por eletrodos, que devem ser posicionados no assoalho pélvico sob a próstata, os eletrodos emitem estímulos elétricos de forma a estimular a rede nervosa que supre os órgãos reprodutivos, causando a contração da glândula acessória e dos ductos deferentes, fazendo com que a ejaculação ocorra [85].

O correto posicionamento da probe na ampola retal, deve ser exatamente sob a próstata para que a estimulação elétrica aja apenas na glândula prostática, evitando estimular a musculatura da vesícula urinária, que causaria contração e expulsão do

conteúdo, o esvaziamento prévio da vesícula urinária também é indicada por autores, seja por cateterismo ou cistocentese [20,21].

Contudo, para a aplicação do método é necessário um protocolo anestésico eficiente, efetivo e seguro para todo o procedimento [22,86]. Muitos protocolos já foram testados para a colheita de sêmen em cachorro-do-mato, sem sucesso.

como tiletamina e zolazepam, cetamina e xilazina, cetamina, xilazina e atropina, cetamina e midazolam, e cetamina e acepromazina [17].

Outra preocupação é com o protocolo de eletroestimulação a ser utilizado, diversos protocolos são citados [85], o mais utilizado em carnívoros selvagens consiste em uma série de 80 estímulos divididos em 3 séries: 30 (série 1:10 estimulações 2, 3 e 4V), 30 (série 2:10 estimulações 3, 4 e 5V) e 20 (série 3:10 estimulações 4 e 5V), o estímulo é gerado em cerca de 1 segundo, da voltagem 0 até a desejada, durando por 2 a 3 s na voltagem desejada e regressando diretamente para a voltagem 0 por 3 s, é preciso um descanso de 10 min entre as séries [87], pode ocorrer o aquecimento da mucosa, por isso os estímulos não devem ser contínuos [88].

Ainda há a necessidade de adequação do protocolo a cada espécie e necessária, já que cada um tem sua peculiaridade. Apesar do sucesso obtido através da eletroejaculação em várias espécies animais, como jaguatiricas [21,89,90], onça-pintada [18], pumas [91], chitas [92], lince-ibérico [59], bicho-preguiça [93], onça-parda [94], gato-do-mato-pequeno [95,96] e tamanduá [97], esses esforços vêm sendo infrutíferos nos canídeos silvestres, existindo grande dificuldade na recuperação de espermatozoides viáveis com concentrações mínimas necessárias para que possam ser utilizados em técnicas de reprodução assistida [20,87].

Há dificuldade em colher amostras livres de urina em canídeos selvagens, o que está diretamente associada à técnica de eleição e a necessidade de um protocolo anestésico que não proporcione o relaxamento das estruturas do sistema urinário, que pode inviabilizar a utilização das amostras [15,19,22,98].

Alternativas como a sondagem e esvaziamento da bexiga, por cateterismo vesical, com posterior lavagem da vesícula urinária, é sugerida por autores, porém sem sucesso para obter amostras viáveis, que possam ser utilizadas em biotecnologias reprodutivas em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) [16].

A contaminação do ejaculado com urina, gera danos aos espermatozoides, alterando a permeabilidade da membrana plasmática, levando à morte [98]. Sendo assim, alternativas que visam reduzir este fator vem sendo testadas por procedimentos como o esvaziamento prévio da vesícula urinária ao condicionamento dos animais a colheita por estimulação digital do pênis, que foi realizado com sucesso em lobo-guará [25,26,99].

Diante das dificuldades associadas a técnica da eletroejaculação alguns experimentos já utilizaram o método de estimulação digital em canídeos silvestres como uma estratégia alternativa, já foi aplicada a espécies de canídeos selvagens com sucesso, após o condicionamento prévio dos animais [26,100].

Em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) há uma diferença sazonal na qualidade do ejaculado colhido por estimulação digital, porém mesmo fora da estação reprodutiva a porcentagem de espermatozoides vivos foi de 62% de espermatozoides e na estação reprodutiva de 88%, apresentando ótimos resultados [26].

