



## Biotecnologías reproductivas en el macho de felinos silvestres: la revisión

### Wild felids reproductive biotechnology in the male: a review

Mónica Madrigal-Valverde<sup>1,2,\*</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>3</sup>, Gediendson Ribeiro de Araujo<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Escuela de Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos, 223-21001, Alajuela, Costa Rica, +506 – 22340869, [mmadrigal@itcr.ac.cr](mailto:mmadrigal@itcr.ac.cr)

<sup>2</sup> Escuela de Zootecnia, Universidad de Costa Rica, Campus Rodrigo Facio, San Pedro, San José, +506 – 22340869, [monica.madrigalvalverde@ucr.ac.cr](mailto:monica.madrigalvalverde@ucr.ac.cr)

<sup>3</sup> Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 40170-110, Salvador, Bahia, Brasil, +55 - 71-32836705, [rjb@ufba.br](mailto:rjb@ufba.br)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79074460, Mato Grosso do Sul, Brasil, +55 – 67 3345 3000, [gediendson@gmail.com](mailto:gediendson@gmail.com)

\*Correspondencia: [mmadrigal@itcr.ac.cr](mailto:mmadrigal@itcr.ac.cr); [monica.madrigalvalverde@ucr.ac.cr](mailto:monica.madrigalvalverde@ucr.ac.cr)

Rec.: 02.10.2021 Acept.: 06.04.2021

Publicado el 30 de diciembre de 2021

#### Resumen

Las especies de felinos silvestres se encuentran en situación vulnerable o de peligro de extinción alrededor del globo, de ahí los esfuerzos de los investigadores en aspectos de reproducción con especímenes en cautiverio o bien colecta de material genético de animales silvestres para su multiplicación en cautiverio. El objetivo de esta investigación bibliográfica, es la compilación, ordenamiento y sistematización de la información científica pertinente al tema de biotecnologías reproductivas en felinos silvestres. La presente revisión se realizó compilando información publicada *on line* sobre el tema por un periodo de 18 meses, esta se sintetizó y agrupó en subtemas. Dentro de los tópicos a destacar se encuentra el enfoque del progenitor macho, lo cual permite una mayor dispersión del material genético comparado con la hembra, dentro de las tecnologías en reproducción se encuentran la colecta, análisis y criopreservación del semen, así como la medición de características físicas de los animales, correlacionadas con aspectos reproductivos. Los principales hallazgos indican que la investigación de metodologías como: colecta seminal por cateterización uretral, el desarrollo de protocolos de crio preservación y análisis mediado por computadora del comportamiento espermático; son las biotecnologías emergentes que permiten ampliar conocimiento sobre la reproducción de los felinos. No obstante, se debe considerar para investigaciones futuras que los procesos deben adaptarse para el trabajo *in situ*. En conclusión, la generación de información de biotecnologías reproductivas es un aspecto fundamental para el apoyo a poblaciones escasas para evitar la

eliminación de especímenes de su hábitat natural o bien reinscripción en el mismo.

**Palabras clave:** reproducción asistida, conservación, colecta de semen, gato, andrología.

#### Abstract

Wild cat species are often in a vulnerable or endangered situation around the globe. One of the questions on which the researchers' efforts have focused is on aspects of reproduction with specimens in captivity, or on collecting genetic materials from wild animals for their multiplication in captivity. The objective of this review was compilation, ordering and synthesis of scientific information about biotechnologies in wild cats. This review was carried out compiling information published online on the subject for a period of 18 months; the information was synthesized and grouped into subtopics. Among the topics to highlight focus in the male parent approach allows for greater dispersal of genetic material compared to the female parent. During the application of technologies that assist reproduction, the collection, analysis and cryopreservation of semen is carried out, as well as the measurement of physical characteristics of the animals correlated with reproductive aspects. The main findings indicate that the investigation of methodologies such as seminal harvest by urethral catheterization, the development of cryopreservation protocols, and computer-assisted analysis of spermatid behavior are emerging biotechnologies, which allow expanding knowledge about the reproduction of felids. However, it should be considered for future

research that the processes must be adapted for *in situ* work. In conclusion, the generation of information on these reproductive biotechnologies is a fundamental aspect for supporting sparse populations, to avoid the removal of specimens from their natural habitat, or the reintegration into it.

**Keywords:** *assisted reproduction, conservation, semen harvest, cats, andrology.*

### Introducción

La relevancia de encontrar estrategias para la reproducción de felinos silvestres, tiene como base que las especies de la familia Felidae se encuentran dentro las más amenazadas, inclusive en Brasil (Reis *et al.*, 2006; ICMBio/MMA, 2018). El peligro en el que se encuentran estas especies se debe al crecimiento de la población humana dentro de sus hábitats naturales, lo que consecuentemente provoca cambios en las poblaciones, llegando a fragmentarse (Wultsch *et al.*, 2016). La situación anterior representa una amenaza para todo el ecosistema, ya que al perder comunidades de animales que regulan las poblaciones de especies herbívoras, las cuales a su vez regularizan las poblaciones vegetales, significa un colapso ambiental a mediano o largo plazo (Reis *et al.*, 2006).

