

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

Parâmetros seminais e extração de RNA espermático de mico-leão-de-cara-dourada
(*Leontopithecus chrysomelas*)

Patrícia Hergert Bacher

São Carlos, SP

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

Parâmetros seminiais e extração de RNA espermático de mico-leão-de-cara-dourada
(*Leontopithecus chrysomelas*)

Patrícia Hergert Bacher

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Conservação da Fauna como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre Profissional em Conservação da Fauna, sob orientação da Professora Dra. Andréa Cristina Peripato e coorientação do médico veterinário Dr. Rodrigo Del Rio do Vale.

São Carlos, SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B121p Bacher, Patrícia Hergert
Parâmetros seminais e extração de RNA espermático de mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) / Patrícia Hergert Bacher. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
79 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Colheita de sêmen. 2. Conservação ex situ. 3. Biotécnicas. 4. Epigenética. 5. Coágulo. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de mestrado da candidata Patrícia Herget Bacher, realizada em 29/09/2016:

Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato
UFSCar

Profa. Dra. Samira Chahad Ehlers
UFSCar

Prof. Dr. Marcílio Nichi
USP

Prof. Dr. Rodrigo Del Rio do Valle
UNIP

Certifico que a sessão de defesa foi realizada com a participação à distância do membro Prof. Dr. Marcílio Nichi e, depois das arguições e deliberações realizadas, o participante à distância está de acordo com o conteúdo do parecer da comissão examinadora redigido no relatório de defesa da aluna Patrícia Herget Bacher.

Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato
Presidente da Comissão Examinadora
UFSCar

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Eduardo e Edna, pelo apoio neste
e em tantos outros sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora, professora Dra. Andréa Cristina Peripato, pela confiança depositada desde o início, pelo convívio e ensinamentos ao longo desses dois anos e meio. Ao meu coorientador Dr. Rodrigo Del Rio do Valle por me iniciar em uma área totalmente nova.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo pela oportunidade e apoio financeiro na realização deste trabalho. Agradeço ao pessoal dos Setores de Mamíferos e de Veterinária pela articulação e suporte na etapa de coleta de amostras e, em especial, à Paloma e Paula, pela ajuda e por tudo que aprendi no Núcleo de Reprodução Assistida.

Ao Professor Dr. Reinaldo Alves de Brito pelo suporte laboratorial e por sempre esclarecer minhas dúvidas. Meu muito obrigada ao pessoal do Laboratório de Genética de Populações pelo convívio e ensinamentos, especialmente à Samira, André e Isabela.

Ao Professor Marcos Arduim pela disponibilização de equipamentos fundamentais às análises. Ao Bruno Sauce pela colaboração na análise estatística deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante o mestrado Samara, Gabi, Mayara, Bárbara, Douglas e Caio, pelo privilégio da convivência durante a imersão e diariamente no Whatsapp, vocês com certeza estão na lista das melhores coisas que me aconteceram de 2014 para cá! Agradeço também aos amigos de São Carlos, em especial ao Fernando, Natália e Malu, minha família são carlense, pelo companheirismo de sempre e porque nem só de trabalho se vive o mestrado!

Finalmente agradeço às pessoas que tornaram este sonho possível. Meus pais, aos quais nunca poderei agradecer suficientemente o apoio e confiança em todas as etapas da minha vida. E ao Danilo, pela parceria e paciência, por dividir comigo a rotina e os planos, obrigada por ser meu lar!

RESUMO

O mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) é um primata endêmico da Mata Atlântica ameaçado de extinção. Entre os esforços de conservação endereçados à espécie está a utilização de biotécnicas reprodutivas como estratégia de preservação dos recursos genéticos e garantia da viabilidade das populações em cativeiro e ambiente natural. O sucesso das biotécnicas reprodutivas depende ainda do conhecimento detalhado acerca de aspectos reprodutivos, da investigação de fatores que possam influenciar o sucesso reprodutivo e do estabelecimento de protocolos espécie-específicos. A criopreservação de sêmen consiste na abordagem mais empregada em espécies silvestres. Contudo, um dos grandes desafios associados à aplicação de amostras de primatas neotropicais compreende à formação do coágulo seminal, que inviabiliza a utilização de uma grande quantidade de gametas na maioria dos procedimentos reprodutivos. O mico-leão-de-cara-dourada tem se mostrado um modelo promissor entre os primatas neotropicais ameaçados e visando contribuir com o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas este trabalho teve por objetivo iniciar as investigações acerca de fatores seminais e moleculares que possam influenciar o potencial reprodutivo de machos sexualmente maduros de *Leontopithecus chrysomelas*. Para tanto, os animais, mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, Brasil, foram divididos em dois grupos, "Velhos" (idade média 11,6 anos; n=6) e "Jovens" (idade média de 4,8 anos; n=6) para a realização da colheita de sêmen e avaliação dos parâmetros seminais (concentração, motilidade, integridade da membrana plasmática e acrossômica, atividade citoquímica mitocondrial e morfologia). A análise dos parâmetros seminais apontou diferenças significativas entre indivíduos velhos e jovens com relação à integridade de membrana plasmática ($p=0,049$), integridade de membrana do acrossoma ($p=0,009$) e para a Classe IV de atividade mitocondrial ($p=0,026$). As análises de regressões evidenciaram que a idade, assim como o peso dos indivíduos, exerce influência negativa sobre a qualidade desses parâmetros. Ademais, visando contribuir com o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas e com a melhoria da viabilidade espermática, foi testado um protocolo de seleção espermática em gradiente descontínuo de Percoll. Contudo, mesmo que eficiente para o isolamento de gametas dos demais componentes seminais, o protocolo não resultou em melhora significativa dos parâmetros reavaliados após a seleção, sugerindo a necessidade de adequação metodológica para a efetiva aplicação em *Leontopithecus chrysomelas*. Para dar início as investigações do papel epigenético do gameta masculino no sucesso reprodutivo, o presente trabalho estabeleceu um protocolo de extração de RNA espermático, com destaque

para a utilização do coágulo seminal, material que consiste de uma fonte rica de material genético, mas que costuma ser descartado após o processamento. As amostras de cada indivíduo foram concentradas em dois *pools*, um referente ao coágulo e outro à fração líquida. Adaptações para a lise de células somáticas permitiram a obtenção de perfis semelhantes entre as duas porções do ejaculado. Os perfis qualitativos do RNA espermático de *Leontopithecus chrysomelas* indicam baixa concentração de moléculas maiores de RNA, sendo basicamente representados por transcritos pequenos e transcritos degradados em decorrência do silenciamento da expressão gênica nos espermatozoides. Aos transcritos espermáticos vem sendo atribuída função determinante na reprodução, envolvida com a regulação da ativação do gameta feminino e da expressão gênica no início do desenvolvimento do embrião. Além disso, tem sido proposto que a quantidade de RNA presente nos gametas seja utilizada como ferramenta não invasiva para inferência da fertilidade masculina, uma vez que estes transcritos refletem eventos ocorridos durante a diferenciação celular.

ABSTRACT

The Golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) is an endemic primate from Atlantic Forest threatened with extinction. Amongst the conservational efforts addressed towards the species is the use of reproductive biotechnologies as a strategy of genetic resources preservation and assurance of captive and natural population's viability. The success of the reproductive biotechnologies still depends on the detailed knowledge despite the reproductive aspects, the investigation of factors that may influence the reproductive success and the establishment of specific-species protocols. The cryopreservation of semen is the most widely used approach for wild species. However, one major challenge associated to the appliance of neotropical primate's samples consists in the formation of seminal clots, which invalidates the use of great quantity of gamete in most reproductive procedures. The golden-headed lion tamarin has become a promising model among threatened neotropical primates and aiming to contribute with the development of reproductive technologies, this essay had the objective of initiate investigations concerning the molecular and seminal factor which may have an effect on the reproductive potential of sexually mature males of *Leontopithecus chrysomelas*. Therefore, the animals kept at the *Fundação Parque Zoológico de São Paulo*, São Paulo, Brazil, were divided into two groups, "Old" (mean age 11,6 years; n=6) and "Young" (mean age 4,8 years, n=6) to execute the semen collection and evaluation of the seminal parameters (concentration, motility, plasmatic and acrosome membrane integrity, mitochondrial cytochemical activity and morphology). The analysis of seminal parameters pointed out significant differences between the older and younger subjects despite the plasmatic membrane integrity ($p=0,049$), acrosome integrity ($p=0,009$) and for Class IV mitochondrial activity ($p=0,026$). The regression analysis showed that the age, as well as the weight of the individuals, have a negative influence over the quality of these parameters. Therefore, aiming to contribute with the development of new reproductive techniques and to improve the spermatic viability, a protocol of sperm selection by Percoll discontinuous gradient was tested. However, even though efficient for gamete isolation from other seminal component, the protocol did not show significant improvement of the parameters, reevaluated after selection, suggesting needing of methodological adequation for and effective application in *Leontopithecus chrysomelas*. To start investigating the gamete's epigenetic role in male reproductive success, this essay established a sperm RNA isolation protocol, highlighting the use of seminal clot, a rich source of genetic material, which is usually thrown away after processing. The samples of each individual were condensed in two pools, one referring the

clot and other to the liquid fraction. Adaptations for the somatic cellular lyse allowed obtainment of similar profiles between the two portions of the ejaculate. The qualitative profiles for sperm RNA of *Leontopithecus chrysomelas* indicates low concentration of molecules bigger than RNA, being represented, basically, by little and degraded transcripts due to silencing of gene expression in spermatozoa. The spermatic transcripts have been assigned as the determinant function in reproduction, enrolled with the regulation of female gamete activation and gene expression at the beginning of the embryo development. Furthermore, it has been proposed that the quantity of RNA present in gametes be used as a non-invasive tool for deducing male fertility, since these transcripts reflect on events that occur during cellular differentiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Área de ocorrência original e presente das espécies do gênero <i>Leontopithecus</i> . 1 - mico-leão-de-cara-dourada (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>); 2- mico-leão-dourado (<i>Leontopithecus rosalia</i>); 3- mico-leão-de-cara-preta (<i>Leontopithecus caissara</i>); 4- mico-leão-preto (<i>Leontopithecus chrysopygus</i>). Adaptado de KLEIMAN e RAYLANDS (2002).	13
Figura 2. Colheita de sêmen por vibroestimulação peniana, a seta branca indica o coágulo seminal formado logo após a ejaculação. Foto: Patrícia H. Bacher.	27
Figura 3. Integridade da membrana plasmática. (1) Espermatozoide com membrana plasmática lesada; (2) Espermatozoide com membrana plasmática íntegra. Foto: Patrícia H. Bacher.	29
Figura 4. Integridade da membrana do acrossoma. (A) Acrossoma íntegro e (B) Acrossoma lesado. Foto: Patrícia H. Bacher.	30
Figura 5. Atividade citoquímica mitocondrial. (A) Classe I; (B) Classe II. Foto: Patrícia H. Bacher.	31
Figura 6. Atividade citoquímica mitocondrial. (C) Classe III e (D) Classe IV. Veja texto para detalhes. Foto: Patrícia H. Bacher.	31
Figura 7. Perfil de RNA espermático em <i>Bioanalyzer</i> . FU - Unidades de Fluorescência; s- segundos; M - marcador 25pb.; A- RNA extraído do coágulo seminal; B- RNA extraído da fração líquida.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos dados individuais, das colheitas de sêmen, pH e volume do ejaculado de <i>Leontopithecus chrysomelas</i> mantidos em cativeiro, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, Brasil.	35
Tabela 2. Avaliação dos parâmetros seminais de <i>Leontopithecus chrysomelas</i> mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2015.....	36
Tabela 3. Relação Entre os Parâmetros Seminais e as Variáveis de Idade e Peso de <i>Leontopithecus chrysomelas</i> mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2015.	37
Tabela 4. Comparação dos Parâmetros Seminais Pré e Pós Gradiente Descontínuo de Percoll de <i>Leontopithecus chrysomelas</i> mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2015.	39
Tabela 5. Suplementar 1. Avaliação dos Parâmetros Seminais: Motilidade e Concentração Espermática.	53
Tabela 6. Suplementar 2. Avaliação dos Parâmetros Seminais: Integridade de Membrana Plasmática e Acrossômica	54
Tabela 7. Suplementar 3. Avaliação dos Parâmetros Seminais: Atividade Citoquímica Mitocondrial.	55
Tabela 8. Suplementar 4. Avaliação dos Parâmetros seminais: Morfologia do grupo "Velhos".	56
Tabela 9. Suplementar 5. Avaliação dos Parâmetros seminais: Morfologia do grupo "Jovens".	57
Tabela 10. Dados da colheita e da quantificação das amostras de sêmen de mico-leão-de-cara-dourada.	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	20
3. MANUSCRITOS PRODUZIDOS	21
CAPÍTULO 1	22
Influência da idade e peso sobre os parâmetro seminiais de mico-leão-de-cara-dourada (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>) mantidos em cativeiro	22
Resumo	22
Introdução	23
Material e Métodos	25
Resultados	33
Discussão	40
Considerações finais	46
Referências Bibliográficas	46
Material Suplementar do manuscrito "Influência do peso e idade sobre os parâmetros seminiais e seleção espermática de mico-leão-de-cara-dourada (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>) mantidos em cativeiro	53
CAPÍTULO 2	58
Extração de RNA espermático do coágulo seminal de mico-leão-de-cara-dourada (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>)	58
Resumo	58
Introdução	59
Material e métodos	61
Resultados	64
Discussão	67
Considerações Finais	69
Referências Bibliográficas	70
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS	73
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Leontopithecus* pertence a família Callitrichidae e é representado por quatro espécies conhecidas popularmente como os micos-leões: o mico-leão-de-cara-dourada, *Leontopithecus chrysomelas* (KUHLE, 1820); mico-leão-dourado, *Leontopithecus rosalia* (LINNAEUS, 1766); mico-leão-preto, *Leontopithecus chrysopygus* (MIKAN, 1823), e mico-leão-de-cara-preta, *Leontopithecus caissara* (LORINI, PERSSON, 1990).