## REFERÊNCIAS

- [1] Beisiegel B de M, Lemos FG, Azevedo FC, Queirolo D, Jorge RSP. Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. Biodiversidade Bras 2013;3:138–45. doi:10.2307/3503974.
- [2] Macdonald DW, Courtenay O. Enduring social relationships in a population of crab-eating zorros, *Cerdocyon thous*, in Amazonian Brazil (Carnivora, Canidae). J Zool 1996;239:329–55. doi:10.1111/j.1469-7998.1996.tb05454.x.
- [3] Courtenay O, Maffei L. Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*). Canids Foxes, Wolves, Jackals Dogs Status Surv Conserv Action Plan 2004:32–8.
- [4] Orlandin E, Piovesan M, Favretto MA, D’Agostini FM. Mamíferos de Médio e Grande Porte Atropelados no Oeste de Santa Catarina, Brasil. Biota Amaz 2015;5:125–30. doi:10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n4p125-130.
- [5] Figueiró DS, Eizirik E, Silva LG. Padrões biogeográficos de atropelamentos do cachorro-do mato ( *Cerdocyon thous* ) e do graxaim-do- campo (*Lycalopex gymnocercus*) no Rio Grande do Sul, brasil. ResearchGate 2015:2–3. doi:10.13140/RG.2.1.3424.9366.
- [6] Caceres NC. Biological characteristics influence mammal road kill in an Atlantic Forest–Cerrado interface in south-western Brazil. Ital J Zool 2011;78:379–89. doi:10.1080/11250003.2011.566226.
- [7] Orlandin E, Piovesan M, Favretto MA, D’Agostini FM. Mamíferos de Médio e Grande Porte Atropelados no Oeste de Santa Catarina, Brasil. Biota Amaz 2015;5:125–30. doi:10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n4p125-130.
- [8] Thomassen R, Farstad W. Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. Theriogenology 2009;71:190–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.007.
- [9] Fossum T. No Title Small Animal Surgery 2008;4:390.
- [10] Farstad W. Cheetah conservation - A plan to collect, store and use sperm from free-living cheetahs in Namibia, Africa National. Survival (Lond) 1993:6.
- [11] Paula T. Reprodução de carnívoros silvestres 2011:130–2.
- [12] Holt W. Membrane heterogeneity in mammalian spermatozoon. Int Rev Cytol 1984;87:159–94.
- [13] HOWARD JG. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. Zoo

- Wild Anim. Med. IV, W.B Saunders, Philadelphia: 1999, p. 449–57.
- [14] Hildebrandt TB, Hermes R, Jewgenow K, Göritz F. Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species. *Theriogenology* 2000;53:73–84. doi:10.1016/S0093-691X(99)00241-1.
- [15] da Paz RC. Reprodução assistida em canídeos e procionídeos neotropicais 2015:77–82.
- [16] Assumpção TI de, Santos ALQ, Canelo EA. Biometria testicular e características morfológicas dos espermatozoides de cachorros-do-mato *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 (Carnivora, Canidae). *Rev Bras Ciência Veterinária* 2017;24:99–103. doi:10.4322/rbcv.2017.020.
- [17] Souza NP, Guimarães LDA, Paz RCR. Dosagem hormonal e avaliação testicular em cachorro-do-mato (*Cerdocyun thous*) utilizando diferentes protocolos anestésicos. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 2011;63:1233–6.
- [18] Morato RG, Barnabe RC. Biotecnologias de reprodução aplicadas à conservação de felídeos selvagens. *Clin Vet* 1998:24–6.
- [19] Howard J. Recolha e análise de sêmen em carnívoros. FOLWER, ME Zoo Wild Anim Med Ter Atual 1993:390–9.
- [20] da Paz RCR. Wildlife Cats Reproductive Biotechnology. *Curr Front Cryobiol* 2012. doi:10.5772/32464.
- [21] Ávila EC. Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de jaguatirica. Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- [22] Castelo TS, Silva AR. Eletroejaculação em mamíferos silvestres: principais fatores que afetam sua eficiência. *Rev Bras Reprodução Anim* 2015;38:208–13.
- [23] Wildt DE, Bush M, Howard JG, O’Brien SJ, Meltzer D, Van Dyk A, et al. Unique Seminal Quality in the South African Cheetah and a Comparative Evaluation in the Domestic Cat. *Biol Reprod* 1983;29:1019–25. doi:10.1095/biolreprod29.4.1019.
- [24] Farstad W, Fougner JA, Torres CG. The optimum time for single artificial insemination of blue fox vixens (*Alopex lagopus*) with frozen-thawed semen from silver foxes (*Vulpes vulpes*). *Theriogenology* 1992;38:853–65. doi:10.1016/0093-691X(92)90161-J.
- [25] Mascarenhas RM, Júnior MC, Borboleta LR, Ribeiro ECS, Bittencourt VL, Paula TAR. Condicionamento para coleta de sêmen através de manipulação digital em

- lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) 2002:2002.
- [26] Teodoro LO, Melo-Junior AA, Spencoski KM, Morais RN, Souza FF. Seasonal Aspects of Reproductive Physiology in Captive Male Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1815). *Reprod Domest Anim* 2012;47:250–5. doi:10.1111/rda.12071.
- [27] Souza MB, Mota Filho AC, Sousa CVS, Monteiro CLB, Carvalho GG, Pinto JN, et al. Triplex doppler evaluation of the testes in dogs of different sizes. *Pesqui Vet Bras* 2014;34:1135–40. doi:10.1590/S0100-736X2014001100017.
- [28] Davidson AP, Baker TW. Reproductive Ultrasound of the Dog and Tom. *Top Companion Anim Med* 2009;24:64–70. doi:10.1053/j.tcam.2008.11.003.
- [29] Samir H, Sasaki K, Ahmed E, Karen A, Nagaoka K, El Sayed M, et al. Effect of a single injection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and human chorionic gonadotropin (hCG) on testicular blood flow measured by color doppler ultrasonography in male Shiba goats. *J Vet Med Sci* 2015;77:549–56. doi:10.1292/jvms.14-0633.
- [30] Gunzel-Apel A-R, Mohrke C, Nautrup CP. Colour-coded and pulsed doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: Physiological and pathological findings. *Reprod Domest Anim* 2001;36:236–40. doi:10.1046/j.1439-0531.2001.00288.x.
- [31] England GCW, Bright L, Pritchard B, Bowen IM, de Souza MB, Silva LDM, et al. Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality. *Reprod Domest Anim* 2017;52:202–7. doi:10.1111/rda.12825.
- [32] Reis NR dos. Mamíferos do Brasil. In: Reis NR dos, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP de, editors. *Mamíferos do Bras.*, vol. 4. 01 ed., Londrina: 2006, p. 231–75. doi:10.6008/ess2179-6858.2013.001.0008.
- [33] WOZENCRAFT W. Order carnivora. In: WILSON DE, REEDER DM, editors. *Mammal species of the world.*, Washington: Smithsonian Institution Press; 1993, p. 279–348.
- [34] Fowler ME, Cubas ZS. *Biology, medicine and surgery of south american wild animals.* 1st ed. Iowa State University Press; 2001.
- [35] Bisbal F, Ojasti J. Nicho trófico del zorro *Cerdocyon thous* (Mammalia, Carnivora). *Acta Biol Venez* 1980;10:469–96.
- [36] Lucherini M. TIRL of TS 2015: e. T. *Cerdocyon thous*. IUCN Red List Threat Species 2015. doi:10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4248A81266293.en.