Debido a que los felinos silvestres tienen complicaciones reproductivas que impiden su rápida reproducción tales como una precoz senescencia reproductiva y un bajo número de crías por camada; es requerido el mantenimiento de poblaciones (Moreira, 2017) utilizando como herramienta para ello la reproducción asistida. Por lo anterior desde diversos frentes se han tomado medidas para evitar la desaparición de especies carnívoras en todo el mundo (Pukazhenthil & Wildt, 2004; Micheletti *et al.*, 2011). La información de la fisiología reproductiva básica es esencial para desarrollar y aplicar sistemas de reproducción asistida, como lo son la inducción a la ovulación y la generación de bancos de germoplasma (Swanson *et al.*, 1996). Para que las técnicas de reproducción asistida puedan desempeñar un papel significativo en la conservación es esencial que las técnicas fundamentales de inseminación artificial (IA), transferencias de embriones (TE), crio preservación de semen, primeramente, sean desarrolladas con base en estudios sistemáticos (Moreira, 2017). Por lo anterior, en la presente revisión se compila información de las biotecnologías reproductivas, enfocándose en el progenitor macho, lo cual permite una mayor dispersión del material genético en comparación con la hembra. Dentro de las tecnologías que asisten la reproducción se encuentra la colecta, análisis y crio preservación

del semen, así como la medición de características físicas de los animales correlacionadas con aspectos reproductivos.

### Materiales y métodos

#### Recopilación de información

La recopilación de literatura para la confección de la presente revisión, se realizó en un periodo de 18 meses (junio 2018 - diciembre 2019). Los documentos de texto utilizados se encontraron mediante la plataforma Portal de Periódicos CAPES/MEC de la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES), perteneciente al gobierno de la República Federativa de Brasil. El acervo de dicha plataforma cuenta con 266 registros de bases de datos. Cabe resaltar que las palabras claves que se recopilaron en la mayoría de documentos fueron: felino, jaguar, semen y gato. No obstante, se excluyó de esta revisión bibliográfica los trabajos enfocados en felinos domésticos, ya que relataban métodos no aplicables a felinos silvestres, así como trabajos de naturaleza de estudios clínicos de caso.

**Revisión de textos:** El presente trabajo recopila la literatura científica disponible sobre el tema de biotecnologías reproductivas empleadas para coleccionar, analizar y conservar el material genético de felinos silvestres. Los esfuerzos realizados por los especialistas en reproducción, para la conservación de las especies, consisten en viabilizar la multiplicación de la especie en condición vulnerable o en peligro de extinción, a través del estudio y empleo de biotecnologías reproductivas en los animales machos. Esta revisión bibliográfica se encuentra dividida en las siguientes ocho secciones: inicialmente se introduce el tema de la i) Reproducción asistida; posteriormente se abarcan los contenidos de evaluación reproductiva del macho, contemplando la ii) Biometría corporal y testicular, así como los iii) Análisis Complementarios y por último, se explica de manera amplia el trabajo realizado alrededor del mundo acerca de las biotecnologías reproductivas de vi) Colecta del semen de felinos, vii) Acondicionamiento y análisis de semen de felinos, refrigeración y crio preservación del semen, viii) análisis seminal computarizado y citometría de flujo.

### Resultados

**Reproducción asistida:** Los recientes avances en la reproducción del gato doméstico, demuestran la manera en que estas metodologías pueden ser empleadas en programas de conservación de la vida silvestre (Goodrowe *et al.*, 2010). Los métodos para

la colecta de semen se basan en la utilización de una vagina artificial y un electroeyaculador. Estas técnicas permiten la evaluación de la calidad seminal dentro de los cuales se encuentran parámetros como volumen, motilidad celular, concentración de espermatozoides y morfología celular. Adicionalmente se han utilizado sistemas de análisis computarizados para la evaluación del espermatozoide felino y análisis seminal (CASA) (Root, 2010; Madrigal-Valverde *et al.*, 2019).

La reproducción asistida se ha convertido en la herramienta elegida para combatir la infertilidad animal (Mattos, 2001). El desarrollo y aplicación de nuevas técnicas para la reproducción asistida, ayuda a mejorar el manejo de la población y la crianza de felinos latinoamericanos en cautiverio, logrando enfrentar algunos de los desafíos de manejo y conservación (Moreira, 2017). Estos avances fortalecen una ruta alternativa para el intercambio de material genético de poblaciones entre países (Swanson & Brown, 2004). No obstante, para que estas técnicas sean empleadas plenamente se requiere una mejor comprensión de la reproducción de los felinos silvestres, con el fin de obtener el desempeño reproductivo buscado (Erdmann, 2005; Micheletti *et al.*, 2011). En Latinoamérica los programas de entrenamiento en ciencias reproductivas contribuyen con investigaciones básicas y establecen estudios científicos altamente calificados para la conservación de los felinos silvestres (Swanson & Brown, 2004). Entre las biotecnologías que pueden ser utilizadas para la preservación y reproducción de animales en peligro de extinción se encuentran la inseminación artificial (IA), las transferencias de embriones (TE), la fertilización *in vitro* (FIV), la crío preservación, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), el clonaje y la colecta de folículos pre-antrales (Mattos, 2001; Micheletti *et al.*, 2011).

En cuanto a las biotecnologías reproductivas empleadas en felinos silvestres figura la colecta y refrigeración de semen en *Leopardus tigrinus* (Angrimani *et al.*, 2017; Juvenal *et al.*, 2008; Angrimani *et al.*, 2017); la colecta de semen asociada a dosaje de andrógenos en sangre y en heces para *Leopardus pardalis*, *L. wiedii* y *L. tigrinus* (Morais *et al.*, 2002); la crío preservación de semen en *L. tigrinus* (Erdmann, 2005; Baudi *et al.*, 2008) y colecta de semen en jaguares por diferentes técnicas de colección (Morato *et al.*, 1998; Morato *et al.*, 2001; Araujo Paula *et al.*, 2008).