São as espécies de maior porte entre os calitriquídeos, com a média de peso variando entre 600 à 700g e comprimento por volta de 30 centímetros com a mesma medida de cauda. Os micos-leões são inconfundivelmente reconhecidos pelos longos pêlos na região da cabeça e a diferença morfológica básica entre as quatro espécies é observada através do padrão de pelagem. São animais diurnos, arborícolas e de hábitos gregários, que compõem grupos de 3 a 12 indivíduos (COIMBRA-FILHO, 1973), frequentemente representados por mais de um adulto de cada sexo, além de subadultos, juvenis e filhotes. Os indivíduos do grupo não necessariamente são aparentados devido a migração entre bandos, tanto de fêmeas quanto machos (SUSSMAN, GARBER, 1987).

Entre as fêmeas a maturidade sexual é atingida aos 18 meses, enquanto que entre os machos ocorre mais tardiamente, aos 24 meses (EISENBERG, 1977). Apresentam sistema de acasalamento monogâmico, caracterizado pela presença de uma fêmea dominante reprodutivamente ativa e pela contribuição paterna e de outros membros do grupo no cuidado da prole (VLEESCHOUWER et al., 1999; SUSSMAN, GARBER, 1987). Estudos em campo mostraram que esse sistema de acasalamento é bastante flexível, marcado por eventos de promiscuidade da fêmea dominante (poliandria) e ainda por casos de acasalamentos multimachos-multifêmeas, demonstrando uma complexa organização social, conservada entre muitas espécies, senão todas da família Callitrichidae (SUSSMAN, GARBER, 1987).

Apesar de serem endêmicas da Mata Atlântica, as quatro espécies de micos-leões apresentam distribuição alopátrica, com ocorrência original em florestas costeiras de baixa altitude na região Sudeste e nos estados da Bahia e do Paraná (GUIDORIZZI, 2008). O Mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) especificamente, tem ocorrência original do sul Bahia ao norte de Minas Gerais, na divisa entre os estados. A região oeste de sua distribuição é caracterizada pela redução e intensa fragmentação da área florestal devido à abertura de pastos para a criação de gado. A porção leste é caracterizada pela ocorrência de

sistemas agroflorestais conhecidos como Cabruças, em que o cacaueteiro é cultivado em meio às árvores nativas da Mata (CARDOSO *et al.*, 2005).

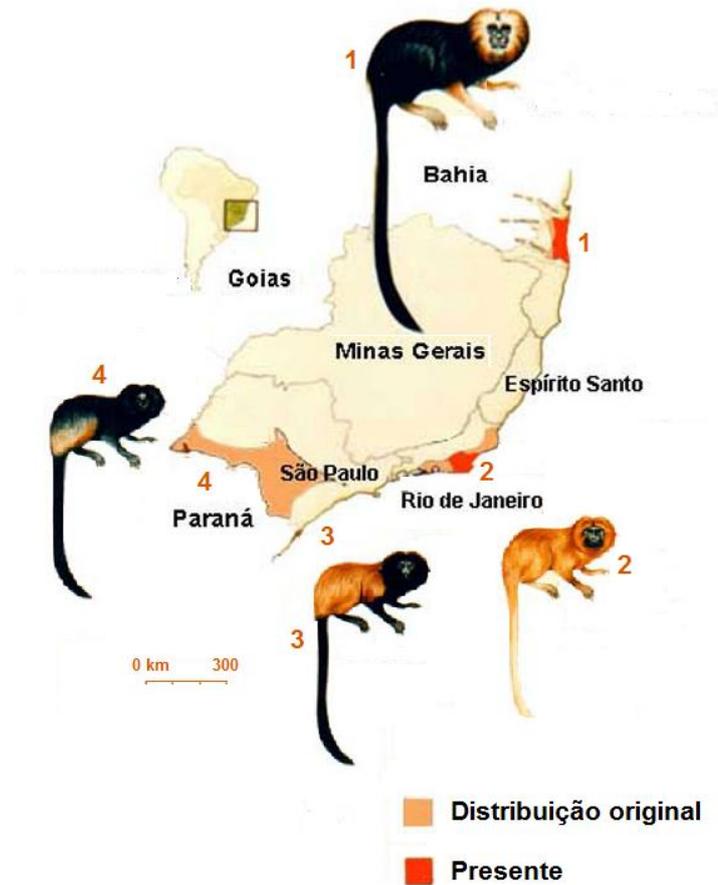


Figura 1. Área de ocorrência original e presente das espécies do gênero *Leontopithecus*. 1 - mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*); 2- mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*); 3- mico-leão-de-cara-preta (*Leontopithecus caissara*); 4- mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*). Adaptado de KLEIMAN e RAYLANDS (2002).

O mico-leão-de-cara-dourada consta sob *status* "Em Perigo" de extinção na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (MMA, 2005; IUCN, 2007). O principal fator que coloca a espécie nessa condição é a superexploração da Mata Atlântica, considerada um dos principais *hotspots* da biodiversidade mundial. O bioma abriga mais de 8.000 espécies endêmicas e é caracterizado por uma grande heterogeneidade climática e vegetacional, que abrange além da floresta tropical, diversos outros tipos de formações, como mangues, restinga, brejos e campos de altitude (MEYERS, 2000). A superexploração ocorre pela demanda por recursos naturais para as populações humanas, como madeira, uma grande

variedade de produtos vegetais e caça, bem como pela demanda por áreas de uso, destinadas à criação de pastos, áreas agricultáveis e à expansão de áreas urbanas (GUIDORIZZI, 2008; TABARELLI et al., 2005). Dessa forma, a floresta já perdeu mais de 93% de sua cobertura original e encontra-se em elevado grau de fragmentação, sendo que muitas vezes estes fragmentos são separados por grandes distâncias sem qualquer conectividade (TABARELLI et al., 2005; CARVALHO, 2004).

A situação atual da Mata Atlântica tem reflexo sobre a viabilidade dos micos-leões-de-cara-dourada, que apesar do pequeno porte requerem uma área de vida relativamente grande que costuma variar de 40 à 124ha (RYLANDS, 1989; RABOY, DIETZ, 2004). A região de ocorrência dos micos-leões-de-cara-dourada é marcada por alta taxa de desmatamento devido à intensificação da atividade madeireira em áreas não protegidas, o que tem reduzido significativamente as populações nas últimas décadas (CARDOSO et al., 2005). A limitação de espaço somada ao comportamento territorialista dos micos torna frequente a competição por recursos alimentares e por abrigos, sendo que encontros entre diferentes grupos são caracterizados por embates, o que representa um fator de ameaça à sobrevivência das subpopulações (BRASIL, 2008). Estima-se que existam em vida livre de 3 a 6 mil indivíduos de mico-leão-de-cara-dourada, com populações distribuídas em manchas isoladas de mata secundária, o que ameaça a sobrevivência da espécie ao longo das gerações devido à perda do potencial ecológico, demográfico e genético (MARTINS, 2003).

A medida prioritária para a conservação de espécies como os micos-leões é a abordagem de conservação *in situ*, que consiste em preservar o ambiente natural de ocorrência da espécie com a criação de áreas protegidas, de modo que os esforços de conservação sejam endereçados em benefício da espécie alvo e da comunidade em geral. Tal abordagem é bem sucedida quando aliada a um plano de manejo, para o gerenciamento da unidade de conservação e restrição de fatores e práticas que ameaçam o ecossistema (GROOM, MEFFE, CARROLL, 2006). Atualmente, a RE-BIO da Una representa o principal refúgio de proteção integral da espécie, localizada na porção leste do estado da Bahia. Foi estabelecida com 11.400 ha de extensão e atualmente conta com uma área de 18.500 ha de floresta ombrófila. (ZEIGLER et al., 2010). No entanto, a reserva ainda em regeneração é ameaçada com pressões do entorno e sozinha não é capaz de assegurar a diversidade genética da espécie em longo prazo (MORAES, 2011), sendo necessária a criação de novas unidades de conservação que possibilitem a conectividade entre os fragmentos.

O manejo populacional dos micos-leões-de-cara-dourada *ex situ* começou na década de 1970 com os esforços de Ademar Coimbra-Filho para o estabelecimento dos primeiros programas de reprodução em cativeiro (COIMBRA-FILHO et al., 1989). Outro marco na conservação da espécie foi o estabelecimento do Comitê Internacional de Recuperação e Manejo em 1985, presidido pelo próprio Coimbra-Filho sob coordenação do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), ocasião em que foram especificadas as medidas prioritárias de conservação da espécie, cujas metas de restauração de populações viáveis foram orientadas para ações de conservação em ambientes naturais e em cativeiro, com estímulo à pesquisa, captação de recursos, organização do *studbook* e discussão de questões relacionadas ao manejo das populações *ex situ* (KLEIMAN, MALLINSON, 1997; PUKAZHENTHI et al., 2006; REZENDE, 2014). O objetivo inicial estabelecido para a espécie foi de repatriação de animais ilegalmente exportados, alguns dos quais foram recuperados e integraram colônias em cativeiro (KLEIMAN, MALLINSON, 1997).

Frente às ameaças sofridas em ambientes naturais, a manutenção de populações em cativeiro pode atender a muitos propósitos da conservação *in situ* (ANDRABI, MAXWELL, 2006; HANKS, 2002). Constitui-se de um reservatório de indivíduos disponíveis para a reintrodução, nos casos em que esta abordagem seja possível diante da amenização de impactos em ambiente natural. Além de que as populações de cativeiro oferecem oportunidades valiosas de pesquisa acerca de aspectos biológicos ainda pouco conhecidos e os dados gerados podem direcionar o manejo das populações de vida livre (PUKAZHENTHI et al., 2006).

Os programas de reprodução em cativeiro promovidos nas instituições seguem recomendações de manejo em busca da manutenção de populações demograficamente estáveis e sustentáveis em longo prazo (IVY et al., 2009). Isto depende essencialmente de assegurar níveis adequados de diversidade genética e da minimização de cruzamentos endogâmicos (PANYABORIBAN et al., 2016). Com relação a representatividade genética em cativeiro é importante destacar que as instituições lidam, muitas vezes, com restrições de espaço que inviabilizam a manutenção de número suficiente de indivíduos (DURRANT, 1990).

O estabelecimento de bancos de recursos genéticos de espécies silvestres permite a preservação da diversidade genética existente por meio da criopreservação de gametas e

embriões. Estes recursos constituem um seguro genético e podem ser combinados com outras biotécnicas reprodutivas, como inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões (WILDT, ROTH, 1997; ANDRABI, MAXWELL, 2006; FICKEL, WAGENER, LUDWIG, 2007). Assim, a biotecnologia permite a superação de diversos desafios associados ao manejo metapopulacional, especialmente em relação à limitação de indivíduos disponíveis para a reprodução, à translocação de indivíduos e à necessidade de atividade reprodutiva. Seu apelo não deve ser feito em detrimento da reprodução natural, mas consiste de uma ferramenta poderosa para o manejo *ex situ*. A reprodução assistida possibilita a seleção de indivíduos geneticamente recomendados e de diminuição do intervalo entre gerações, o que garante diversidade genética e maior sucesso reprodutivo (WILDT, ROTH, 1997; ANDRABI, MAXWELL, 2006). Ademais, é possível manejar os recursos genéticos para solicitação em curto prazo de genótipos sub-representados nas populações (DURRANT, 1990; HOLT, 1992). Atualmente a técnica mais recomendada e bem disseminada para as espécies silvestres consiste na colheita, preservação e uso de espermatozoides maduros em inseminação artificial. Seu uso permite a movimentação da informação genética masculina de maneira intra e interpopulacional, sem a necessidade de presença física dos animais ou de atividade reprodutiva, facilitando o intercâmbio genético entre cativo e vida livre (BLOTTNER, 1998; PUKAZHENTHI et al., 2006).

A despeito das inúmeras possibilidades associadas às técnicas, sua aplicação segue limitada pelo escasso conhecimento de aspectos relacionados à biologia reprodutiva, sobretudo fisiológicos. A necessidade de pesquisa se traduz nos relatos de insucesso em procedimentos originalmente desenvolvidos para espécies domésticas, que foram aplicados na reprodução assistida de espécies selvagens, inclusive entre primatas (WILDT, ROTH, 1997; MORRELL, 1998). Os mecanismos reprodutivos não são necessariamente conservados entre as espécies, mesmo que elas sejam proximamente relacionadas. Dessa forma, o maior desafio reside na complexidade de padrões reprodutivos diante da necessidade de desenvolvimento de protocolos espécie-específicos. O progresso na área ocorre em um ritmo lento por conta da limitação de recursos (ANDRABI, MAXWELL, 2006). Além disso, há um conflito entre alta demanda por pesquisa e a necessidade de minimizar o estresse causado pela manipulação em espécies raras (FICKEL, WAGENER, LUDWIG, 2007), sendo imperativo o uso otimizado das amostras biológicas. Em suma, o sucesso de aplicação das biotécnicas reprodutivas depende do conhecimento detalhado acerca da biologia reprodutiva, da investigação de

fatores que possam influenciar o sucesso reprodutivo e do desenvolvimento de protocolos espécie-específicos.

Diversos fatores podem influenciar o sucesso reprodutivo, e a investigação daqueles que afetam o potencial reprodutivo de machos é importante para o entendimento da biologia reprodutiva da espécie. Tal conhecimento tem impacto direto sobre a abordagem de manejo, podendo ser decisivo na escolha de parceiros e na identificação de casos de sub-fertilidade que necessitem de intervenções reprodutivas. (FRANCOISE, 2014).

Comparado às fêmeas, o declínio das funções reprodutivas associadas à idade ocorre de maneira bem mais gradual nos machos, e apesar de raramente se observar total perda de fertilidade, a senescência pode trazer impactos sobre o potencial reprodutivo. Em primatas, o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal está associado a muitos aspectos deste declínio, e inclui mudanças comportamentais, alterações endócrinas e neuroendócrinas, associadas à diminuição dos níveis circulantes de hormônios, que entre outros efeitos, causam declínio geral nas respostas fisiológicas e têm impacto sobre a qualidade dos parâmetros seminais (SITZMANN, URBANSKI, OTTINGER, 2008). Em humanos, o ganho de massa corporal, muitas vezes associado à idade e à diminuição dos requerimentos nutricionais, também pode ter impacto substancial sobre aspectos reprodutivos, mostrando influenciar negativamente parâmetros seminais, como a concentração espermática (JENSEN et al., 2004), motilidade e integridade do DNA dos gametas (KORT et al., 2006). Os impactos da idade e peso sobre os parâmetros seminais de primatas neotropicais não são relatados na literatura. Considerar a influência dessas variáveis pode direcionar o desenvolvimento e validação de técnicas reprodutivas capazes de melhorar a viabilidade espermática de amostras empregadas em reprodução.