- [37] Vieira EM. Highway mortality of mammals in central Brazil. *Ciência e Cult* (Journal Brazilian Assoc Adv Sci 1996;48:270–2.
- [38] Cazetta E, Galetti M. The Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) as a secondary seed disperser of *Eugenia umbelliflora* (Myrtaceae) in a Restinga forest of southeastern Brazil. *Biota Neotrop* 2009;9:271–4. doi:10.1590/s1676-06032009000200027.
- [39] Queiroz JMG, Suzuki MCM, Motta APR, Nogueira JMR, Carvalho EM de. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. *Rev Fitos* 2015;9:87–100. doi:10.5935/2446-4775.20150008.
- [40] Brady CA. Reproduction, growth and parental care in Crab-eating foxes. *Int Zoo Yearb* 1978;18:130–4. doi:10.1111/j.1748-1090.1978.tb00243.x.
- [41] Moore HDM, Holt W V. Semen banking - is it now feasible for captive endangered species. *Oryx* 1988;22:172–8.
- [42] Morato RG, Rodrigues FHG, Eizirik E, Mangini PR, Azevedo FCC, Marinho-Filho J. Manejo e conservação de carnívoros neotropicais. 2nd ed. São Paulo: IBAMA; 2006.
- [43] Hawksworth DL, Bull AT. *Vertebrate Conservation and Biodiversity*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2007. doi:10.1007/978-1-4020-6320-6.
- [44] Fredrickson RJ, Siminski P, Woolf M, Hedrick PW. Genetic rescue and inbreeding depression in Mexican wolves. *Proc R Soc B Biol Sci* 2007;274:2365–71. doi:10.1098/rspb.2007.0785.
- [45] Faria-Corrêa M, Balbuena RA, Vieira EM, de Freitas TRO. Activity, habitat use, density, and reproductive biology of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and comparison with the pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) in a Restinga area in the southern Brazilian Atlantic Forest. *Mamm Biol* 2009;74:220–9. doi:10.1016/j.mambio.2008.12.005.
- [46] IUCN. 1987\_Iucn\_Policy\_Statement\_\_Captive\_Breeding.Pdf 1987.
- [47] Paula R., DeMatteo K. *Chrysocyon brachyurus* (errata version published in 2016). IUCN Red List Threat Species 2015. doi:10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.
- [48] Valadão M, Bastos LF, Castro CP. Atropelamentos de vertebrados silvestres em quatro rodovias no Cerrado, Mato Grosso, Brasil. *Multi-Science J* 2018;1:62–74.
- [49] Wildt DE. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. *Zoo Biol* 1989;8:17–20. doi:10.1002/zoo.1430080504.
- [50] Silva BLE da. Análise da presença e estratégias de conservação do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no estado do Rio de Janeiro. 2016.

- [51] Boichard D, Maignel L, Verrier É. The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genet Sel Evol* 2009;29:5. doi:10.1186/1297-9686-29-1-5.
- [52] Costa PDM, Martins CF. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. *Univ Ci S* 2008;6:39–55. doi:10.5102/ucs.v6i1.591.
- [53] Machado LC, Oliveira VC, Paraenti MD, Cardoso RNR, Martins DS, Ambrósio CE. Maintenance of Brazilian Biodiversity by germplasm bank. *Pesqui Vet Bras* 2016;36:62–6. doi:10.1590/S0100-736X2016000100010.
- [54] Hilsdorf AWS, Costa AM, Mittelman A, Salomão AN, Tombolato AFC, Martins ÁL, et al. *Conservação de Recursos Genéticos no Brasil*. 1st ed. Brasília: Embrapa; 2012.
- [55] Lockyear KM, MacDonald SE, Waddell WT, Goodrowe KL. Investigation of captive red wolf ejaculate characteristics in relation to age and inbreeding. *Theriogenology* 2016;86:1369–75. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.080.
- [56] Franklin AD, Waddell WT, Goodrowe KL. Red wolf (*Canis rufus*) sperm quality and quantity is affected by semen collection method, extender components, and post-thaw holding temperature. *Theriogenology* 2018;116:41–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.05.007.
- [57] Crosier AE, Pukazhenthil BS, Henghali JN, Howard J, Dickman AJ, Marker L, et al. Cryopreservation of spermatozoa from wild-born Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*) and influence of glycerol on cryosurvival. *Cryobiology* 2006;52:169–81. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.10.011.
- [58] Luther I, Jakob U, Lueders I, Tordiffe A, Franz C, Schiller J, et al. Semen cryopreservation and radical reduction capacity of seminal fluid in captive African lion (*Panthera leo*). *Theriogenology* 2017;89:295–304. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.10.024.
- [59] Gañá N, González R, Garde JJ, Martínez F, Vargas A, Gomendio M, et al. Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reprod Fertil Dev* 2009;21:848–59. doi:10.1071/RD08226.
- [60] Souza ALP, Lima GL, Silva AR. Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens. *Rev Bras Reprod Anim* 2014:98–102.
- [61] Silva HVR, Silva AR, da Silvada LDM, Comizzoli P. Semen Cryopreservation and