Para el empleo de tecnologías como IA se requiere la colecta de semen de calidad (Howard & Wildt, 2009). Para este procedimiento en felinos, generalmente, ha sido utilizada la electroeyaculación y la técnica reciente de colecta farmacológica asociada al cateterismo uretral (Moreira, 2017; Araujo *et al.*, 2018; Madrigal-Valverde *et al.*, 2019). Debido a la importancia de la

calidad del material genético del animal macho, el cual es predominante debido a la dispersión del material genético, el semen debe ser recolectado y examinado de una manera cuidadosa.

**Evaluación corporal y testicular:** La evaluación corporal y testicular puede realizarse mediante la biometría corporal y morfofisiología corporal, ya que los anteriores parámetros tienen asociaciones con aspectos de comportamiento reproductivo y por tanto con el desarrollo de protocolos de reproducción asistida (Sarti *et al.*, 2009). En un principio debe examinarse la condición general del felino (Morato *et al.*, 2001), el peso corporal registrado (Gañán *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2002) y los parámetros biométricos medidos, tales como largo de cola, largo de la cabeza más el cuerpo, largo total (Auricchio & Salomão, 2002) y el diámetro torácico (Sarti *et al.*, 2009; Madrigal-Valverde *et al.*, 2019). Adicionalmente se debe realizar una evaluación específica del sistema genital, con la inspección del pene y el prepucio del felino (Morais *et al.*, 2002). Finalmente, deben ser examinados los testículos, evaluando su consistencia (si son flácidos, normales o túrgidos) y sus dimensiones medidas con un pie de rey (largo, ancho, espesor). Estos parámetros son combinados para obtener el volumen testicular (Barone Roelke *et al.*, 1994; Morato *et al.*, 2001; Morais *et al.*, 2002; Barros, 2005; Gañán *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2010) por medio de la fórmula de la elipse. El grosor de un pliegue doble de la piel del escroto también debe ser medida y descontada de las dimensiones testiculares (Sarti *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2010).

Los resultados de la biometría testicular se encuentran altamente correlacionados con el peso real testicular y son empleados para estimar la masa corporal ubicada en las gónadas (índice gonadosomático) (Sarti *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha observado que algunos parámetros de biometría testicular se encuentran asociados a características seminales (Macedo *et al.*, 2011), tales como la producción espermática (Peixoto *et al.*, 2016).

**Análisis para la evaluación complementaria:** En la evaluación de felinos silvestres reproductores, las características endócrinas son rutinariamente evaluadas, entre ellas se encuentra la evaluación de testosterona sérica y metabolitos sanguíneos como el cortisol (Barone *et al.*, 1994; Barros *et al.*, 2016; Gañán *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2002; Morato *et al.*, 2004), así como la detección y medición de andrógenos en muestras fecales (Morais *et al.*, 2002; Morato *et al.*, 2004). Otro de los análisis complementarios que se realizaron es la ecografía y con ella se busca determinar características del testículo y del epidídimo (Ahmad & Noakes, 1995). El uso de ultrasonido también es una herramienta importante, por ejemplo, para la

evaluación del tracto reproductivo masculino del felino, debido a que con la información obtenida por medio del ultrasonido se puede confirmar la anatomía normal o determinar condiciones patológicas de este (Davidson & Baker, 2009).

**Colecta de semen en felinos:** la colecta de semen es el inicio primordial para conservar y almacenar el material seminal. En felinos puede ser utilizada la electroeyaculación, la vagina artificial, el cateterismo uretral, el lavado de la vagina poscoital y la recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo posterior a la orquiectomía o muerte del animal. La colecta de semen mediante un electroeyaculador es el método más utilizado en felinos silvestres (Martins & Justino, 2015). En este proceso se requiere de un equipo costoso; además, existe el riesgo de contaminación por orina (por relajamiento del colovesical) (Martins & Justino, 2015), además se da la dilución del semen por secreción prostática y la mayoría de los animales llegan a presentar una fuerte contracción muscular (Lueders *et al.*, 2012). El protocolo de estímulos eléctricos utilizados para la electroeyaculación contempla tres series de estímulos: 30, 30 y 20, de 2-6 voltios, con un descanso entre series de 10 minutos. Por otra parte, la cateterización uretral es una técnica de reciente desarrollo para la colecta de espermatozoides felinos, esta consiste en la introducción de una fina sonda uretral, posterior a la sedación del animal (Zambelli *et al.*, 2010; Martins & Justino, 2015; Swanson *et al.*, 2017), en asociación con un alfa 2- adrenérgico (analgésico y sedante). De esta manera se logra la estimulación de un adrenoreceptor en los ductores deferentes y se produce la eliminación uretral de espermatozoides de alta calidad, evitando la contaminación por orina, comúnmente encontrada en la electroeyaculación. Dicha técnica ha sido exitosa para la colecta de semen en *Panthera onca*, *Leopardus wiedii* y *Herpailurus yagouaroundi* (Araujo *et al.*, 2018; Madrigal-Valverde *et al.*, 2019).

