**Criopreservação de sêmen dO GÊNERO *Puma***

**Semen cryopreservation of *Puma* genus**

Dieferson da Costa Estrela1, Bruna de Oliveira Mendes2, Cristina Harumi Adania3,

Jessica da Silva Paulinho3, Flavio Augusto Vicente Seixas4, Guilherme Malafaia5, Antônio Campanha Martinez4, Nei Moreira6

1 Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil. Instituto Federal Sul-rio-grandense – Campus Avançado Jaguarão, Rio Grande do Sul, Brasil. diefersonestrela@gmail.com

2 Mestre em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado.

3 Associação Mata Ciliar, Jundiaí, São Paulo, Brasil.

4 Universidade Estadual de Maringá, Campus Umuarama, Paraná, Brasil.

5 Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, Goiás, Brasil.

6 Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil.

As espécies do gênero *Puma* estão ameaçadas de extinção no território brasileiro, com declínio populacional e sob risco de perda de variabilidade genética e efeitos negativos da endogamia. Este estudo objetiva avaliar um protocolo de coleta de sêmen via cateterização uretral (CU) na espécie *Puma yagouaroundi* (PY), compará-lo à eletroejaculação e avaliar a eficiência de diferentes meios para criopreservação de sêmen no gênero *Puma*. Também será padronizado o ensaio cometa que avalia a fragmentação de DNA espermático, bem como será descrita a proteômica do plasma seminal, por meio de eletroforese *SDS Page* e sequenciamento com Maldi-tof. A proposta está sendo desenvolvida na Associação Mata Ciliar, Jundiaí, SP. Machos das espécies PY n=8 e *Puma concolor* (PC) n=2 foram submetidos à eletroejaculação para coleta de sêmen. Na CU em PY foram utilizadas sondas Tom cat introduzidas após anestesia (15, 20, 35 minutos). Amostras obtidas foram congeladas em nitrogênio líquido com diferentes meios (Botucrio(BC), Botudog(BD), Botubov(BB) - Botupharma, Botucatu, Brasil; e UEM acrescido de 10 microgramas/ml de quercetina - Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, Brasil). O ensaio cometa foi realizado com pH neutro e alcalino em amostras frescas aplicadas em camada de agarose (1,5%) sob lâminas, submetidas a duas lises, eletroforese com 1V/cm e avaliadas em microscopia de fluorescência com corante SYBR Green. Os animais apresentaram valores de biometria, PY e PC, respectivamente, firmeza testicular média 2,5 (±0,5) e 1,83 (±0,28), sendo 1 = duro, 2 = normal e 3 = flácido, e volume testicular médio 2,39 (±0,92) cm3 e 13,45 (±2,75) cm3. Foram padronizadas as versões neutra e alcalina do ensaio cometa em ambas espécies e descrita a taxa basal média da intensidade da cauda em 23,80 (±8,38), não havendo diferença entre as espécies. Na eletroforese do plasma seminal foram identificadas 17 bandas com peso molecular entre 217,07 e 29,14 kDa com padrões diferentes de expressão entre animais e coletas. Na eletroejaculação, em ambas as espécies, ocorreu ereção em 81,25 % (n=26) das tentativas, sendo a voltagem média em que a ereção ocorreu de 2,25 (±0,51). Houve contaminação com urina em 29,41% (n=10) das tentativas, contudo, na maioria das vezes foram obtidas amostras não contaminadas do mesmo animal. Foram obtidas amostras em seis coletas que apresentaram, PY e PC, respectivamente: pH médio 8,5 (±0,94) e 8,75 (±0,35); volume médio 100,85 µL (±54,3) e 1795,67 µL (±602,38); vigor 3,08 (±0,8) e 3,33 (±0,29); motilidade 53,26 (±22,64) e 75 (±5,0); índice de motilidade espermática médio 44,54 (±29,06) e 70,83 (±1,44); concentração média 32,94 x 106/ml (±68,96) e 139,56 x 106/ml (±19,95); vitalidade média de 62,8% (±19,3) e 79,7% (±2,08). Após congelamento, amostras dos quatro meios apresentaram diferentes percentuais de perda de vigor, motilidade e vitalidade, sendo respectivamente: BB (1; 48,33%; 41,5%); BC (2,68; 61,25%; 49,8%); BD (2; 52,2%; 41,6%); e UEM (2,3; 45,74%; 41,55%). O protocolo de CU avaliado foi eficiente para obtenção de sêmen, contudo, as amostras obtidas foram inferiores às de eletroejaculação nos parâmetros vigor, motilidade e vitalidade.

**Palavras-chave:** Cateterização uretral; Botucrio; Botudog; Dexmedetomidina; Botubov.