Neste contexto, as técnicas de seleção espermática possuem diversas aplicações em reprodução que poderiam auxiliar a minimização de problemas relacionados às amostras de baixa qualidade. Os métodos de seleção tem como finalidade replicar *in vitro* o processo pelo qual espermatozoides viáveis são separados dos demais componentes seminais por migração através do muco cervical (SITZMAN, SHARMA, AGARWAL, 2013). Os métodos de seleção podem ser utilizados antes ou depois da criopreservação. Durante o processamento de sêmen é recomendado que os espermatozoides viáveis sejam separados logo que possível do plasma seminal e dos demais tipos celulares, tais como os leucócitos, que podem causar danos aos gametas (WHO, 2010). A seleção também permite a retirada de bactérias e patógenos, células

somáticas, espermatozoides imóveis e imaturos. Após o descongelamento os métodos de seleção são indicados para a remoção de meios e crioprotetores, bem como de células que foram inviabilizadas em virtude da criopreservação (BATISTA, 2009). Inúmeras técnicas e produtos comerciais tem sido desenvolvidos para a seleção de espermatozoides viáveis em aplicações reprodutivas, entre os quais destacam-se os princípios de separação por "*swim up*" e "*swim down*", migração e sedimentação, filtração em lã de vidro e centrifugação em gradientes de densidade (SITZMAN, SHARMA, AGARWAL, 2013). Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens relacionadas ao custo, taxa de recuperação espermática e praticidade que devem ser considerados na escolha, e apesar de sua efetiva aplicação depender de validação específica para as espécies silvestres, seu uso traria grande contribuição para a utilização de biotécnicas reprodutivas, uma vez que somente amostras de boa qualidade podem garantir que os espermatozoides permaneçam viáveis após a criopreservação (FRANCOISE, 2014).

Ainda a respeito da necessidade de protocolos espécie-específicos, diferenças consideráveis têm sido observadas nas características espermáticas com relação à viabilidade, função e sucesso de fecundação, mesmo entre espécies relacionadas (FICKEL, WAGENER, LUDWIG, 2007). Para a maioria dos primatas, uma peculiaridade seminal chama atenção e consiste na coagulação do sêmen imediatamente após a ejaculação (NAGLE, DENARI, 1983). São observadas diferenças no coágulo seminal em relação à consistência, resistência e ao volume, propriedades que variam de acordo com a espécie, indivíduos e o método de colheita de sêmen (VALLE, 2002; SCHNEIDERS, SONKSEN, HODGES, 2004). O fato é que o coágulo seminal traduz-se em um dos principais desafios associados à criopreservação sêmen de primatas neotropicais, pois além de dificultar o processamento e análise, afeta a disponibilidade de gametas com potencial fecundante para reprodução. Há, portanto, a necessidade de se estabelecer protocolos de colheita e diluidores ideais para primatas neotropicais, capazes de promover a dissolução do coágulo sem a perda da viabilidade espermática (VALLE, 2007; DOMINGUES et al., 2011). Para mico-leão-de-cara-dourada, por exemplo, até o momento não é possível a dissolução completa do coágulo seminal, de modo que sua aplicação em técnicas de reprodução assistida é extremamente restrita, limitando-se à utilização de sêmen fresco. Entretanto, na impossibilidade de prolongar a vitalidade dos espermatozoides por meio da criopreservação, os benefícios de inseminação artificial são consideravelmente reduzidos (MORRELL, 1995). Por vezes, o coágulo remanescente do processamento de sêmen é descartado (VIDAL et al., 2007), o que vai de

encontro com o uso otimizado de amostras de espécies silvestres. O uso do sêmen fresco com coágulo seminal em inseminação artificial, mostrou bons resultados em *Callithrix jacchus*, ainda que seu papel na reprodução natural, no sentido de garantir o efetivo transporte do sêmen, ainda requeira elucidação (MORRELL, 1997). Algumas hipóteses tem sido levantadas acerca da função reprodutiva do coágulo seminal, tal como de "plug" vaginal que atuaria como uma barreira física pós cópula (GINSBERG, HUCK, 1989; SOUZA-ARAÚJO, 2012). Na realidade, diante dessas informações evidencia-se a importância de pesquisas acerca dos fatores que podem influenciar o sucesso reprodutivo.

Também é necessário discernimento a respeito de como as biotécnicas reprodutivas poderiam interferir em padrões reprodutivos. Ainda que as técnicas sejam baseadas na simulação dos mecanismos da reprodução natural, a manipulação artificial ignora diversos filtros biológicos e submete os gametas e embriões a estresses ambientais, como meios de cultura e estresse físico (LUCIFERO, CHAILLET, TRASLER, 2004; HORSTHEMKE, LUDWIG, 2005). A epigenética, por exemplo, é crítica para o desenvolvimento normal do embrião (SHARMA, KELLY, JONES, 2010), pois estabelece padrões herdáveis de expressão gênica sem alterar a sequência de nucleotídeos do DNA (GIBBS, 2007; WAGGONER, 2007) permitindo acúmulo de variação genética na população. O controle epigenético atua por meio de diversos mecanismos, que apesar de relativamente estáveis, podem ser alterados mediante estresse ambiental, ocasionando repressão ou expressão inapropriada de genes (SOLLARS et al., 2003). Os RNAs, por exemplo, podem interferir na expressão gênica, sendo que já foram identificados transcritos que podem inibir genes especificamente relacionados ao desenvolvimento embrionário (BOERKE et al., 2007). Porém, estas moléculas são instáveis e sensíveis à manipulação. Dessa forma, as técnicas de reprodução assistida podem ter impacto sobre o epigenoma do embrião (INBAR-FEIGENBERG et al., 2013), ainda que insucesso da reprodução assistida associado às epimutações seja subestimado pelas lacunas de conhecimento nessa área.

Grande parte dos esforços de pesquisa na área são voltados para o entendimento da contribuição materna. Contudo, estudos recentes têm sugerido que o gameta masculino é responsável, além da entrega do genoma haplóide, por contribuir com fatores epigenéticos que regulam a expressão gênica que auxiliam no desenvolvimento embrionário (OSTERMEIER et al., 2004). Neste contexto, a função dos RNAs espermáticos na regulação epigenética vem sendo amplamente investigada. Além da necessidade de pesquisa para a identificação e entendimento da função dos transcritos espermáticos, estes também têm sido

considerados no desenvolvimento abordagens não invasivas para o diagnóstico da fertilidade masculina (PESSOT et al., 1989; BOERKE *et al.*, 2007). As investigações moleculares podem auxiliar o desenvolvimento de biotecnologia, no sentido de assegurar o estabelecimento de padrões normais de desenvolvimento embrionário.

Certamente, entre os primatas neotropicais a espécie que tem sido amplamente solicitada em pesquisas e no desenvolvimento de técnicas reprodutivas é o sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*), considerada um modelo em pesquisas biomédicas, principalmente por não se enquadrar nas categorias de ameaça de extinção (CUI et al., 1991; VALLE et al., 2014). Contudo, a possibilidade de estudo de espécies ameaçadas representa um passo adiante no emprego de biotécnicas reprodutivas como abordagem de conservação. O mico-leão-de-cara-dourada tem se mostrado um modelo promissor entre os primatas ameaçados de extinção. A espécie se reproduz bem em cativeiro e já tem validados diferentes técnicas para a colheita de sêmen, bem como colorações confiáveis para avaliação dos parâmetros seminais (VIDAL et al., 2007; HENRIQUE et al., 2013; SANTOS et al., 2014). A investigação de parâmetros reprodutivos e moleculares que possam influenciar o potencial reprodutivo e serem atribuídos a machos de diferentes idades pode adicionar conhecimento prático para o manejo reprodutivo da espécie em cativeiro e contribuir com os programas de reprodução de espécies proximamente relacionadas que não apresentam o mesmo histórico de reprodução em cativeiro e configuram alvos para futuras intervenções reprodutivas.

2. OBJETIVOS

Visando contribuir com o desenvolvimento e pesquisas do Núcleo de Reprodução Assistida da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e com o manejo da espécie mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*), este trabalho teve por objetivo investigar parâmetros seminais e moleculares potencialmente envolvidos no sucesso reprodutivo de machos da espécie. Dessa forma, os objetivos específicos do trabalho foram:

- Realizar a colheita de sêmen de indivíduos sexualmente maduros em diferentes faixas etárias, afim de investigar a influência das variáveis de peso e idade sobre os parâmetros seminais de animais mantidos em cativeiro.
- Validar um protocolo de seleção espermática para a espécie, utilizando gradiente descontínuo de Percoll, com intuito de isolar espermatozoides viáveis dos demais

componentes seminais para aplicações em biotecnologias reprodutivas e estudos moleculares.

- Estabelecer um protocolo de extração de RNA de amostras espermáticas, sobretudo da porção coagulada do sêmen, almejando a otimização do uso de amostras da espécie. A extração de RNA espermático tem por objetivo iniciar a investigação da contribuição epigenética dos gametas masculinos de *Leontopithecus chrysomelas* no sucesso reprodutivo.

3. MANUSCRITOS PRODUZIDOS

Os capítulos seguintes são referentes aos manuscritos produzidos a partir desta pesquisa.

O primeiro, intitulado "*Influência da idade e peso sobre os parâmetro seminais de mico-leão-de-cara-dourada (Leontopithecus chrysomelas) mantidos em cativeiro*" refere-se à investigação da influência dessas variáveis sobre o potencial reprodutivo dos machos amostrados, para os quais também foi testado um protocolo de seleção de espermatozoides viáveis que tem utilidade prática em técnicas de reprodução e estudos moleculares.

O segundo manuscrito, "*Extração de RNA espermático do coágulo seminal de mico-leão-de-cara-dourada (Leontopithecus chrysomelas)*", é referente ao protocolo estabelecido neste trabalho considerando as peculiaridades seminais da espécie e a otimização do uso de amostras biológicas.

Ambos os manuscritos serão submetidos a revistas internacionais com escopo endereçado à conservação.

CAPÍTULO 1

INFLUÊNCIA DA IDADE E PESO SOBRE OS PARÂMETRO SEMINAIS DE MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA (*LEONTOPITHECUS CHRYSOMELAS*) MANTIDOS EM CATIVEIRO

Patrícia Hergert Bacher¹, Paloma Rocha Arakaki², Bruno Sauce³, Rodrigo del Rio do Valle^{4,5} e Andréa Cristina Peripato¹

¹ Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, ³Department of Psychology, Rutgers University, Piscataway, NJ, USA, ⁴Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista, São Paulo, SP, Brazil, ⁵Instituto Biopesca, Praia Grande, SP Brasil.

RESUMO

A biotecnologia reprodutiva endereçada às espécies silvestres representa uma ferramenta importante na conservação *ex situ* e o conhecimento dos fatores que possam influenciar o sucesso reprodutivo é fundamental para a aplicação das biotécnicas. Diante disso, o presente trabalho investigou a influência do peso e idade sobre os parâmetros seminais de indivíduos sexualmente maduros de mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) em cativeiro. Para a espécie também foi testado um protocolo de seleção de gametas masculinos viáveis em gradiente descontínuo de Percoll, afim de contribuir com os esforços de preservação dos recursos genéticos da espécie. O estudo foi realizado mediante a colheita de sêmen utilizando a técnica de vibroestimulação peniana e a avaliação dos parâmetros seminais. Dos dois grupos investigados, velhos e jovens, os resultados indicam que os parâmetros de integridade de membrana plasmática, integridade da membrana acrossômica e atividade citoquímica mitocondrial são afetados pelo peso e envelhecimento dos indivíduos, sugerindo que o potencial reprodutivo dos indivíduos velhos é afetados por esses fatores. A comparação dos parâmetros seminais avaliados antes e após a seleção não demonstrou melhoria significativa na viabilidade espermática, sugerindo que adequações metodológicas ainda são necessárias para a efetiva aplicação da técnica em *Leontopithecus chrysomelas*. Os dados obtidos visam auxiliar o manejo reprodutivo da espécie, bem como contribuir com o desenvolvimento de bancos de recursos genéticos e reprodução assistida dessa e de outras espécies de primatas neotropicais ameaçados.

PALAVRAS-CHAVE: colheita de sêmen, Percoll, viabilidade, biotécnicas reprodutivas, criopreservação, conservação *ex situ*, manejo reprodutivo.

INTRODUÇÃO

O mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) é um primata da família Callitrichidae, endêmico da Mata Atlântica (PINTO; RYLANDS, 1997). Assim como as outras espécies do gênero *Leontopithecus*, o mico-leão-da-cara-dourada está incluído nas listas de espécies ameaçadas (MMA, 2005; IUCN, 2007) e a principal causa do declínio populacional é o extenso histórico de fragmentação e exploração do bioma (PINTO; RYLANDS, 1997; GUIDORIZZI, 2008). O manejo *ex situ* da espécie começou na década de 1970 e, desde então, vem apresentando um histórico de sucesso em programas de reprodução em cativeiro, com estudos apontando, inclusive, maior taxa reprodutiva de indivíduos nascidos em cativeiro, devido à amenização das imprevisibilidades ambientais e limitação de recursos, fatores que geralmente restringem o potencial reprodutivo em ambientes naturais (DE VLEESCHOUWER et al., 2003; PUKAZHENTHI et al., 2006; REZENDE, 2014).

Com o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas como a criopreservação de sêmen, inseminação artificial, ou mesmo a produção e transferência de embriões endereçadas às espécies silvestres, o mico-leão-da-cara-dourada tem se mostrado um modelo promissor entre as espécies do gênero *Leontopithecus*. Desafios para a utilização de machos em biotécnicas reprodutivas permeiam a necessidade de estudos acerca da biologia reprodutiva da espécie. Esses estudos podem adicionar conhecimentos aplicáveis ao manejo reprodutivo e à validação de protocolos espécie-específicos, considerando que os mecanismos reprodutivos não são necessariamente conservados entre as espécies (PUKAZHENTHI et al., 2006; PAULA, 2011). Variações interindividuais também são relevantes no emprego de técnicas reprodutivas, sendo essencial o conhecimento do potencial reprodutivo dos indivíduos e dos fatores que podem influenciá-lo (FRANCOISE, 2014). Vale ressaltar que uma das grandes limitações na aplicação das biotécnicas reprodutivas atribuídas a esses primatas é a coagulação do sêmen, que ocorre logo após a ejaculação (VALLE, 2002; SOUZA-ARAÚJO, 2012). Com isso, o coágulo retém uma grande concentração de espermatozoides do ejaculado, necessitando de diluição para que seja utilizado (BUSH et al., 1975; DOMINGUES et al., 2011).