- Banking for the Conservation of Neotropical Carnivores. *Biopreserv Biobank* 2018;17:183–8. doi:10.1089/bio.2018.0104.
- [62] R'spoli VFP, Castro AL, Ambrósio CE. Avanços da clonagem em carnívoros. *Rev Bras Reproducao Anim* 2014;v, 38:43-48 p.
- [63] Sands J, Creel S. Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Anim Behav* 2004;67:387–96. doi:10.1016/j.anbehav.2003.03.019.
- [64] Goodrowe KL, Hay MA, Platz CC, Behrns SK, Jones MH, Waddell WT. Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1998;53:299–308. doi:10.1016/S0378-4320(98)00119-5.
- [65] Johnston SD, Ward D, Lemon J, Gunn I, MacCallum CA, Keeley T, et al. Studies of male reproduction in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Anim Reprod Sci* 2007;100:338–55. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.08.017.
- [66] Helle E, Kauhala K. Reproduction in the Raccoon Dog in Finland. *J Mammal* 1995;76:1036–46. doi:10.2307/1382597.
- [67] Yamamoto ME, Volpato GL. Rítmos biológicos. *Comport. Anim.* 2nd ed., Natal: 2011, p. 160–90.
- [68] Carvalho-Sousa CE, da Silveira Cruz-Machado S, Tamura EK. Os ritmos circadianos e a reprodução em mamíferos. *Bol Do Cent Biol Da Reprodução Da UFJF* 2008;26:15–21.
- [69] Sousa Neto JA, Castro BF de. Melatonina, ritmos biológicos e sono - uma revisão da literatura. *Rev Bras Neurol* 2008;44:5–11.
- [70] Forsberg M, Fougner JA, Hofmo PO, Madej M, Einarsson EJ. Photoperiodic regulation of reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). *Reproduction* 1989;87:115–23. doi:10.1530/jrf.0.0870115.
- [71] Brady CA, Ditton MK. Management and breeding of Maned wolves. *Int Zoo Yearb* 1979;19:171–6. doi:10.1111/j.1748-1090.1979.tb00557.x.
- [72] Asa CS, Seal US, Letellier M, Plotka ED, Peterson EK. Pinealectomy or Superior Cervical Ganglionectomy do not Alter Reproduction in the Wolf (*Canis Lupus*). *Biol Reprod* 1987;37:14–21. doi:10.1095/biolreprod37.1.14.
- [73] Porton IJ, Kleiman DG, Rodden M. A seasonality of Bush Dog Reproduction and the Influence of Social Factors on the Estrous Cycle. *J Mammal* 2006;68:867–71. doi:10.2307/1381569.
- [74] Beisiegel BDEM. Beatriz de mello beisiegel. *Etologia* 1999.

- [75] Leira MH, Reghim LS, Cunha LT, Ortiz LS, Paiva C de O, Botelho HA, et al. Bem-estar dos animais nos zoológicos e a bioética ambiental. *Pubvet* 2017;11:545–53. doi:10.22256/pubvet.v6n11.545-553.
- [76] Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004;82:863–70. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.03.056.
- [77] Braga DPDAF, Halpern G, Figueira RDCS, Setti AS, Iaconelli A, Borges E. Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril* 2012;97:53–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.10.011.
- [78] Koolhaas J., Korte S., De Boer S., Van Der Vegt B., Van Reenen C., Hopster H, et al. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:925–35. doi:10.1016/S0149-7634(99)00026-3.
- [79] Chrousos GP, Gold PW. The Concepts of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *JAMA J Am Med Assoc* 1992;267:1244–52. doi:10.1001/jama.1992.03480090092034.
- [80] Packard JM, Seal US, Mech LD, Plotka ED. Causes of Reproductive Failure in Two Family Groups of Wolves (*Canis lupus*). *Z Tierpsychol* 1985;68:24–40. doi:10.1111/j.1439-0310.1985.tb00112.x.
- [81] Collu R, Gibb W, Ducharme JR. Effects of stress on the gonadal function. *J Endocrinol Invest* 1984;7:529–37. doi:10.1007/BF03348463.
- [82] MacAdams MR, White RH, Chipps BE. Reduction of serum testosterone levels during chronic glucocorticoid therapy. *Ann Intern Med* 1986;104:648–51. doi:10.7326/0003-4819-104-5-648.
- [83] Van Kesteren F, Sillero-Zubiri C, Millar R, Argaw K, Macdonald DW, Paris M. Sex, stress and social status: Patterns in fecal testosterone and glucocorticoid metabolites in male Ethiopian wolves. *Gen Comp Endocrinol* 2012;179:30–7. doi:10.1016/j.ygcen.2012.07.016.
- [84] Wielebnowski N. Stress and distress: Evaluating their impact for the well-being of zoo animals. *J Am Vet Med Assoc* 2003;223:973–7. doi:10.2460/javma.2003.223.973.
- [85] Silva AR, Morato RG, Silva LDM. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim Reprod Sci* 2004;80:159–75.