**Acondicionamiento y análisis seminal convencional:** En cuanto al semen del felino, este debe ser colectado en un recipiente estéril y mantenido a 37 °C (Tipkantha *et al.*, 2017). Los parámetros macroscópicos de aspecto y coloración del material deben ser inmediatamente examinados, así mismo el volumen de la eyaculación debe ser medido por medio de un tubo graduado o micropipeta (Barone *et al.*, 1994; Morato *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2000; Morato *et al.*, 2001; Gañán *et al.*, 2009; Zambelli *et al.*, 2010). El pH seminal debe evaluarse inmediatamente posterior a la colecta, mediante el uso de cintas medidoras de pH (Morato *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2000; Angrimani *et al.*, 2017, Tipkantha *et al.*, 2017). Cabe destacar que los protocolos contemplados previamente a la evaluación microscópica son la previa dilución de la muestra y

la centrifugación (Zambelli *et al.*, 2010; Lueders *et al.*, 2012; Angrimani *et al.*, 2017; Tipkantha *et al.*, 2017). Respecto a las características microscópicas espermáticas felinas, tienen especial énfasis la motilidad y la morfología celular, las cuales son afectadas por los protocolos de crío preservación (Luvoni *et al.*, 2003b). En ese contexto las evaluaciones microscópicas del semen en felinos deben incluir el análisis de mortalidad, vigor espermático, concentración y morfología celular (Barone *et al.*, 1994; Morato *et al.*, 2001; Morato *et al.*, 2004; Gañán *et al.*, 2009; Martins & Justino, 2015).

Al igual que en las especies domésticas, la motilidad espermática de los felinos es evaluada colocando una alícuota de 10 µl en un portaobjetos, la muestra es cubierta por un cubreobjetos y observada con un microscopio. Seguidamente se analiza el porcentaje de células móviles y la intensidad del movimiento o vigor espermático, en este caso, utilizando una escala de 1-5 (Barone *et al.*, 1994; Morato *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2000; Morais *et al.*, 2002; Baudi *et al.*, 2008; Gañán *et al.*, 2009; Zambelli *et al.*, 2010; Angrimani *et al.*, 2017; Buranaamnuay, 2017; Swanson *et al.*, 2017). La morfología celular es examinada por medio de un frotis de la muestra, evaluando 200 células en microscopía óptica a un aumento de 1000X, comúnmente es utilizado colorante como la eosina (Jimenez *et al.*, 2013), además de preparaciones húmedas de solución salina y formaldehído (Paz *et al.*, 2000) o glutaraldehído (Barone *et al.*, 1994, Baudi *et al.*, 2008; Tipkantha *et al.*, 2017). Los defectos observados en las células son clasificados como mayores y menores (Barone *et al.*, 1994; Paz *et al.*, 2000; Gañán *et al.*, 2009; Martins & Justino, 2015). La concentración espermática del felino puede ser evaluada utilizándose una cámara de Neubauer (Morato *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2000). Por su parte, la viabilidad estructural de la célula espermática se evalúa mediante su permeabilidad al colorante eosina-nigrosina (Angrimani *et al.*, 2017). A su vez, la integridad funcional de la membrana plasmática puede ser examinada con una prueba hiposmótica, ya que se ha establecido que esta prueba es altamente predictiva de la capacidad de fertilización del semen (Comercio *et al.*, 2013).

**Refrigeración y crío preservación del semen:** Posterior a los análisis macro y microscópicos, la muestra es sometida a una segunda dilución, la cual puede ser realizada en una o dos etapas. Por un lado, en la dilución de una etapa, el diluidor que contiene glicerol es adicionado a la muestra hasta alcanzar la concentración de espermatozoides deseada. Por otro lado, en la dilución en dos etapas, inicialmente se realiza una dilución a temperatura ambiente y la segunda posterior al tiempo de equilibrio (4-5°C) (Buranaamnuay, 2017). El semen procedente de felinos

puede preservarse utilizando métodos que involucren bajas temperaturas, estos son la refrigeración a una temperatura entre 4 y 15 °C y el congelamiento a una temperatura de -196°C. El método de refrigeración provoca un menor daño a las células espermáticas, pero tiene un periodo de almacenamiento corto (72 horas a 5 °C); sin embargo, cabe mencionar que es durante las primeras 24 horas que ocurre el mayor daño a la muestra, como lo es la disminución de los parámetros de movimiento espermático y el aumento en la proporción de alteraciones morfológicas (Martins & Justino, 2015). La criopreservación por su parte, ofrece un enorme potencial para el manejo de material genético de felinos en extinción (Buranaamnuay, 2017). No obstante, esta técnica requiere del desarrollo de protocolos de criopreservación que sean adecuados para su uso en el campo, así como aplicables en las diferentes especies, cuyo resultado de motilidad y viabilidad espermática pos descongelamiento sean aceptables (Swanson *et al.*, 1996). La criopreservación espermática de felinos presenta dificultades que van desde el momento de la colecta de semen hasta el proceso efectivo de la criopreservación (Martins & Justino, 2015).

Los protocolos para el enfriamiento de muestras seminales felinas, como por ejemplo la recongelación, presentan variación en la dilución de una o dos etapas (Buranaamnuay, 2017) y en la duración de la curva de refrigeración; en la literatura estudiada se encontraron distintas metodologías en las cuales las muestras son mantenidas a temperaturas de 4-5°C por 15 minutos o hasta por 2.5 horas (Baudi *et al.*, 2008; Jimenez *et al.*, 2013; Luvoni *et al.*, 2003b; Paz *et al.*, 2000; Swanson *et al.*, 1996). Luego de someter las muestras a la curva de refrigeración, se inicia la curva de congelamiento (Madrigal-Valverde *et al.*, 2019). El recipiente de almacenamiento utilizado con mayor regularidad para la criopreservación de semen son las pajillas de 0.25 MI (Paz *et al.*, 2000; Gañán *et al.*, 2009) las cuales son colocadas horizontalmente (Paz *et al.*, 2000; Luvoni *et al.*, 2003b; Buranaamnuay, 2017) en vapor de nitrógeno líquido, por unos 10 a 20 minutos (Swanson *et al.*, 1996). Posteriormente, a una altura de lámina líquida de seis centímetros, son colocados directamente en el nitrógeno líquido a -196°C. Durante la congelación-descongelación del semen felino, ocurren daños importantes en los espermatozoides, lo cual disminuye la capacidad de fertilización, por lo tanto, los daños provocados por el frío representan un factor limitante para la conservación del semen, particularmente de felinos, debido a que frecuentemente determina cambios en la morfología espermática (teratospermia) (Luvoni *et al.*, 2003).