Apesar de alguns estudos pontuais que investigam a influência da idade nos parâmetros seminais em primatas do velho mundo (MARSON et al., 1991), não há

relatos sobre essa influência no potencial reprodutivo de machos de primatas neotropicais em cativeiro. Esse fator pode ser decisivo na escolha de parceiros para a reprodução natural ou mesmo para utilizá-los em biotécnicas reprodutivas. Assim, a investigação de parâmetros seminais, que possam ter efeito sobre o sucesso reprodutivo em cativeiro e possam ser atribuídos a machos de diferentes idades, parece algo desejável para o entendimento da biologia reprodutiva da espécie. Além disso, a seleção de gametas funcionais traria grande contribuição para a utilização de biotécnicas reprodutivas, uma vez que somente amostras de boa qualidade podem garantir que os espermatozoides permaneçam viáveis após a criopreservação (FRANCOISE, 2014).

Tradicionalmente os parâmetros seminais avaliados são volume do ejaculado, motilidade, concentração e morfologia dos espermatozoides. Isoladamente essas características não são capazes de aferir sobre a qualidade espermática, mas combinadas aumentam a acurácia da avaliação (DURRANT, 1990). Outros testes de viabilidade espermática também são empregados para avaliação dos perfis seminais, como a integridade da membrana plasmática, a integridade da membrana acrossômica e a atividade citoquímica mitocondrial. A primeira é fundamental para a interação dos espermatozoides com o epitélio do trato genital feminino e para a fusão dos gametas (JEYENDRAN et al., 1984); a segunda é essencial para o potencial fecundante do gameta, pois refere-se à vesícula que contém enzimas essenciais à penetração dos espermatozoides na zona pelúcida (YANAGIMACHI, 1994). A avaliação da atividade citoquímica mitocondrial, essencial à motilidade, homeostase e viabilidade espermática (ST. JOHN, 2002), permite a visualização da atividade bioquímica da enzima citocromo c oxidase, componente da maquinaria energética celular (HRUDKA, 1987). Aspectos morfológicos do gameta também são importantes para compor a avaliação seminal, de maneira que todas as variações acerca do formato padrão da cabeça, peça intermediária e cauda são consideradas anormalidades morfológicas (MENKVELDT et al, 1990).

A seleção de espermatozoides pode ser realizada por diferentes técnicas (BEYDOLA; SHARMA; AGARWAL, 2013). Uma das mais difundidas é o gradiente descontínuo de Percoll, que permite o fracionamento do sêmen com o uso de um gradiente de densidade, baseado no princípio de que sob centrifugação as células se movem para regiões com densidade correspondente. Assim, espera-se que os espermatozoides de maior viabilidade fiquem retidos em uma camada separada dos demais componentes seminais, como plasma, rejeitos celulares, células somáticas e

bacterianas, espermatozoides mortos ou de baixa motilidade (ZÚCCARI et al., 2008; BATISTA, 2009). Apesar da ampla demanda de utilização do Percoll, o uso clínico em reprodução humana foi suspenso a partir de 1996, após relatos não comprovados de contaminação por endotoxinas (McCANN, CHANTLER, 2000; MOUSSET-SIMÉON et al., 2004). Desde então, vários produtos foram lançados, sem a constatação de diferenças significativas entre esses e o Percoll (RODRÍGUEZ-MARTINEZ et al., 1997; MENDES et al., 2003; HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2005). A grande vantagem da técnica de seleção por gradiente de densidade consiste na separação dos espermatozoides potencialmente férteis, com uma alta taxa de recuperação de espermatozoides e taxa de prenhes pós migração, superior a outras técnicas de seleção (GUERIN et al., 1989; ZÚCCARI et al., 2008).

O conhecimento de aspectos que possam influenciar o potencial reprodutivo do mico-leão-de-cara-dourada visa contribuir com o manejo reprodutivo desta e de outras espécies de primatas neotropicais ameaçados mantidos em cativeiro. Neste trabalho foi investigada a influência da idade e peso sobre os parâmetros seminais de indivíduos jovens e velhos de mico-leão-de-cara-dourada alocados na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Além disso, foi testada a técnica de seleção de espermatozoides viáveis em gradiente de Percoll, visando o desenvolvimento de protocolos espécie-específicos para contribuir com a preservação de recursos genéticos de primatas neotropicais. A perspectiva da aplicação de biotécnicas reprodutivas pode auxiliar as decisões de manejo fornecendo alternativas para casos que necessitem de intervenções reprodutivas. A exemplo de casos como do mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*), primata criticamente ameaçado que não apresenta o mesmo histórico de sucesso reprodutivo em cativeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados neste trabalho indivíduos machos sexualmente maduros de mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e integrantes de diferentes grupos familiares. O zoológico está localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, o maior remanescente de Mata Atlântica da cidade de São Paulo, Brasil. Os animais eram mantidos em grupos pequenos em recintos tanto da exposição quanto do setor extra,

fora da área de visitação; ambos semiabertos, expostos às alterações climáticas locais, mas com pontos de refúgio para os animais. A dieta foi elaborada pelo Setor de Alimentação Animal da instituição, oferecida em dois momentos no período da manhã, inicialmente era oferecida a ração e carne e, mais tarde, frutas e legumes; ao longo do dia eram oferecidos insetos e os itens eram diversificados ao longo da semana. A água ficava disponível *ad libitum*. As dietas foram balanceadas de acordo com as necessidades nutricionais da espécie.

Os 12 animais utilizados neste estudo foram divididos em dois grupos, “Velhos” e “Jovens”. No primeiro grupo a idade média dos animais era de 11,6 anos e no segundo, 4,8 anos (ver Tabela1). Durante o procedimento foi necessária a presença de um profissional treinado para realizar a contenção física dos animais, sempre um veterinário ou enfermeiro do Setor de Veterinária da FPZSP.

Todos os procedimentos de experimentação animal foram realizados mediante aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA N° 045/2014) e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBio - N° 46715-1).

Colheita e processamento do sêmen dos animais

As campanhas foram agendadas, de acordo com a disponibilidade da FPZSP, nos meses de Junho, Agosto e Dezembro de 2015, para a obtenção de três amostras de sêmen de cada animal. O procedimento de colheita foi realizado no período da manhã, obedecendo o máximo de 3 animais/dia em virtude da viabilidade do processamento das amostras.

Previamente à colheita de sêmen foi realizada a limpeza da região genital dos animais com gaze estéril e água morna para minimizar o desconforto.

A técnica utilizada para a colheita de sêmen foi a vibroestimulação peniana (VEP), validada para diferentes espécies de primatas neotropicais (YEOMAN et al., 1997; KUEDERLING et al., 2000, VALLE et al., 2008), inclusive *Leontopithecus chrysomelas* (HENRIQUE et al., 2013). Para o estímulo foi utilizado o aparelho FERTI CARE® personal (*Multicept*, Copenhagen, Dinamarca), que permite a alteração da frequência e a amplitude da vibração. Sob a plataforma vibratória do aparelho foi

adaptado o acoplamento de pequenos tubos de vidro cilíndricos com bordas arredondadas para a simulação de uma vagina artificial, onde o sêmen foi coletado.

A colheita foi realizada com estímulo da região perianal e com a introdução do pênis no tubo de vidro (Figura 1), a partir de uma amplitude mantida fixa (1mm) e frequência que foi gradualmente aumentada de acordo com a necessidade de cada animal (70 à 80 Hz). Conforme o protocolo de Valle e colaboradores (2008), o tempo total de colheita não ultrapassou 20 minutos, considerando períodos de estímulo de 2 minutos, intercalados com 30 segundos de pausa. Para minimizar o estresse nos animais foram ofertados itens alimentares (larvas de tenébrio e frutas) durante os intervalos de estímulo.



Figura 2. Colheita de sêmen por vibroestimulação peniana, a seta branca indica o coágulo seminal formado logo após a ejaculação. Foto: Patrícia H. Bacher.

No momento da ejaculação o sêmen forma um coágulo (Figura 1) que precisa ser diluído para a avaliação dos parâmetros seminais. Assim, após a ejaculação as amostras foram imediatamente transferidas para microtubos com BWW (BIGGERS; WHITTEN; WHITTINGHAM, 1971) à 37°C. Ainda na sala de colheita foi realizada a mensuração do pH seminal, a partir do contato da fita indicadora (Merck®, Darmstadt, Alemanha) com a glândula.

O processamento das amostras foi realizado no Núcleo de Reprodução Assistida da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Foram reservados 30 minutos de incubação a 37°C para a diluição parcial do coágulo seminal. Após a quantificação do volume do ejaculado e do coágulo seminal, foram separadas alíquotas da fração líquida para avaliação dos parâmetros seminais.

Avaliação dos parâmetros seminais

A análise do efeito do peso e da idade sobre a qualidade espermática foi avaliada por meio dos parâmetros seminais, de acordo com os protocolos de preparo e avaliação utilizados no Núcleo de reprodução Assistida da fundação, como brevemente descrito nas seções seguintes.

Motilidade: Para a análise de motilidade foi utilizado 10 µL da fração líquida da amostra entre lâmina e lamínula a 37°C. A motilidade total foi verificada em microscópio óptico com aumento de 20x, aferida pela porcentagem de espermatozoides móveis; a motilidade progressiva foi observada sob aumento de 40x, considerando apenas a porcentagem dos espermatozoides com movimento retilíneo.

Concentração: A concentração espermática é dada pelo número de espermatozoides por unidade de volume. Foi realizada a diluição da amostra em 1:10 ou 1:20 em solução de formol salina a 10%, mantida a 37°C. A estimativa de concentração foi feita mediante a contagem em câmara de Neubauer *Improved*. Em cada campo da lâmina foi adicionada uma alíquota de 10µl da diluição, sendo reservados cinco minutos para a sedimentação dos espermatozoides, contados em seguida sob aumento de 40x.

O cálculo da concentração é baseado no número de células contadas na câmara de Neubauer e no fator de diluição das amostras, fornecendo uma estimativa do número de espermatozoides por mililitro.

Integridade de Membrana Plasmática: foi avaliada por meio da coloração de Eosina 1% e Nigrosina 10% em solução aquosa. Para a coloração foi adicionado 5 µL da amostra em 5 µL do corante em microtubo estéril, a solução foi incubada durante 30 segundos e depois foram preparadas as lâminas de esfregaço, mantidas previamente a 37°C, mesma temperatura de secagem. Em seguida foram contadas 200 células, sob aumento de 100x em óleo de imersão. A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides pode ser aferida por meio da avaliação da penetração do corante

eosina/nigrosina, como pode ser observado na Figura 2. Espermatozoides com membranas lesadas permitem a penetração do corante e no microscópio são visualizadas em rosa. Já as células com membrana plasmática íntegra parecem brancas devido a não penetração do corante. Essa avaliação é um parâmetro importante para o potencial fecundante dos gametas. Assim, os resultados foram expressos pela porcentagem de células íntegras (não coradas).



Figura 3. Integridade da membrana plasmática. (1) Espermatozoide com membrana plasmática lesada; (2) Espermatozoide com membrana plasmática íntegra. Foto: Patrícia H. Bacher

Integridade da Membrana do Acrossoma: A integridade da membrana do acrossoma foi avaliada com o uso da coloração simples *Fast-Green/Rosa Bengala* descrita por Pope et al. (1991) e validada por Valle et al. (2008) em primatas neotropicais. Foram preparadas duas lâminas de esfregaço com 5 μ L de amostra e 5 μ L da coloração, incubadas sob abrigo de luz por 120 segundos, as lâminas foram secas a 37°C. Para a análise foram avaliadas 200 células em microscópio óptico, com objetiva de 100x sob óleo de imersão. Foram considerados íntegros os espermatozoides com acrossoma corado em roxo e lesados aqueles sem coloração, como observado na Figura 3. Os resultados foram expressos pela porcentagem de células íntegras.

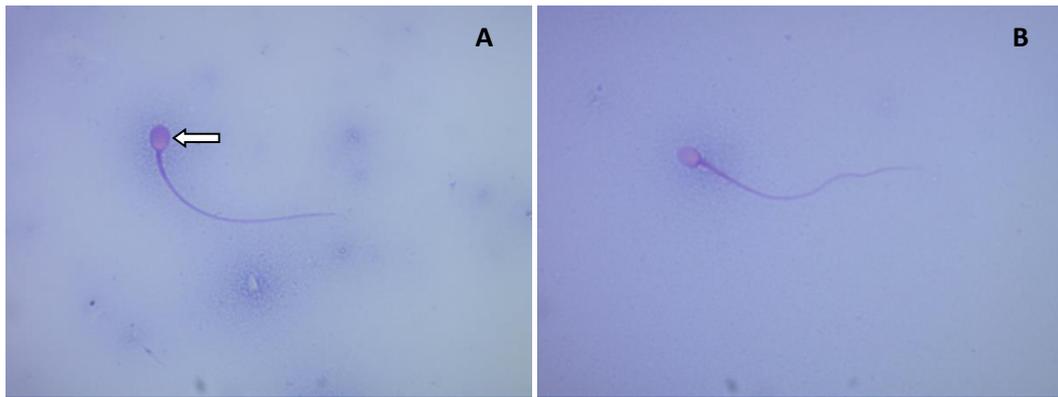


Figura 4. Integridade da membrana do acrossoma. (A) Acrossoma íntegro em roxo, indicado pela seta e (B) Acrossoma lesado. Foto: Patrícia H. Bacher

Atividade citoquímica mitocondrial: A atividade mitocondrial foi avaliada mediante a coloração dos espermatozoides com 3,3'diaminobenzidina (DAB), seguindo Hrudka (1987). Por ser fotossensível, todo o procedimento foi conduzido sob condições de luminosidade reduzida. Para a preparação dos esfregaços de DAB, o corante foi mantido a -20°C e somente descongelado no momento do uso. A amostra de sêmen ($10\mu\text{L}$) foi incubada com $20\mu\text{L}$ de DAB a 37°C por uma hora. Os esfregaços foram feitos com $10\mu\text{L}$ da solução e secos em placa aquecedora. Após secagem as lâminas foram fixadas em formol 10% durante 10 minutos. A leitura foi realizada em microscópio óptico com contraste de fase em aumento de 100x sob óleo de imersão. Foram avaliados 200 espermatozoides e classificados com base nas categorias estabelecidas por Hrudka (1987) que considera a deposição resultante da reação do DAB com componentes da maquinaria energética mitocondrial (Figura 4.):

Classe I - Todas as mitocôndrias estão ativas, visualmente observa-se a peça intermediária totalmente corada pela deposição de DAB;

Classe II- Mais da metade da peça intermediária apresenta-se corada;

Classe III- Menos da metade da peça intermediária apresenta-se corada;

Classe IV- A peça intermediária não possui nenhuma deposição, indicando inatividade mitocondrial.