- doi:10.1016/j.anireprosci.2003.10.001.
- [86] da Paz RCR. Reprodução assistida em canídeos e procionídeos neotropicais. *Rev Bras Reprodução Anim* 2015;39:77–82.
- [87] Howard JGS. Semen collection and analysis in carnivores. *Zoo Wild Anim. Med. Curr. Ther.* 3rd ed., Philadelphia: Saunders; 1993, p. 390-399.
- [88] Ohl DA, Sønksen J, Brackett NL, Lynne CM. Electroejaculation. *Curr Sex Reports* 2008;5:3–5.
- [89] Deco-Souza T, Mascarenhas R, Araujo G, Polli G. Protocolos de coleta de sêmen por eletroejaculação em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*). *Rev Bras Reprodução Anim* 2012;36:260–3.
- [90] Queiroz V de S. Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de Jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.
- [91] Souza T de D. avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de pumas (*Puma concolor*). Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- [92] Crosier AE, Howard J, Pukazhenthil BS, Wildt DE, Marker L, Henghali JN. Ejaculate traits in the Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*): Influence of age, season and captivity. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:370–82. doi:10.1071/RD06057.
- [93] Peres MA. Colheita e avaliação do sêmen do bicho-preguiça (*Bradypus sp.*) 2005:75.
- [94] FUMAGALLI F, VILLAGRAN M, DAMIÁN J, UNGERFELD R. Physiological and Biochemical Parameters in Response to Electroejaculation in Adult and Yearling Anesthetized Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*) Males. *Reprod Domest Anim* 2012;312:308–12. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01859.x.
- [95] ERDMANN R., JUVENAL J., MORAES W, CUBAS P, CARVALHO A. ., MOREIRA N. EXAME REPRODUTIVO EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775). *Arch Ceterinary Sci* 2005;10:75–9.
- [96] Juvenal JC, Erdmann RH, Moreira N, Moraes W De, Cubas H, Delgado LES, et al. Contenção farmacológica do gato-do-mato-pequeno, *Leopardus tigrinus*, para colheita de sêmen, pela associação de tiletamina zolazepam e xilazina. *Pesqui Veterinária Bras* 2008;28:541–6.
- [97] Luba C do N, Boakari YL, Costa Lopes AM, da Silva Gomes M, Miranda FR, Papa FO, et al. Semen characteristics and refrigeration in free-ranging giant

- anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *Theriogenology* 2015;84:1572–80. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.041.
- [98] Santos IP DOS. Avaliação dos efeitos da urina, osmolaridade, pH e uréiasobre o espermatozoidecanino 2007:51.
- [99] Carneiro FT, Dornellas e Silva DH, Trece AS, Carreta MJR, Oliveira AR, Paula TA rêgo de. Caracterização morfológica do sêmen de dois lobos-guaras da microrregião de Viçosa (*Chrysocion brachyurus*) 2011:37.
- [100] Stasiak K, Kondracki S, Iwanina M. Relationship of arctic fox (*Alopex lagopus L.*) sperm morphology with age of males, sperm concentration, ejaculate volume and acrosin activity. *Ann Anim Sci* 2018;18:741–52. doi:10.2478/aoas-2018-0023.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

**Tabela 5**

Resultados individuais e médios (DV), das características seminais de cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), avaliados pelo *Computer-Assisted Sperm Analysis – CASA*.