Respecto al descongelamiento del semen, las

pajillas son expuestas a temperatura ambiental por 10 segundos, seguidamente, se colocan en agua a una temperatura de 37-39°C, por un periodo de 30 segundos a un minuto (Buranaamnuay, 2017; Jimenez *et al.*, 2013; Paz *et al.*, 2000; Swanson *et al.*, 2017). Las muestras descongeladas, pueden ser sometidas a centrifugación, con el sobrenadante aspirado y descartado para renovar el crioprotector (Baudi *et al.*, 2008; Swanson *et al.*, 2017). Luego de ser descongeladas, las muestras se evalúan en relación con la motilidad y el vigor espermático (Paz *et al.*, 2000).

**Análisis seminal computarizado:** Los sistemas de análisis seminal computarizado (CASA) son dispositivos que consisten en un microscopio de contraste de fases, una cámara digital, un digitador de imágenes y una computadora para guardar y analizar las imágenes. Estos dispositivos funcionan capturando el movimiento celular, reconstruyendo las trayectorias de los espermatozoides y la posición de estos en animaciones sucesivas, así mismo calcula varios parámetros de motilidad y concentración simultáneamente (Rijsselaere *et al.*, 2012).

Un recurso de reproducción incluido en la mayoría de estos dispositivos permite la proyección de las secuencias de vídeo del último campo evaluado, ofreciendo un control adicional para validar si todos los espermatozoides fueron identificados y si su trayectoria fue reconstruida correctamente (Rijsselaere *et al.*, 2012). Los análisis de los parámetros de cinética espermática, realizados sin la participación de los CASA, presentan subjetividad variando en el resultado hasta un 60% entre los evaluadores. Por esta subjetividad, fueron desarrollados los CASA; no obstante, el uso del CASA es limitado debido a la necesidad de validar los datos como el control en la calidad y padronización de los análisis (Matos *et al.*, 2008). Los sistemas CASA han sido utilizados para el análisis espermático de carnívoros (Bois *et al.*, 2012; Nizański *et al.*, 2012). El análisis espermático en sistema CASA es implementado en asociación con la citometría de flujo, ampliando la cantidad y la calidad de los datos (Leite *et al.*, 2010), estas pueden ser utilizadas de forma complementaria con la información obtenida por una evaluación convencional (Barrier *et al.*, 2017).

La información generada por los sistemas CASA también se ha utilizado para establecer subpoblaciones espermáticas, ampliando así el conocimiento sobre las características de las poblaciones celulares que componen los eyaculados (Muiño *et al.*, 2008). En felinos, los sistemas CASA fueron utilizados para la evaluación objetiva seminal (Matos *et al.*, 2008; Madrigal-Valverde *et al.*, 2019), pero a su vez, son pocas las investigaciones que utilizan este sistema,

a pesar de producir informaciones innovadoras para el estudio reproductivo de estas especies (Filliers *et al.*, 2008; Sienieniuch & Woclawek-Potocka, 2008; Stachecki *et al.*, 1993; Prochowska *et al.*, 2015). En relación con lo anterior, cabe señalar que ha sido reportado el análisis del semen del gato doméstico y felinos silvestres asociando los sistemas CASA y los resultados de la citometría de flujo (Sienieniuch & Woclawekpotocka, 2008; Villaverde *et al.*, 2009, Madrigal-Valverde *et al.*, 2019). Igualmente, se han encontrado subpoblaciones espermáticas en muestras seminales del gato doméstico, caracterizadas por su alta velocidad y progresividad (Contri *et al.*, 2012).

**Citometría de flujo:** La citometría de flujo es una herramienta de análisis de laboratorio que es utilizada actualmente en áreas de las ciencias de la salud, tales como medicina, biomedicina y bioquímica; así como en investigaciones ambientales y biológicas. Una de las ventajas de esta herramienta es el análisis a una muestra representativa, esto debido a que simultáneamente son analizadas miles de células (Córdova *et al.*, 2016). La utilización de sondas fluorescentes como yoduro de propidio y naranja de acridina (Partykaa *et al.*, 2010) sirve para estimar la fertilidad espermática, determinando una serie de parámetros que, en conjunto, pueden predecir la fertilidad de la muestra (Barrier *et al.*, 2017; Padrik *et al.*, 2012). En el análisis seminal, la citometría de flujo logra establecer niveles de daño a la membrana plasmática y a las membranas acrosomales (Leite *et al.*, 2010), adicional a la evaluación de la actividad mitocondrial (Partykaa, Nizańskib & Łukaszewicza, 2010). En los felinos domésticos y silvestres, se tiende a utilizar la citometría para el análisis de la membrana plasmática con el empleo de la sonda de yoduro de propidio, (Sunigama & Meyers, 2012, Sienieniuch & Woclawek-Potocka, 2008). En felinos amenazados, la citometría de flujo es una herramienta de gran utilidad en la evaluación seminal (Spinaci *et al.*, 2007, Madrigal-Valverde *et al.*, 2019). Las variaciones seminales reportadas utilizando citometría de flujo pueden ser empleadas para detectar diferencias entre los eyaculados e inclusive para detectar variaciones estacionales (Malama *et al.*, 2017). La observación conjunta de microscopía convencional, los sistemas CASA y la citometría de flujo, han sido utilizados para el análisis amplio de los parámetros espermáticos (Barrier *et al.*, 2017).