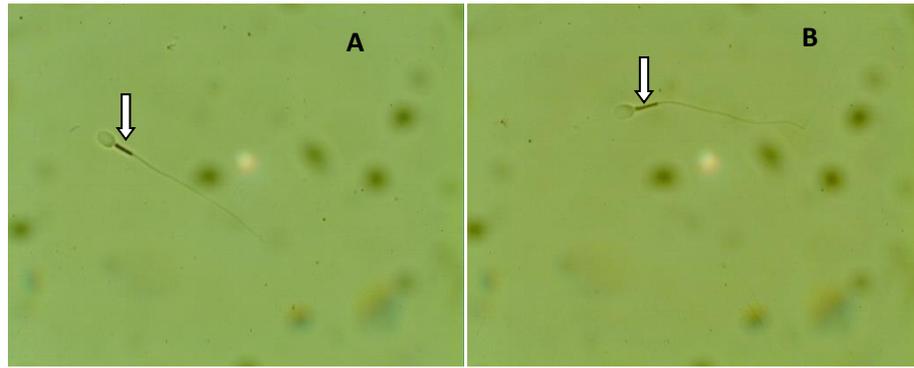


Figura 5. Atividade citoquímica mitocondrial. As setas indicam a deposição de DAB na peça intermediária, onde estão localizadas as mitocôndrias. (A) Classe I; (B) Classe II. Foto: Patrícia H. Bacher.

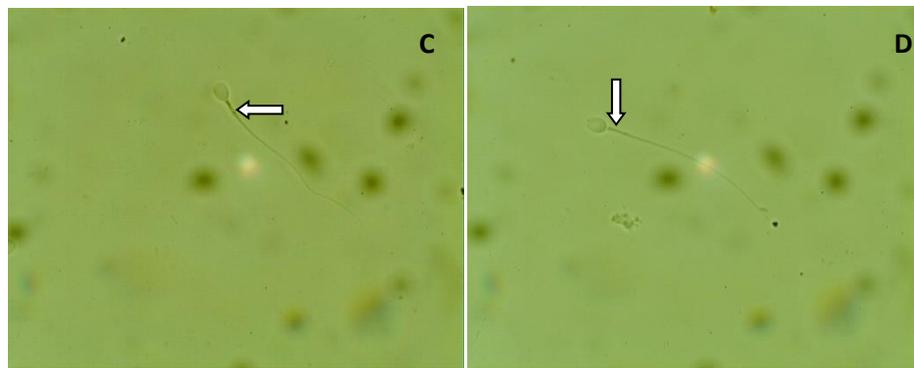


Figura 6. Atividade citoquímica mitocondrial. As setas indicam a deposição de DAB na peça intermediária, onde estão localizadas as mitocôndrias (A) Classe I; (B) Classe II; (C) Classe III e (D) Classe IV. Veja texto para detalhes. Foto: Patrícia H. Bacher.

Morfologia: As amostras destinadas à avaliação da morfologia dos espermatozoides foram preparadas com a amostra diluída na razão 1:10 e 1:20 em formol salina 10%. Dez microlitros desta solução foram utilizados para o preparo das lâminas, avaliadas em microscópio óptico com contraste de fase sob aumento de 100x em óleo de imersão. As células foram avaliadas de acordo com Blom (1973), em que os gametas são classificados em três categorias: espermatozoides normais, espermatozoides com defeitos menores e espermatozoides com defeitos maiores. Estes critérios já foram utilizados em primatas neotropicais, como *Callithrix jacchus* (VALLE, 2007).. Foram avaliadas 200 células diferenciando os espermatozoides normais dos que apresentavam defeitos morfológicos na cabeça, cauda ou peça intermediária.

Seleção espermática

Após a avaliação prévia dos parâmetros seminais, as amostras foram conduzidas para a seleção em gradiente de densidade e reavaliadas em relação à motilidade, mitocondrial e morfologia.

Inicialmente foi ajustada a osmolaridade do Percoll comercial (GE Healthcare Bioscience - Uppsala, Suécia) com a adição de uma parte de NaCl (1,5M) em nove partes de Percoll puro, que passou a ser utilizado como Solução Isotônica de Percoll 100% (SIP). A osmolaridade resultante da solução foi de 320 mOsm, compatível com o meio de incubação utilizado. Foram preparadas duas concentrações de Percoll - 80% e 40% - a partir da diluição da SIP em meio BWW. A montagem do gradiente foi realizada no dia da colheita em microtubo de 1,5 mL. O gradiente foi mantido a 37°C até a centrifugação. A fração líquida do ejaculado foi quantificada e adicionada acima do gradiente. Após a centrifugação (500xG, a 37°C durante 20 minutos), as camadas superiores foram retiradas e o *pellet* ressuscitado na proporção 1:2 em meio BWW aquecido.

Para a validação da técnica de seleção com Percoll foi realizada a reavaliação dos parâmetros seminais, como motilidade total e progressiva, concentração, integridade das membranas plasmática e acrossômica, atividade mitocondrial e morfologia, conforme descrito anteriormente.

Ao restante das amostras, bem como aos coágulos seminais, foi adicionado cinco volumes de RNA *holder* (BioAgency - São Paulo, Brasil) e todas as amostras foram armazenadas a -80°C para futuras aplicações.

Análise estatística

A distribuição dos dados foi testada no programa *GraphPad Prism* (versão 6.01, San Diego, USA) utilizando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Parâmetros que rejeitaram a premissa de normalidade ($p > 0,05$) foram transformados em logaritmo de base 10 e em raiz quadrada e reavaliados quanto à assimetria (entre -2 e 2) e curtose (entre -3 e 3).

Os dados das colheitas foram testados com relação à consistência das réplicas, utilizando dois testes complementares: (1) Coeficiente de correlação intraclassa

(*Intraclass Correlation Coefficient* - ICC) que foi analisado no programa *MedCalc* (versão 16.2.1, Ostend, Bélgica) e, (2) ANOVA para medidas repetidas, realizada no programa *GraphPad Prism* (versão 6.01, San Diego, EUA). O primeiro é uma ferramenta estatística utilizada para a mensuração direta da confiabilidade entre réplicas, de forma que o coeficiente indica o nível de concordância entre as avaliações: entre 0 e 0,2 - baixa; entre 0,3 e 0,4 - razoável; entre 0,5 e 0,6 - moderada; entre 0,7 e 0,8 - alta e, acima de 0,8 seria concordância quase perfeita entre as avaliações (LANDIS, KOCH, 1977). O segundo testa o efeito da réplica sobre os dados obtidos nas três colheitas, de forma que indiretamente, quanto maior o valor de p, maior a confiabilidade entre as colheitas de sêmen (VON ENDE, 2001). Para dados com baixa consistência foi feito o teste de esfericidade de *Mauchly* no programa *SPSS* (versão 23, Londres, Inglaterra) para checar se as colheitas em si estariam afetando as variâncias das medidas.

Para a correção de valores extremos foi considerado *outlier* qualquer valor fora de três desvios padrão em relação à média, em ambas extremidades da distribuição.

A diferença entre os dois grupos amostrados - "Velhos" e "Jovens" - foi avaliada no *GraphPad Prism* (versão 6.01, San Diego, EUA) mediante teste *t* de *Student* com correção de Sidak-Bonferroni ($\alpha=0,05$) para múltiplas comparações.

O teste ANOVA para medidas repetidas foi conduzido para a comparação dos parâmetros seminais avaliados antes e depois da seleção em gradiente descontínuo de Percoll. As três réplicas de colheita avaliadas inicialmente foram contrastadas com as três réplicas avaliadas após a seleção, utilizando a variável "Pré e Pós Percoll" como covariante.

A regressão linear múltipla foi utilizada para verificar a associação e o tipo de influência das variáveis de peso e idade sob os parâmetros seminais avaliados: tempo de estímulo, pH, volume do ejaculado, concentração, motilidade total e progressiva, integridade de membrana plasmática, integridade da membrana do acrossoma, atividade citoquímica mitocondrial e morfologia.

RESULTADOS

Os animais selecionados para a investigação de seus parâmetros seminais estão representados na Tabela 1, onde pode-se verificar que o grupo "Velhos" compreendeu

indivíduos entre 8 e 14 anos, com peso médio de 711 g, enquanto os “Jovens” tinham idade entre 4 e 5 anos, com peso corporal médio de 687g, significativamente menor ($p=0,048$).

Das 33 tentativas de colheita de sêmen em mico-leão-de-cara-dourada pelo uso da técnica de vibroestimulação peniana, obteve-se sucesso de 93,94%. Duas ausências de ejaculação foram encontradas no mesmo indivíduo, o animal 29.431. Em dois animais, 25.852 e 30.230, somente foi possível a obtenção de uma amostra, enquanto que no animal 30.163 foram realizadas duas colheitas de sêmen.

As amostras de sêmen foram obtidas em tempo médio de 9 minutos (do início do estímulo até o momento da ejaculação), em que foi mantida amplitude de vibração de 1mm e a frequência variou de 75 à 85 Hz. O grupo de “Velhos” demorou mais tempo (em média 10 minutos) do que o grupo de “Jovens” (em média 7,5 minutos) para obtenção das amostras.

Os valores médios de pH seminal mostraram que entre os animais “Velhos” (7,83) o ejaculado é mais ácido em relação ao dos “Jovens” (7,98). Os volumes médios dos ejaculados encontrados foram 80,5 μ L e 78,63 μ L, para os grupos “Velhos” e “Jovens”, respectivamente. No entanto, as diferenças observadas não se mostraram estatisticamente significativas para os parâmetros de tempo, pH e volume anteriormente descritos.

Tabela 1. Descrição dos dados individuais, das colheitas de sêmen, pH e volume do ejaculado de *Leontopithecus chrysomelas* mantidos em cativeiro, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Grupo	Animal	Nascimento	Idade (anos)	Peso (g)	Nº de colheitas	Tempo (min)	pH	Volume ejaculado (µL)
Velhos	25.852	30/04/2001	14	651,00	1	7,00	8,2	107,80
	27.247	05/03/2002	14	761,67	3	5,00	7,65	119,43
	27.690	05/09/2002	13	712,67	3	3,67	7,5	85,57
	29.430		11*	708,33	3	14,33	7,7	49,57
	29.431	05/02/2007	9	715,00	1	21,00	8,1	104,00
	29.658	25/01/2008	8	716,67	3	9,33	7,8	33,35
Média do grupo			11,5	710,89^a	-	10,06^a	7,83^a	83,29^a
Jovens	30.156	16/07/2010	5	688,33	3	10,33	7,65	74,20
	30.163	28/08/2010	5	682,50	2	9,00	8,4	44,95
	30.164	28/08/2010	5	669,00	3	6,67	8,05	85,27
	30.169	20/09/2010	5	694,00	3	5,00	7,9	91,17
	30.191	16/12/2010	5	698,00	3	12,00	7,9	97,43
	30.230	10/03/2011	4	692,00	3	2,00		45,30
Média do grupo			4,83	687,31^b	-	7,5^a	7,98^a	73,05^a
Valor de p			0,0482238		0,725995		0,465345	0,922687

Os valores de peso, tempo, pH e volume são referentes às médias das colheitas de sêmen de cada animal, * representa idade aferida pela data de entrada no zoológico, por se tratar de animal de vida livre.^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p > 0,05$) entre "Velhos" e "Jovens" no teste t *Student*.

Do total de amostras encaminhadas ao Núcleo de Reprodução Assistida/FPZSP, vinte e nove apresentaram espermatozoides na fração líquida após a incubação e foram avaliadas quanto aos parâmetros seminais. Apesar de sucesso nas três colheitas, em duas ocasiões o indivíduo 30.230 não apresentou espermatozoides na fração líquida após a incubação do coágulo seminal em meio BWB. Os valores médios correspondentes às avaliações das três réplicas de colheita de sêmen são mostrados resumidamente na Tabela 2 (Dados completos no Material Suplementar 1, 2 e 3), juntamente com as respectivas análises de consistência entre as réplicas (ICC e o teste medidas repetidas ANOVA) e das diferenças observadas entre os dois grupos (teste t de *Student*).

Tabela 2. Avaliação dos parâmetros seminais de *Leontopithecus chrysomelas* mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2015.