Animal	Ejaculado	VT ( $\mu\text{L}$ )	Conc. (x 10 <sup>6</sup> /mL)	Sptz (x 10 <sup>6</sup> espermatozoides)	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP $\mu\text{m/s}$	VSL $\mu\text{m/s}$	VCL $\mu\text{m/s}$	ALH $\mu\text{m/s}$	BCF Hz	STR %	LIN %
A	1	80	152,20	12.176	67	42	52	82,50	68,20	121,40	5,40	27,30	82,00	58,00
	2	480	2242,50	1.076.400	69	55	51	56,60	72,10	159,90	5,50	22,80	83,00	55,00
	3	720	138,70	99.864	80	58	71	95,00	77,90	146,30	7,00	21,00	89,00	67,00
	4	500	425,00	212.500	73	52	63	98,60	82,90	140,60	5,90	22,00	83,00	60,00
	5	102	242,00	24.684	70	53	64	102,60	84,80	164,90	6,80	25,00	82,00	54,00
	6	450	259,00	116.550	57	43	50	109,60	93,30	162,30	6,50	23,90	84,00	59,00
Média (DV)		388,7 (249,6)	576,6 (822,5)	275,3 (397,0)	69,3 (7,6)	50,5 (6,5)	58,5 (8,7)	90,8 (19,0)	79,9 (9,1)	149,2 (16,7)	6,2 (0,7)	23,7 (2,3)	83,8 (2,6)	58,8 (4,6)
B	1	470	421,0	197.870	73	50	62	106,80	89,10	159,80	6,40	25,00	82,00	57,00
	2	500	88,2	44.100	66	46	54	90,30	77,30	140,00	6,00	26,10	85,00	57,00
	3	440	210,7	92.708	72	50	61	95,30	78,30	154,80	6,70	24,80	82,00	53,00
	4	490	1095,0	536.550	67	47	54	87,80	75,20	139,80	5,90	27,80	85,00	56,00
	5	210	177,0	37.170	68	50	60	104,50	86,90	168,00	7,10	26,20	82,00	53,00
	6	310	161,0	49.910	64	49	53	85,30	75,60	132,80	5,80	25,60	88,00	60,00
	7	360	417,0	150.120	58	40	48	99,80	82,40	165,20	7,50	25,50	81,00	51,00
Média (DV)		397,1 (108,3)	367,1 (345,5)	158,22 (373,6)	66,9 (5,0)	47,4 (3,6)	56,0 (5,1)	95,7 (8,3)	80,7 (5,6)	151,5 (13,9)	6,5 (0,6)	25,9 (1,0)	83,6 (2,5)	55,3 (3,1)
Média (DV)		393,2 (178,4)	463,7 (594,4)	217,4 (304,0)	68,0 (6,2)	48,8 (5,1)	57,2 (6,8)	93,4 (13,9)	80,3 (7,1)	150,4 (14,6)	6,3 (0,7)	24,8 (2,0)	83,7 (2,5)	56,9 (4,1)

Abreviações: DV: desvio padrão; Conc: concentração; Vol.: volume; MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; RAP: rápidos; VAP: velocidade de trajeto; VSL: velocidade progressiva; VCL: velocidade curvilinear; ALH: amplitude do deslocamento lateral de cabeça; BCF: frequência de batimentos de cauda; STR: retilinearidade; LIN: linearidade.

## ANEXO 2



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 60086-2	Data da Emissão: 25/03/2019 16:55:29	Data da Revalidação*: 25/03/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Jaqueline Candido de Carvalho	CPF: 307.204.048-60
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO	CNPJ: 48.031.918/0020-97

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colheita de semente e avaliação	02/2019	09/2019
2	Planejamento de dados e elaboração de defesa	10/2018	05/2019
3	Colheita de semente e avaliação das amostras	08/2017	10/2018

#### Observações e ressalvas

1	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
2	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
3	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
4	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, biosspecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Centro de manutenção e pesquisa de animais selvagens	Botucatu-SP	Cerrado	Não	Fora de UC Federal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n.º 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0600860220190325

Página 1/3