### Discusión

La evaluación reproductiva de especímenes machos en felinos silvestres, asociado a la colecta y análisis seminal, utilizando técnicas convencionales y computarizados (Madrigal-Valverde *et al.*, 2019),

permite una mejor caracterización y entendimiento de la andrología de estas especies. Es posible así el desarrollo de metodologías que apuntan a la conservación y multiplicación de los individuos que son amenazados por la extinción.

Dentro de las tecnologías que asisten la reproducción se encuentran la colecta, análisis y criopreservación del semen, así como la medición de características físicas de los animales correlacionadas con aspectos reproductivos. Los principales hallazgos indican que la investigación de metodologías, como la colecta seminal por cateterización uretral, el desarrollo de protocolos de criopreservación y el análisis mediado por computadora del comportamiento espermático, son las biotecnologías emergentes, permiten ampliar el conocimiento sobre la reproducción de los felinos.

No obstante, por una parte se debe considerar para investigaciones futuras que los procesos deben adaptarse para el trabajo *in situ*. Por lo que, la biometría y el análisis seminal convencional cobran importancia, para el análisis en el campo o propiamente en el recinto del animal.

Por otra parte, uno de los cuidados esenciales para la utilización de biotecnologías reproductivas en felinos silvestres, es que se debe usar con anterioridad un modelo felino, en este caso individuos de gato doméstico, en donde sean cuantificadas y descritas las técnicas, aunado a sus complicaciones, así como sus ventajas. Posterior a la obtención y análisis de resultados en la especie doméstica, los investigadores pueden proceder a adaptar las metodologías en felinos silvestres.

### Conclusiones

Debido a la importancia biológica que representan los felinos en su hábitat, así como la amenaza latente de estos, diversos equipos de científicos han unido esfuerzos para aumentar la diversidad genética de los individuos, tanto en vida natural como en cautiverio. Por lo tanto, realizar una colecta seminal de calidad por medio de métodos que provoquen el mínimo estrés en el animal y utilizar métodos de conservación de este semen hasta su depósito en la hembra, son los grandes focos de investigación y desarrollo en relación con este tema.

### Literatura citada

- Ahmad, N., and Noakes, D.E. (1995). A clinical and ultrasonographic study of induced testicular and epididymal lesions in goats and a ram. *Animal Reproduction Science*, 39 (1), 35-48.
- Angrimani, D.S.R., Barros, P.M.H., Losano, J.D.A.,

- Cortada, C.N.M., Bertolla, R.P., Guimarães, M.A.B.V., Correa, S.H.R., Barnabe, V.H., and Nichi, M. (2017). Effect of different semen extenders for the storage of chilled sperm in Tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*, 89 (1), 146–154.
- Araujo, G.R., Paula, T.A.R., Deco-Souza, T., Morato, R.G., Bergo, L.C.F., Silva, L.C., Costa, D.S. and Braud, C. (2018). Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. *Animal Reproduction Science*, 195 (1), 1-7.
- Auricchio, I. e Solamão, M. G. (2002). Técnicas de colheita e preparação de vertebrados para fins científicos e didáticos. São Paulo: Instituto Pau Brasil de História Natural.
- Azevedo, M.E.F., De Paula, T.A.R., Da Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Da Costa, E.P., Costa, S.S., and Peixoto, J.V. (2010). Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). *Animal Reproduction Science*, 118(1), 83-88.
- Barone, M.A., Roelke, M.E., Howard, J., Brown, J.L., Anderson, A.E., and Wildt, D.E. (1994). Reproductive characteristics of male Florida panthers: comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American zoos. *Journal of Mammalogy*, 75(1), 150-162.
- Barrier, I., Kenpfer, A., Lenasson, N., Chevrier, L., and Camugli, S. (2017). Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*, 97 (1), 186-200.
- Barros, C.V., Galvão, N.M., Croce, S.L., Teles, T.F.F., Souza, T.A., Araújo, V.D., Moreno, V.H., Rocha, V.L., Godoy, G.S., Ferreira, S.P., Carvalho, T.P.A., and Angrimani, D.S.R. (2016). Infertility diagnosis in jaguar (*Panthera onca*): case report. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, 53 (3), 1-3.
- Barros, J.B.G. (2005). Análise morfofuncional do testículo e da espermatogênese de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos. 2005. 77p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa.
- Baudi, D.L.K., Jewgenow, K., Pukazhenth, B.S., Sperscoski, K.M., Santos, A.S., Reghelin, A.L.S., Candido, M.V., Javorouski, M.L., Müller, G., and Morais, R.N. (2008). Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*, 69 (1), 204–211.
- Bois, S., Len, J.A., Parlevliet, J.M., and Eilts, B.E. (2012). Effects of cooling time on membrane integrity and motility of frozen-thawed canine spermatozoa using two different commercial egg yolk-based extenders at two different cooldown equilibration times. *Reproduction Domestic Animal*, 47 (1), 278-280.
- Buranaamnuay, K. (2017). Protocols for sperm cryopreservation in the domestic cat: A review. *Animal Reproduction Science*, 183 (1), 56–65.
- Comercio, E.A., Monachesi, N.E., Loza, M.E., Gambarotta, M., and Wanke, M.M. (2013). Hypo-osmotic test in cat spermatozoa. *Andrologia*, 45 (1), 310-314.
- Contri, A., Zambelli, D., Faustini, M., Cunto, M., Gloria, A., and Carluccio, A. (2012). Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. *Reproduction*, 144 (1), 339–347.
- Córdova, A., Iglesias, A.E., Espinosa, R., Guerra, J.E., Inzunza, J.F., Juárez, M.L., Gómez, A., y Rodríguez, B.E. (2016). Aplicación de la citometría de flujo en veterinaria. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10 (2), 60-73.
- Davidson, A.P., and Baker, T.W. (2009). Reproductive Ultrasound of the dog and tom. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24 (2), 65-70.
- Erdmann, R. (2005). Exame reprodutivo, contenção farmacológica e Criopreservação de sêmen em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775). 2005. 86p. Dissertação (Ciências Veterinárias). Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- Filliers, M., Rijsselaere, T., Bossaert, P., De Causmaecker, V., Dewulf, J., Pope, C.E. and Van Soom, A. (2008). Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4°C) on sperm quality. *Theriogenology*, 70 (1), 1550–1559.
- Gañán, N., González, R., Sestelo, A., Garde, J.J., Sánchez, I., Aguilar, J.M., Gomendio, M., and Roldan, E.R.S. (2009). Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology*, 71 (1), 341-352.
- Goodrowe, K.L., Walker, S.L., Ryckman, D.P., Mastromonaco, G.F., Hay, M.A., Bateman, H.L., and Waddell. (2000). Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. *Animal Reproduction Science*, 60-61 (1), 389-403.
- Howard, J.G & Wildt D.E. (2009). Approaches and

- efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology*, 71 (1), 130–148.
- Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade (ICMBio/MMA). (2018). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II – Mamíferos / -- 1. ed. -- Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. 7 v.: il.
- Jiménez, E., Pérez-Marín, C.C., Vizuete, G., Millán, Y., and Agüera, E. (2013). Effect of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 48 (1), 665–672.
- Juvenal, J.C., Erdmann, R.H., Moreira, N., Moraes, W., Cubas, P.H., Delgado, L.E.S., Carvalho, A.L., e Pachaly, J.R. (2008). Contenção farmacológica do gato-mato-pequeno, *Leopardus tigrinus*, para colheita de sêmen, pela associação de tiletamina zolazepam e xilazina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28 (11), 541-546.
- Leite, T.G., Vale Filho, V.R., Arruba, R.P., Andrade, F.C., Enerick, L.L., Zaffalon, F.G., Martins, J.A.M & Andrade, V.J. (2010). Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120 (1), 31-38
- Lueders, I., Luther, I., Scheepersd, G., and Van Der Horst, G. (2012). Improved semen collection method for wild felids: Urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). *Theriogenology*, 78 (1), 696–701.
- Luvoni, G.C., Kalchschmidt, E., Leoni, S., and Ruggiero, C. (2003). Conservation of feline semen Part I: Cooling and freezing protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5 (1), 203–208.
- Luvoni, G.C., Kalchschmidt, E., and Marinoni, G. (2003). Conservation of feline semen Part II: Cold-induced damages on spermatozoa fertilizing ability. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5 (1), 257–263.
- Macedo, D.B., Costa, D.S., Paula, T.A.R., Santos, M.R., and Faria, F.J.C. (2011). Testicular biometry of free-ranging feral pigs (*Sus scrofa sp*). *Revista Brasileira Saúde e Produção animal*, 12 (2), 381-388.
- Madrigal-Valverde, M., Bittencourt, R. F., de Lisboa, A., Lents, M. P., de Azevedo, M.C., Barreto, R.O, Teixeira, N.A., Mattos, P.M.S., Curvelo, V.P., Gomes, M.C., Dantas, V., Ribeiro, G., y Valverde-Abarca, A. (2019). Biometría testicular y características seminales en felinos neotropicales (Carnívora: Felidae) sometidos a cateterismo uretral. *Revista de Biología Tropical*, 67 (4), 975-988.
- Martins, M.I.M., e Justino, R.C. (2015). Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 39 (1), 136-140.
- Matos, D.L., Araújo, A.A., Roberto, I.G., e Toniolli, R. (2008). Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 32 (4), 225-232.
- Mattos, L. (2001). Biotecnologias em reprodução assistida na preservação de animais silvestres em extinção. 2001. Monografia (Bacharelato em Biologia). Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília.
- Micheletti, T., Cubas, Z.S., Moraes, W., Oliveira, M.J., Kozicki, L.E., Weiss, R.R., e Moreira, N. (2011). Reprodução assistida em felídeos silvestres – uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35 (4), 408-417.
- Morais, R.N., Mucciolo, R.G., Gomes, M.L.F., Lacerda, O., Moraes, W., Moreira, N., Graham, L.H., Swanson, W.F., and Brown, J.L. (2002). Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology*, 57 (1), 2027-2041.
- Morato, R.G., Guimarães, M.A.B.V., Nunes, A.L.V., Carciofi, A.C., Ferreira, F., Barnabe, V.H., e Barnabe, R, C. (1998). Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). *Brazilian Journal Veterinary Reseach Animal Science*, 35 (4), 178-181.
- Morato, R.G., Conforti, V.A., Azevedo, F.C., Jacomo, A.T.A., Silveira, L., Sana, D., Nunes, A.L.V., Guimarães, M.A.B.V., and Barnabe, R.C. (2001). Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction*, 122 (1), 745–751.
- Morato, R.G., Verreschic, I.T.N., Guimarães, M.A.B., Cassaro, K., Pessuti, C., and Barnabe, R.C. (2004). Seasonal variation in the endocrine–testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). *Theriogenology*, 61 (1), 1273–1281.
- Moreira, N. (2017). Técnicas reprodutivas para a conservação de felídeos silvestres. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41 (1), 116-120.
- Muiño, R., River, M.M., Rigau, T., Rodriguez-Gil, J.E., and Pena, A.I. (2008). Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science*, 109 (1), 50-64.
- Niżański, W., Partyka, A., and Rijsselaere, T. (2012).