	Grupo Velhos (N=6)	Grupo Jovens (N=6)	ICC ¹	RM ANOVA	Valor de p
Concentração (esperm./mL)	78,5x10 ⁶ ± 15x10 ⁶	101x10 ⁶ ± 16,4x10 ⁶	0,622	0,3054	0,1649
Motilidade total (%)	64,64 ± 6,64	76,00 ± 4,86	0,758	0,4878	0,0890
Motilidade progressiva (%)	48,29 ± 8,13	47,20 ± 7,56	0,659	0,1855	0,9926
IMP (%)	86,04 ± 2,40 ^a	91,87 ± 1,48 ^b	0,931	0,0065	0,0496
IMA (%)	83,86 ± 1,90 ^a	91,80 ± 0,96 ^b	0,904	0,0319	0,0094
ACM - Classe I (%)	45,42 ± 5,18	54,21 ± 2,76	0,9308	0,0306	0,1918
ACM - Classe II (%)	26,42 ± 1,92	30,82 ± 2,65	0,5421	0,002	0,5391
ACM - Classe III (%)	17,58 ± 3,61	11,07 ± 1,52	0,8237	0,1597	0,0783
ACM - Classe IV (%)	12,54 ± 3,56 ^a	3,86 ± 0,66 ^b	0,9405	0,235	0,0267
Morfologia - defeitos maiores (%)	21,75 ± 1,90	22,44 ± 2,86			
Morfologia - defeitos menores (%)	62,00 ± 2,05	61,56 ± 3,84			

Média ± Erro Padrão. IMP = Integridade de Membrana Plasmática; IMA = Integridade de Membrana do Acrossoma; ACM = Atividade Citoquímica Mitocondrial; ¹Medida média, ICC acima de 0,6 indica consistência entre as réplicas; em análise de medidas repetidas ANOVA p>0,05 indica repetibilidade entre as réplicas; ^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p>0,05) entre "Velhos" e "Jovens" no teste *t Student*;

Os resultados mostrados na Tabela 2 indicam que os parâmetros de concentração espermática, motilidade total e motilidade progressiva não diferiram significativamente entre os "Velhos" e os "Jovens". Por outro lado, dos espermatozoides avaliados quanto à integridade da membrana plasmática, o grupo "Velhos" apresentou uma integridade significativamente menor (p=0,049) que no grupo dos "Jovens"; assim como para o parâmetro de integridade da membrana acrossômica em que as diferenças também foram significativas (p=0,009). Do total de espermatozoides avaliados a respeito da atividade citoquímica mitocondrial somente a Classe IV teve diferenças significativas entre os dois grupos (p=0,026), de forma que os animais "Velhos" apresentaram número de espermatozoides com mitocôndrias inativas significativamente maior. A avaliação da morfologia espermática não mostrou diferenças significativas entre os grupos, ambos apresentaram uma grande porcentagem de defeitos, sobretudo na cauda dos espermatozoides. De maneira geral, entre os defeitos maiores a categoria mais observada foi a cauda fortemente dobrada (15,73%) e defeitos na peça intermediária (3,55%), entre os defeitos menores as categorias mais expressivas foram a cauda

dobrada (34,24%), cabeça isolada normal (12,63%) e cauda enrolada (5,81%) - detalhes no Material Suplementar 4 e 5.

A idade utilizada no delineamento amostral foi utilizada como variável independente nas regressões lineares, para verificar a influência sobre os parâmetros seminais. Assim como o peso dos indivíduos, que também apresentou diferenças significativas entre os grupos amostrados. Uma correlação simples mostrou que as variáveis de idade e peso não são positivamente correlacionadas, ou seja, os animais mais velhos não necessariamente são os animais mais pesados, os resultados das regressões são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Relação Entre os Parâmetros Seminiais e as Variáveis de Idade e Peso de *Leontopithecus chrysomelas* mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2015.

Parâmetros seminiais	Idade	B	Peso	B
Pré Percoll	(valor de p)		(valor de p)	
Tempo	0,147	-0,477	0,610	-0,030
PH	0,063	-0,034	0,141	-0,004
Volume do ejaculado	0,528	1,900	0,548	0,252
Motilidade total	0,179	-3,100	0,066	-0,518
Motilidade progressiva	0,448	-1,987	0,298	-0,347
Concentração	0,297	-3,91x10 ⁶	0,317	-5,49x10 ⁵
Integridade de membrana plasmática	0,021	-1,670	0,010	-0,231
Integridade de membrana do acrossoma	0,050	-1,256	0,009	-0,200
Atividade mitocondrial classe I	0,055	-2,547	0,063	-0,343
Atividade mitocondrial classe II	0,224	-0,457	0,080	-0,082
Atividade mitocondrial classe III	0,024	1,710	0,033	0,229
Atividade mitocondrial classe IV	0,077	1,746	0,016	0,275
Morfologia - defeitos maiores	0,069	2,347	0,067	0,313
Morfologia - defeitos menores	0,196	-1,485	0,153	-0,204

Em destaque os valores com $p < 0,05$, indicando correlação significativa entre os parâmetros seminiais e as variáveis independentes de Idade e Peso. B é o coeficiente de regressão não padronizado.

Além do efeito de idade e peso sobre os parâmetros seminiais, foi verificada a eficiência da seleção espermática em gradiente descontínuo de Percoll. A análise foi feita a partir

da reavaliação dos parâmetros após a centrifugação. Os resultados são mostrados na Tabela 4, juntamente com as análises de variância entre as réplicas pré e pós seleção.

Tabela 4. Comparação dos Parâmetros Seminais Pré e Pós Gradiente Descontínuo de Percoll de *Leontopithecus chrysomelas* mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2015.

	Grupo Velhos (N=6)		Grupo Jovens (N=6)		ANOVA
	Pré Percoll	Pós Percoll	Pré Percoll	Pós Percoll	
Concentração (esperm./mL)	78,5x10 ⁶ ± 15x10 ⁶	88,6x10 ⁶ ± 21,1x10 ⁶	97,2x10 ⁶ ± 15,7x10 ⁶	96,2x10 ⁶ ± 17,0x10 ⁶	0,106
Motilidade total (%)	73,21 ± 5,94	43,79 ± 9,682	76,00 ± 4,86	67,80 ± 7,41	0,462
Motilidade progressiva (%)	48,29 ± 8,13	52,14 ± 8,735	47,20 ± 7,56	60,80 ± 8,62	0,540
IMP (%)	86,04 ± 2,40	83,50 ± 4,735	91,87 ± 1,48	91,40 ± 2,38	0,464
IMA (%)	83,86 ± 1,89	78,63 ± 6,85	91,80 ± 0,96	87,80 ± 3,25	0,151
ACM - Classe I (%)	45,42 ± 5,18	27,13 ± 11,94	54,21 ± 2,76	45,00 ± 1,17	0,281
ACM - Classe II (%)	26,42 ± 1,92	20,38 ± 6,82	30,82 ± 2,65	42,80 ± 1,70	0,584
ACM - Classe III (%)	17,58 ± 3,61	15,25 ± 6,66	11,07 ± 1,52	8,800 ± 0,77	0,348
ACM - Classe IV (%)	12,54 ± 3,56	11,00 ± 5,70	3,857 ± 0,66	3,4 ± 0,86	0,634
Morfologia - defeitos maiores (%)	21,75 ± 1,90	24,56 ± 5,07	22,44 ± 2,86	25,11 ± 2,91	0,941
Morfologia - defeitos menores (%)	62,00 ± 2,05	50,44 ± 5,09	61,56 ± 3,84	54,44 ± 3,78	0,115

Média ± erro padrão para cada indivíduo. IMP = Integridade de Membrana Plasmática; IMA = Integridade de Membrana do Acrossoma; ACM = Atividade Citoquímica Mitocondrial; ANOVA = comparação entre as réplicas, p<0,05 indica diferença significativa entre os valores pré e pós Percoll na amostragem geral.

DISCUSSÃO

A criação de bancos de recursos genéticos e a implantação de um programa de reprodução assistida direcionada às espécies silvestres podem contribuir com as estratégias de conservação, pois poderá facilitar o intercâmbio genético entre instituições e aumento da variabilidade genética dos animais. Para *Leontopithecus chrysomelas* obtivemos na colheita de sêmen, uma das fases essenciais da reprodução assistida, uma taxa de sucesso de 93,94% utilizando a técnica de vibroestimulação peniana (VEP). Essa taxa foi semelhante à reportada por outros autores utilizando a mesma técnica em *Leontopithecus chrysomelas* (WATANABE, 2015), *Callithrix jacchus* (SCHINEIDERS et al., 2004; VALLE et al., 2014) e *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997).

A totalidade de sucesso não foi possível pela ocorrência de duas ausências de ejaculação nas colheitas de um mesmo indivíduo, pertencente ao grupo dos "Velhos". Este indivíduo apresentou ereção somente nos ciclos finais de estímulo, de modo que decorridos 20 minutos totais estabelecidos na metodologia o procedimento foi finalizado e considerado como falha. Falhas consecutivas na colheita de sêmen da mesma espécie também foram reportadas em um indivíduo com idade estimada de 13 anos (WATANABE, 2015). O fato de em ambos os casos os indivíduos serem considerados adultos com idade avançada sugere que a demora na resposta aos estímulos pode estar relacionada à idade, fator que reforça a necessidade do estabelecimento de um limite para a duração da realização do procedimento.

A coagulação do sêmen após a ejaculação tem sido um dos problemas a serem enfrentados para a utilização dos gametas desses animais em biotécnicas reprodutivas (VALLE, 2002; SOUZA-ARAÚJO, 2012). A diluição com BWW foi eficiente para a dissolução parcial do coágulo na grande maioria das colheitas empregadas. Porém, a ausência de espermatozoides foi observada em duas tentativas de colheita do animal 30.230. Alguns trabalhos têm proposto técnicas para a dissolução do coágulo, como o uso de enzimas proteolíticas (MORREL; HODGES, 1998; PAZ et al., 2006) e diluidores à base de água de coco (ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010). No entanto, o uso de tratamentos enzimáticos ou mesmo o tempo requerido para a dissolução total do coágulo seminal em água de coco poderiam comprometer a viabilidade espermática que o presente trabalho se propôs avaliar (HERNÁNDEZ-

LÓPEZ et al., 2002; PAZ et al., 2006). A opção de não utilizar nenhum tratamento para a dissolução do coágulo acarreta em perda de uma grande quantidade de gametas viáveis, uma vez que este coágulo costuma ser descartado após a incubação no meio diluidor e da separação da fração líquida (VIDAL et al., 2007).

Embora atualmente não se identifique aplicabilidade em técnicas de reprodução, o espermatozoide contido no coágulo seminal consiste de uma fonte rica de material genético, que pode ser encaminhado para pesquisas acerca das bases genéticas da reprodução, como fatores associados à fertilidade, desordens genéticas e outros mecanismos envolvidos no sucesso reprodutivo. Durante a espermatogênese os espermatozoides diferenciam-se notavelmente de células somáticas não somente pela redução cromossômica, mas também no envelhecimento da cromatina e na estrutura da membrana plasmática, alterações fundamentais para assegurar a viabilidade espermática no trato genital feminino e no potencial de fecundação (BARRERA et al., 1993; FLESCHE; GADELLA, 2000; CHAN et al., 2015). Essas peculiaridades permitem o isolamento dos espermatozoides, mesmo quando retidos no coágulo, por meio da lise de células somáticas (RAUBER, 2008). Dessa forma, o coágulo seminal de *Leontopithecus chrysomelas*, inclusive do animal 30.230, pôde ser utilizado para investigações iniciais da contribuição epigenética dos gametas masculinos no sucesso reprodutivo (BACHER, P.H.; VALLE, R.R.; PERIPATO, A.C., 2016 - em preparação).

A idade pode ser um fator a ser considerado na seleção de machos para a reprodução, pois foi possível constatar diferenças importantes nas comparações entre os dois grupos amostrados neste trabalho. De maneira geral, os indivíduos mais velhos apresentaram massa corporal significativamente maior que os jovens. Este aumento pode estar relacionado com a diminuição dos requerimentos nutricionais à medida que os animais envelhecem (ANDRADE et al., 2002).

Os dados das colheitas apresentados na Tabela 1 mostram sugerem que, entre os indivíduos "Velhos", o tempo de estímulo e o volume de ejaculado, sejam maiores, conforme reportado anteriormente, porém essas diferenças não se mostraram significativas. Em média, o pH foi mais ácido no grupo de "Velhos" do que nos "Jovens", apesar da diferença também não ter sido significativa entre os grupos. Em uma única amostragem de sêmen de indivíduos velhos e jovens Watanabe (2015) verificou diferenças significativas com relação ao pH seminal de *Leontopithecus*

chrysomelas, sendo que os indivíduos idosos apresentaram ejaculados mais básicos em relação aos jovens. Com a realização de réplicas o pH seminal mostrou um perfil diferente.

A avaliação dos parâmetros seminais é fundamental para o estudo do potencial reprodutivo dos indivíduos em cativeiro. Os parâmetros seminais mostraram coeficientes de correlação intraclasse satisfatórios (acima de 0,6), que na maioria dos casos, são corroborados pela análise de medidas repetidas ANOVA ($p > 0,05$), indicando que os dados são consistentes entre si e que houve repetibilidade entre as réplicas de colheita. Os testes *t de Student* mostraram que as diferenças significativas observadas ocorreram entre os indivíduos, sugerindo que as diferenças intraindividuais, estatisticamente, não foram tão expressivas como observadas por Cui e colaboradores (1991) na análise dos parâmetros seminais de *Callithrix jacchus*. Em tal estudo a observação de grandes diferenças inter e intraindividuais foi justificada, principalmente, pela técnica utilizada na colheita de sêmen, no caso, a eletroejaculação. Esta técnica demanda diferentes condições de estímulo entre as colheitas que pode resultar em uma grande variação na qualidade da amostra, inclusive com possibilidade de fluxo retrógrado do ejaculado e conseqüente perda de espermatozoides viáveis. Nossos resultados indicam, portanto, maior consistência da técnica de vibroestimulação peniana. Além disso, os resultados indicam que as diferenças interindividuais foram mais relevantes, considerando os dois grupos amostrados. Apesar da maioria dos parâmetros não ter mostrado diferença significativa entre os grupos, o panorama geral sugere uma tendência de que indivíduos mais velhos apresentem *scores* mais baixos em relação aos parâmetros seminais e, talvez, uma amostragem mais abrangente poderia ter evidenciado significativamente tais resultados.

É preciso considerar que na impossibilidade de reintrodução de indivíduos à vida livre, a senescência dos indivíduos se torna uma realidade no manejo *ex situ*. Neste trabalho, as variáveis de peso e a idade apresentaram influência sobre os mesmos parâmetros seminais. Já foi relatada correlação positiva entre o peso de machos e a incidência de espermatozoides com algum tipo de anormalidade morfológica em *Callithrix jacchus* (VALLE, 2014). Apesar da revisão sobre os efeitos da idade no declínio reprodutivo de primatas de Sitzmann, Urbanski e Ottinger (2008), e do trabalho de Marson (1991) sobre as modificações celulares e bioquímicas que impulsionam a transição da puberdade para a fase adulta em chimpanzés, existem poucos trabalhos

endereçados aos primatas, sobretudo neotropicais, para comparação com nossos resultados. Assim, verificamos as referências voltadas para o entendimento do efeito da idade sobre as funções reprodutivas em humanos (SARTORELLI et al., 2001; KIDD et al., 2001). De maneira geral, comparado às fêmeas, a idade exerce uma influência bem mais gradual nos machos, que raramente experienciam completa senescência reprodutiva (OTTINGER, 1998; PLAS et al., 2000). Apesar dos diversos aspectos relacionados ao declínio da fertilidade, alguns trabalhos já apontaram os efeitos da idade sobre os parâmetros seminais tradicionalmente avaliados, tais como volume (HOMONNAI et al., 1982; JOHNSON; PETTY; NAEVES, 1984; FISCH et al., 1996; ANDOLZ et al., 1999; ESKENAZI et al., 2003), concentração espermática (AUGER et al., 1995; HAIDL; JUNG; SCHILL, 1996), motilidade (AUGER et al., 1995; ESKENAZI et al., 2003; SLOTER et al., 2006) e morfologia espermática (AUGER et al., 1995; ANDOLZ et al., 1999). Também foi observado aumento da frequência de alterações numéricas e estruturais dos cromossomos associada à idade (SARTORELLI; MAZZUCCATTO; PINA-NETO, 2001).

As diferenças significativas encontradas entre indivíduos velhos e jovens para os parâmetros de integridade de membrana plasmática, integridade de membrana do acrossoma e atividade mitocondrial sugerem que outros parâmetros seminais, além daqueles tradicionalmente avaliados, também possam ser afetados pelo envelhecimento. Alterações no sistema reprodutivo masculino podem decorrer da diminuição dos níveis circulantes de hormônios esteróides, como testosterona e deidroepiandrosterona (DHEA), que entre outros efeitos, podem acarretar no aumento das anormalidades espermáticas (SITZMANN, URBANSKI, OTTINGER, 2008).

Os resultados das regressões apresentados na Tabela 3 indicam o impacto (B) da influência do peso e da idade sobre o potencial reprodutivo dos indivíduos. Para a integridade de membrana plasmática, por exemplo, verificamos que cada ano de vida representa um decréscimo de 1,67% na qualidade deste parâmetro, de forma que a diferença entre o animal mais jovem (4 anos) e o mais velho (14 anos) amostrado neste trabalho seria de 16,7%. Para a membrana do acrossoma cada ano representa redução de 1,25% na integridade e para a atividade mitocondrial estima-se um aumento de 1,71% na observação da Classe III. O mesmo raciocínio pode ser usado para os parâmetros que tiveram regressões significativas em relação à massa corporal, com estimativa de que o aumento em cada unidade de peso (g) represente um decréscimo de cerca de 0,2% na

integridade da membrana plasmática e do acrossoma, ao passo que a observação das classes III e IV de atividade mitocondrial teriam um acréscimo de 0,229% e 0,275%, respectivamente.

Esses resultados têm reflexo sobre a qualidade dos parâmetros reprodutivos dos animais disponíveis para reprodução em cativeiro, inclusive para a aplicação de biotécnicas reprodutivas. A manutenção de bancos de recursos genéticos pode minimizar problemas associados à senescência e disponibilidade de indivíduos para a reprodução, sobretudo pela possibilidade de inclusão de material genético de animais de vida livre ou provenientes de outras instituições. Os resultados deste trabalho permitem destacar a importância da criopreservação de amostras enquanto os indivíduos são jovens, uma vez que são necessárias amostras representativas de boa qualidade para a criopreservação de gametas (FRANCOISE, 2013).

As técnicas empregadas na preservação de sêmen em bancos de recursos genéticos resultam inevitavelmente na perda de viabilidade de uma grande parcela dos espermatozoides, por conta das crioinjúrias decorrentes do processo de congelamento e descongelamento, que podem causar a ruptura da membrana do acrossoma, danos à membrana plasmática e perda de motilidade (HOLT, 2000). Neste contexto, uma etapa essencial em procedimentos de reprodução assistida no intuito de minimizar os efeitos da criopreservação consiste no emprego de técnicas de seleção espermática com finalidade de isolar as subpopulações de espermatozoides que se mantiveram viáveis após o descongelamento, além de possibilitar a remoção de agentes infecciosos, meios de diluição e crioprotetores das amostras destinadas à reprodução (HENKEL; SCHILL, 2003). Uma dessas técnicas é o gradiente descontínuo de Percoll, que assim como outros protocolos empregados em biotecnologia reprodutiva, requer a padronização para a utilização na seleção de gametas viáveis de *Leontopithecus chrysomelas*.

Hernandez-Lopez e colaboradores (2005) já haviam avaliado o potencial efeito de toxicidade do Percoll para *C. jacchus*, comparando os resultados com os obtidos pelo uso do *Pure Sperm*, outro gradiente de sílica, desenvolvido especialmente para uso em reprodução humana. O fato é que não foram reportados quaisquer efeitos nocivos ou mesmo diferenças significativas entre os produtos, de maneira que a validação do protocolo utilizando o Percoll para *Leontopithecus chrysomelas* teria vantagem na relação de custo-benefício comparado ao *Pure Sperm* (MOUSSET-SIMEÓN et al.,

2004; HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2005). Para a padronização do protocolo de Percoll para mico-leão-de-cara-dourada utilizou-se o meio BWW na diluição dos gradientes, sendo que somente há relatos da utilização do meio TALP-HEPES (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2005; VALLE, 2007). O BWW é um meio comumente usado em andrologia humana e veterinária (CARREIRA et al., 2012) e entre primatas neotropicais foi inicialmente validado para a diluição de sêmen de *Saimiri boliviensis* (ROUDEBUSH; MATHUR, 1998; YEOMAN et al., 1997), mostrando-se também adequado à incubação e à dissolução parcial do coágulo seminal de *Leontopithecus chrysomelas*, de modo que, a padronização de outras técnicas com este mesmo meio de incubação seria ideal para otimizar as etapas de preparo das amostras.

Somente a fração líquida do ejaculado foi utilizada nessa seleção e era esperado que após o procedimento fosse observado maior número de células viáveis. Contudo, a técnica de seleção espermática empregada não foi tão efetiva quanto esperado, especialmente entre os indivíduos "Velhos" para os quais a diminuição na qualidade dos parâmetros seminais foi mais evidente. Ainda que as mudanças não tenham sido significativas, os resultados enfatizam a idade como um fator a ser considerado na aplicação de biotécnicas.

Por outro lado, considerando que os espermatozoides já passaram por uma pré-seleção no procedimento de diluição do coágulo e que o meio BWW foi eficiente na manutenção da viabilidade dos gametas nas avaliações iniciais, outros fatores podem ter contribuído para essa ineficiência, tais como: *Concentrações inadequadas do gradiente* (insuficiente para a efetiva separação das subpopulações espermáticas, devido à similaridade na densidade das células); *Intensidade de centrifugação* (pode ter causado diminuição da viabilidade espermática, como observado para o sêmen de *C. jacchus*, o qual possui extrema sensibilidade à centrifugação (VALLE, 2007)); e *Tempo de centrifugação* (espermatozoides de alta viabilidade atingem o fundo do tubo mais rapidamente que aqueles de baixa motilidade ou imóveis (RHO et al., 2001), dessa forma, ciclos longos de centrifugação poderiam prejudicar a segregação por permitir a sedimentação de gametas de baixa viabilidade). Certamente, não pode ser descartada a hipótese de que o Percoll não seja a técnica de seleção mais indicada para *Leontopithecus chrysomelas*, pois mesmo técnicas amplamente empregadas para espécies domésticas podem não apresentar bons resultados quando aplicadas às espécies silvestres. Para tanto, o aprimoramento das biotécnicas reprodutivas de maneira espécie-

específica é fundamental, a exemplo dos resultados encontrados neste trabalho para o protocolo de seleção em gradiente descontínuo de Percoll. É possível que a ineficiência do protocolo seja apenas uma questão de adequação metodológica, e todas as hipóteses sugeridas no trabalho são passíveis de serem testadas. Este trabalho abre caminho para novos estudos acerca dos fatores que possam influenciar a seleção de gametas viáveis, já que esta é uma etapa essencial da preparação de amostras a serem utilizadas em reprodução assistida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A influência do peso e idade sobre os parâmetros seminais evidenciadas nesse trabalho podem subsidiar decisões sobre o manejo reprodutivo de mico-leão-de-cara-dourada e de outras espécies proximamente relacionadas, seja para a escolha de parceiros na reprodução natural ou para aplicações em técnicas de reprodução assistida. Acreditamos que a criopreservação de sêmen de machos enquanto jovens possa ser uma boa maneira de preservar o potencial reprodutivo dos indivíduos, sobretudo se as amostras de boa qualidade forem combinadas com técnicas adequadas para seleção dos espermatozoides viáveis após o descongelamento.

Agradecimentos: à equipe técnica da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, especialmente à Paula Andréa, pelo auxílio na coleta de amostras; ao Laboratório de Genética de Populações da Universidade Federal de São Carlos e ao Professor Dr. Reinaldo Alves de Brito, pelo suporte laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDOLZ, P.; BIELSA, M. A.; VILA, J. Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22 759 infertile men over a 36 year period. **Human Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 731-735, 1999.

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. Criação e Manejo de Primatas não-Humanos. In: **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Editora FIOCRUZ, p.142-154, 2002.

ARAÚJO, L. L.; LIMA, J. S.; OLIVEIRA, K. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VALLE, R. R.; DOMINGUES, S. F. S. Uso de solução à base de água de coco a 37°C como diluidor de semen de *Cebus apella* (macaco prego) mantido em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 588-594, 2009.

- AUGER, J. et al. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 5, p. 281-285, 1995.
- BARRERA, C.; MAZZOLLI, A.B.; PELLING, C.; STOCKERT, J.C. Metachromatic staining of human sperm nuclei after reduction of disulphide bonds. *Acta Histochem.* v. 94, p. 141-149, 1993.
- BATISTA, A. M. **Influência das técnicas de seleção Swim-up e gradiente de densidade (Percoll® e CapriPure®) na viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. 2009. 54f.** 2009. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BEYDOLA, T.; SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Sperm preparation and selection techniques. In.: RIZK, B; AZIZ, N.; AGARWAL, A. **Male Infertility Practice**. p. 244-251, 2013.
- BIGGERS, J.D., WHITTEN, W.K. and WHITTINGHAM, D.G. The culture of mouse embryos in vitro. In: **Methods in Mammalian Embryology**. (Ed. J.C. Daniel, Jr), Freeman, San Francisco. p. 86-116.1971.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. *Nord Vet Med.*p. 25-383, 1973.
- BUSH, D.F.; RUSSEL L.H.; , FLOWERS Jr, A.I.; SORENSEN Jr, A.M. Semen evaluation in Capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Lab Anim Sci**, v.25, p.588-593, 1975.
- CARREIRA, J. T. et al. Effect of dilution medium on sperm autofluorescence during acoustic focusing flow cytometry analysis. In:**Association for Applied Animal Andrology Conference**. p. 157-162, 2012.
- CHAN, P.J.; ORZYLOWSKA, E.M; CORSELLI, J.U.; JACOBSON, J.D.;WEI, A.K. A simple sperm DNA toroid integrity test and risk of miscarriage. *Biomed. Res. Int.* v.2015, 2015. disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310444/>>, acesso 12/07/2016.
- CUI, K. H.; FLAHERTY, S. P.; NEWBLE, C. D.; GUERIN, M. V.; NAPIER, A. J.; MATTHEWS, C. D. Collection and analysis of semen from the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Andrology**, v. 12, n. 13, p. 214-220, 1991.
- DE VLEESCHOUWER, K; LEUS, K.; VAN ELSACKER, L. Characteristics of Reproductive Biology and Proximate Factors Regulating Seasonal Breeding in Captive Golden-Headed Lion Tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*). *American Journal of Primatology*, v. 60, p. 123–137, 2003.
- DOMINGUES, S.F.S.; LIMA, J.S.; OLIVEIRA, K.G.; SANTOS, R.R. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação in situ de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.124-129, 2011.
- DURRANT, B. S. Semen collection, evaluation, and cryopreservation in exotic animal species: Maximizing reproductive potential. **ILAR Journal**, v. 32, n. 1, p. 2-10, 1990.

ESKENAZI, B. et al. The association of age and semen quality in healthy men. **Human Reproduction**, v. 18, n. 2, p. 447-454, 2003.

FISCH, H. et al. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. **Fertility and sterility**, v. 65, n. 5, p. 1009-1014, 1996.

FLESCH, F.M; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1469, p. 197-235, 2000.

FRANCOISE, J.M. Semen Collection and Seminal Quality in Primates. **J. Primatol.**, v. 3, p.1:2, 2014.

GUÉRIN, J.F; MATHIEU, C.; LORNAGE, G.; PINATEL, M.C; BOULIEU, D. Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa in an IVF programme by selection on discontinuous Percoll gradients. **Hum. Reprod.** v. 4, p.789-804, 1989.

GUIDORIZZI, C.E. **Ecologia e comportamento do mico-leão-da-cara-dourada, *Leontopithecus chrysomelas* (Kuhl, 1820) (PRIMATES- CALLITRICHIDAE) Bahia, Brasil.** Tese. Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós Graduação em Zoologia. Ilhéus, Bahia, 2008.

Haidl, G.; Jung, A.; Schill, W.-B. Ageing and sperm function. **Human reproduction**, v. 11, n. 3, p. 558-560, 1996.

HENKEL, R.R.; SCHILL, W.B. Sperm preparation for ART. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v.1, p. 108, 2003.

HENRIQUE, P. C., CARVALHO, F. M., ARAKAKI, P. R., LOPEZ, R. P. G., VALLE, R. R. Colheita e análise de sêmen de mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) In: XVI Congresso e XXII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2013, Salvador. **Anais do XVI Congresso e XXII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens**. São Paulo: ABRAVAS, p.228 – 229, 2013.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L. et al. Comparison of the effects of Percoll and PureSperm® on the common marmoset (*Callithrix jacchus*) semen. **Journal of medical primatology**, v. 34, n. 2, p. 86-90, 2005.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.3-22, 2000.

HOMONNAI, Z. T. et al. Semen quality and sex hormone pattern of 39 middle aged men. **Andrologia**, v. 14, n. 2, p. 164-170, 1982.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, p. 809-828, 1987.

IUCN. **2007 IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em maio de 2016.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fert.** v. 70, p. 219-228, 1984.

JOHN, J.C .St. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 109-123, 2002.

JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES, W. B. Influence of age on sperm production and testicular weights in men. **Journal of reproduction and fertility**, v. 70, n. 1, p. 211-218, 1984.