- Use of fluorescent stainings and Flow cytometry for canine semen assessment. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (6), 215–221.
- Padrik, P., Hallap, T., Januškauskas, A., Kaart, T., Bulitko, T., and Jaakma, U. (2012). Conventional laboratory test and flow cytometry in the prognostic testing of bull semen fertility. *Veterinary Medicine Zoology*, 60 (82), 52–58.
- Partyka, A., Nizańskib, W., and Łukaszewicza, E. (2010). Evaluation of fresh and frozenthawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology*, 74 (1), 1019–1027.
- Paz, R.C.R., Zuge, R.M., Barnabe, V.H., Morato, R.G., Felipe, P.A.N., e Barnabe, R.C. (2000). Avaliação da capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, 37 (6), 462–466.
- Peixoto, G.C.X., Silva, M.A., Lima, G.L., Campos, L.B., Paiva, L.C., Paula, V.V., Ricarte, A.R.F., and Silva, A.R. (2016). Use of non-invasive methods for evaluating the testicular biometry in collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Anatolgy Histology Embryology*, 45 (1), 60–66.
- Prochowska, S., Nizański, W., Ochota, M., and Partyka, A. (2015). Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats - A retrospective study of 214 cases. *Theriogenology*, 84 (1), 1565–1571.
- Pukazhenthii, B.S., and Wildt, D.E. (2004). Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife?. *Reproduction Fertility Development*, 16 (1), 33–6.
- Reis, N., Perachi, A., Pedro, W., e Lima, I. (2006). *Mamíferos do Brasil*. Paraná: UFL, , 439p.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., and Nizański, W. (2012). Computer-Assisted Sperm Analysis in dogs and cats: An Update after 20 Years. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (6), 204–207.
- Root, M. V. (2010) *Clinical Canine and Feline Reproduction: Evidence-Based Answers*. Iowa, USA: Wiley & Blackwell.
- Sarti, P., De Paula, T.A., Da Matta, S.L., Fonseca, C.C., Polli, G., Balarini, M., e Mascarenhas, R. (2009). Parâmetros biométricos corporais e testiculares de Jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) adultas. *Revista Ceres*, 56 (2), 161–165.
- Sienienuch, M.J and Woclawek-Potocka, I. (2008). Assessment of selected quality parameters of epididymal cat (*Felis catus s. domestica*, L. 1758) Sperm Using Flow Cytometry Method and Computer Assisted Sperm Analyzer. *Reproduction in Domestic Animals*, 43 (1), 633–637.
- Spinaci, M., Merlo, B., Zannoni, A., Iacono, E., De Ambrogi, M., Turba, M.E., and Zambelli, D. (2007) In vitro production of cat blastocysts of predetermined sex using flow cytometrically sorted semen. *Theriogenology*, 67, 872–877.
- Stachecki, J.J., Ginsburg, K.A., Leach, R.E., and Armant, D.R. (1993). Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *Journal of Andrology*, 14 (1), 60–65.
- Sunigama, S., and Meyers, S. (2012) Cooling rate affects rhesus monkey sperm survival. *Journal Medicine Primatology*, 41 (1), 278–283.
- Swanson, W.F., Roth, T.L., Bluner, E., Citino, S.B., Kenny, D., and Wildt, D.E. (1996). Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Panthera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology*, 45 (1), 241.
- Swanson, W.F., and Brown, J.L. (2004). International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *Animal Reproduction Science*, 82–83 (1), 21–34.
- Swanson, W.F., Batenan, H.L., and Vansandt, L.M. (2017). Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reproduction in Domestic Animals*, 52 (2), 255–260.
- Tipkantha, W., Thuwanut, P., Siritaroonrat, B., Comizzoli, P., and Chatdarong, K. (2017). Mitigation of sperm tail abnormalities using demembration approach in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Reproduction in Domestic Animals*, 52 (2), 214–218.
- Villaverde, A.I.S.B., Marini, C., Martin, I., Ferreira, T.H., Papa, F.O., Taconeli, C.A., and Lopes, M.D. (2009). Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*): Artificial insemination in domestic cats. *Animal Reproduction Science*, 114 (1), 434–442.
- Wultsch, C., Waits, L.P., and Kelly, M.J.A. (2016). Comparative analysis of genetic diversity and structure in jaguars (*Panthera onca*), Pumas (*Puma concolor*), and Ocelots (*Leopardus pardalis*) in Fragmented Landscapes of a Critical Mesoamerican Linkage Zone. *PLoS ONE*, 11 (1), 1–30.
- Zambelli, D., Raccagni, R., Cunto, M., Andreania, G, and Isania, G. (2010). Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology*, 74 (1), 1396–1402.