KUEDERLING, I.; SCHNEIDERS, A.; SONKEN, J.; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. **American Journal of Primatology**, v. 52, n.3, p. 149-154, 2000.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**.v.33, p. 159-174, 1977.

MARSON, J.; MEURIS, S.; COOPER, R.W.; JOUANNET, P. Puberty in the Male Chimpanzee: Progressive Maturation of Semen Characteristics. **Biology of Reproduction** v. 14, p.448-455, 1991.

McCANN, C. T.; CHANTLER, E. Properties of sperm separated using Percoll and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction. **J. Androl.**, v. 23, p. 205-209, 2000.

MENKVELDT, R.; STANDER, F.S.; KOTZE, T.J.; KRUGER, T.F.; VAN ZYL, J.A. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. **Hum Reprod.** v.5, p.586-592, 1990.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE 2005. **Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção.** Disponível em www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index, acesso em maio de 2016.

MORRELL, J. M.; HODGES, J. K. Germplasm Cryopreservation of Non-Human Primates. In: WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (Ed.). **Cryobanking the genetic resource: Wildlife conservation for the future?** p. 407-426. Nova Iorque, 2001.

MOUSSET-SIMÉON, N.; RIVES, N.; MASSE, L.; CHEVALLIER, F.; MACE, B. Comparison of six density gradient media for selection of cryopreserved donor spermatozoa. **J. Androl**, v. 25, p. 1-4, 2004.

MENDES Jr, J.O.B. et al. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**. v. 60, p. 331-340, 2003.

OLIVEIRA, K. G., CASTRO, P. H. G. D., MUNIZ, J. A. P. C., DOMINGUES, S. F. S. Conservação do sêmen e liquefação do coágulo seminal de macaco-prego (*Cebus apella*) em água de coco em pó (ACP-118®), em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p. 616-621, 2010.

- OTTINGER, M.A. Male reproduction: testosterone, gonadotropins, and aging. In: **Functional Endocrinology of Aging**. Karger Publishers, p. 105-126. 1998.
- PAULA, T.A.R. Reprodução de Carnívoros silvestres. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, vol.35, n.2, p.130-132, Belo Horizonte, 2011.
- PAZ, R. C. R.; ZACARIOTTI, R. L.; TEIXEIRA, R. H. F.; GUIMARÃES, M. A. B. V. O efeito das enzimas hialuronidase e tripsina na liquefação do sêmen de macacos pregos (*Cebus apella*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 196-201, 2006.
- PLAS, E., BERGER, P., HERMANN, M.; PFÜGER, H. Effects of aging on male fertility? *Experimental Gerontology*, v. 35, n.5, p. 543-551. 2000.
- PINTO, L.P.S.; RYLANDS, A.B. Geographic Distribution of the Golden-Headed Lion Tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*, Implications for its Management and Conservation. **Folia Promatol.**, v. 68, p. 11-180. 1997.
- POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.
- PUKAZHENTHI, B. et al. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, fertility and development**, v. 16, p.33-46. 2006.
- RAUBER, Lucio Pereira. **Qualitative and quantitative analysis of porcine sperm transcripts and characterization of a normalized cDNA library**. 2008. Tese de Doutorado. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- REZENDE, G.C. **Mico-leão-preto: A história de sucesso na conservação de uma espécie ameaçada**. Editora Matrix, p:84. 2014.
- RHO, G.J.; HAHNEL, A.C.; BETTERIDGE, K.J. Comparisons of oocyte maturation times of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos *in vitro*. *Theriogenology*, v. 56, p. 503-516, 2001.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean up. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 9, p. 297-308, 1997.
- ROUDEBUSH, W.E.; MATHUR, R.S. Presence of platelet-activating factor in squirrel monkey (*Saimiri boliviensis*) spermatozoa: seasonal differences. **American journal of primatology**, v. 45, n. 3, p. 301-305, 1998.
- SANTOS, I.L.S.; CARVALHO, J. C. ; ARAKAKI, P. R. ; RASSY, F. B. ; NICHI, M. ; VALLE, R. R. . **Validação da coloração com eosina/nigrosina para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*)**. In: XVII Congresso e XXIII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2014, São Paulo. Anais do XVII Congresso e XXIII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. São Paulo: Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens,. v. 1. p. 318-319, 2014.

SARTORELLI, E.M.P; MAZZUCATTO, L.F.; DE PINA-NETO, J.M. Effect of paternal age on human sperm chromosomes. **Fertility and sterility**, v. 76, n. 6, p. 1119-1123, 2001.

SITZMANN, B.D.; URBANSKI, H. F.; OTTINGER, M.A. Aging in male primates: reproductive decline, effects of calorie restriction and future research potential. **Age**, v. 30, n. 2-3, p. 157-168, 2008.

SCHNEIDERS, A.; SONKSEN, J.; HODGES, J.K. Penile vibratory stimulation in the marmoset monkey: a practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality. **Journal of Medical Primatology**, v. 33, p. 98-104, 2004.

SOUZA-ARAÚJO, N.L. Reprodução de Primatas Neotropicais: Avanços e Perspectivas. **Ciência Animal**, v.22, p.296-307. 2012

SLOTTER, E.; SCHMID, T.E.; MARCHETTI, F.; et al. Quantitative effects of male age on sperm motion. **Hum Reprod.**v.21, p.2868-2875.2006.

VALLE, R. R. **Características físicas e morfológicas do sêmen de *Allouata cayara* (Humboldt, 1812) mantidos em cativeiro.** 2002, 66f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

VALLE, R. R. **Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, *Sagui-de-tufo-branco* (*Callithrix jacchus*).** 2007. 169 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

VALLE, R. R; VALLE, C. M. R; NICHI, M; MUNIZ, J. A. P. C; NAYUDU, P. L; GUIMARÃES, M. A. B. V. Validations of non-fluorescent methods to reliably detect acrosomal and plasma membrane integrity of common marmoset (*Callithrix jacchus*).In **Theriogenology**, n.70, p. 115-120, 2008.

VALLE, R. R. et al. Semen characteristics of captive common marmoset (*Callithrix jacchus*): a comparison of a German with a Brazilian colony. **Journal of medical primatology**, v. 43, n. 4, p. 225-230, 2014.

VIDAL, F.D.; LUZ, M.S.; PINHO, T.G.; PISSINATTI, A. Coleta de sêmen em mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (Kuhl, 1820) através da eletroejaculação Callitrichidae - primates. **R. bras. Ci. Vet.**, v.14, n. 2, p. 67-71, 2007.

VON ENDE, C.N. Repeated-measures analysis. **Design and analysis of ecological experiments.**Oxford University Press, Oxford, p. 134-157, 2001.

WATANABE, I.M. **Gameta masculino de mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*): parâmetros reprodutivos seminais e epigenéticos.** 2015, 86f, Dissertação (Mestrado Profissional em Conservação da Fauna) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Examination and processing of human semen. 5 ed. Geneva.: World Health Organization, 2010.

YANAGIMACHI, R. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. The Physiology of Reproduction.p.189-317, 1994.

YEOMAN, R. R.; RICKER, R.B.; WILLIAMS, L.E.; SONKSEN, J.; ABEE, C.R. Vibratory stimulation of ejaculatory yields increased motile spermatozoa, compared with electroejaculation, in squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Contemp. Top. Lab. Anim. Sci**, v. 36, p. 62-64, 1997.

ZÚCCARI, C.E.S.N. et al. Seleção em gradiente de Percoll® sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 2, 2008.

MATERIAL SUPLEMENTAR DO MANUSCRITO "INFLUÊNCIA DO PESO E IDADE SOBRE OS PARÂMETROS SEMINAIS E SELEÇÃO ESPERMÁTICA DE MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA (*LEONTOPITHECUS CHRYSOMELAS*) MANTIDOS EM CATIVEIRO.

Tabela 5. Suplementar 1. Avaliação dos Parâmetros Seminais: Motilidade e Concentração Espermática.

Grupo	Animal	Motilidade Total (%)				Motilidade Progressiva (%)				Concentração (spz/mL)			
		C1	C2	C3	Média±EP	C1	C2	C3	Média±EP	C1	C2	C3	Média±EP
Velhos	25.852	80			80 ± 0	60			60 ± 0	64,3x10 ⁶			64,3 x10 ⁶ ± 0
	27.247	54	10	10	24,67 ± 14,67	5	1	10	5,33 ± 2,6	12,2 x10 ⁶	43,6 x10 ⁶	104,3 x10 ⁶	53,4 x10 ⁶ ± 27 x10 ⁶
	27.690	80	60	80	73,33 ± 6,67	80	70	15	55 ± 20,21	72,2 x10 ⁶	74,1 x10 ⁶	23,4 x10 ⁶	56,6 x10 ⁶ ± 17 x10 ⁶
	29.430	90	80	80	83,33 ± 3,33	75	80	30	61,67 ± 15,89		20,9 x10 ⁶	62,2 x10 ⁶	135 x10 ⁶ ± 73 x10 ⁶
	29.431		40		40 ± 0		60		60 ± 0		56,8 x10 ⁶		56,8 x10 ⁶ ± 0
	29.658	60	80	95	78,33 ± 10,14	40	70	80	63,33 ± 12,02	128 x10 ⁶		92,7 x10 ⁶	111 x10 ⁶ ± 18 x10 ⁶
Média Grupo		73,21 ± 5,94^a				48,29 ± 8,13^a				78,5 x10⁶ ± 15,0 x10^{6a}			
Jovens	30.156	80	40	5	41,67 ± 21,67	80	30	30	46,67 ± 16,67	27,9 x10 ⁶	56,1 x10 ⁶	50,5 x10 ⁶	44,8 x10 ⁶ ± 8,6 x10 ⁶
	30.163	95	80		87,5 ± 7,5	90	5		47,5 ± 42,5	244 x10 ⁶	185 x10 ⁶		197 x10 ⁶ ± 29 x10 ⁶
	30.164	80	90	80	83,33 ± 3,33	40	70	20	43,33 ± 14,53	88,0 x10 ⁶	119 x10 ⁶	174 x10 ⁶	139 x10 ⁶ ± 25 x10 ⁶
	30.169	75	90	90	85 ± 5	40	20	3	21 ± 10,69	54,4 x10 ⁶	128 x10 ⁶	60,6 x10 ⁶	81,0 x10 ⁶ ± 24 x10 ⁶
	30.191	80	65	95	80 ± 8,66	80	50	80	70 ± 10		108 x10 ⁶	71,9 x10 ⁶	90,2 x10 ⁶ ± 18 x10 ⁶
	30.230¹			70	70 ± 0			70	70 ± 0			45,7 x10 ⁶	45,7 x10 ⁶ ± 0
Média Grupo		76,00 ± 4,86^a				47,20 ± 7,56^a				97,2 x10⁶ ± 15,7 x10^{6a}			
ICC		0,7577				0,6594				0,6217			
ANOVA (p)		0,4878				0,1855				0,3054			

C1, C2 e C3 são referentes aos dados das três colheitas de sêmen realizadas com a respectiva Média ± Erro Padrão para cada indivíduo; os valores em branco indicam ausência da colheita específica; ¹Ausência de espermatozoides na fração líquida após incubação nas duas primeiras colheitas; ^aLetras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa (p>0,05) entre "Velhos" e "Jovens" no teste t *Student*; ICC acima de 0,6 indica consistência entre as réplicas; em análise de medidas repetidas ANOVA p>0,05 indica repetibilidade entre as réplicas;

Tabela 6. Suplementar 2. Avaliação dos Parâmetros Seminais: Integridade de Membrana Plasmática e Acrossômica

Grupo	Animal	Integridade Membrana Plasmática (%)				Integridade Membrana Acrossoma (%)			
		C1	C2	C3	Média±EP	C1	C2	C3	Média±EP
Velhos	25.852	96			96 ± 0	72,5			72,5 ± 0
	27.247	68,38	72	75	71,79 ± 1,91	60	74,3	80,8	71,67 ± 6,13
	27.690	77	86	97	86,67 ± 5, 78	88	86	91	88,33 ± 1,45
	29.430	85	95	93	91 ± 3,05	79	84	88	83,67 ± 2,6
	29.431		87		87 ± 0		86		86 ± 0
	29.658	90	91	90	90,33 ± 0,33	94	88	92	91,33 ± 1,76
Média Grupo		86,04 ± 2,40^a				83,86 ± 1,90^a			
Jovens	30.156	90	93	94	92,33 ± 1,20	89	91	90	90 ± 0,58
	30.163	89	91		90 ± 1	95	93		94 ± 1
	30.164	84	95	95	91,33 ± 3,67	88	94	97	93 ± 2, 64
	30.169	98	99	99	98,67 ± 0,33	92	93	100	95 ± 2,52
	30.191	85	92	95	90,67 ± 2,96	85	90	90	88,33 ± 1,67
	30.230 ¹			79	79 ± 0			90	90 ± 0
Média Grupo		91,87 ± 1,48^b				91,80 ± 0,96^b			
ICC		0,9314				0,9041			
ANOVA (p)		0,0065				0,0319			

C1, C2 e C3 são referentes aos dados das três colheitas de sêmen realizadas com a respectiva Média ± Erro Padrão para cada indivíduo; os valores em branco indicam ausência da colheita específica ¹Ausência de espermatozoides na fração líquida após incubação nas duas primeiras colheitas; ^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p>0,05) entre "Velhos" e "Jovens" no teste t *Student*; ICC acima de 0,6 indica consistência entre as réplicas; em análise de medidas repetidas ANOVA p>0,05 indica repetibilidade entre as réplicas;

Tabela 7. Suplementar 3. Avaliação dos Parâmetros Seminais: Atividade Citoquímica Mitocondrial.

Grupo	Animal	Atividade Mitocondrial Classe I (%)				Atividade Mitocondrial Classe II (%)				Atividade Mitocondrial Classe III (%)				Atividade Mitocondrial Classe IV (%)			
		C1	C2	C3	Média±EP	C1	C2	C3	Média±EP	C1	C2	C3	Média±EP	C1	C2	C3	Média±EP
Velhos	25.852	36			36 ± 0	31,5			31,5 ± 0	13,5			13,5 ± 0	16,5			16,5 ± 0
	27.247	9,5	29	22	20,17 ± 5,7	13	24,5	32,5	23,33 ± 5,66	37	17,5	46	33,5 ± 8,41	41,5	29	19,5	30 ± 6,37
	27.690		48,5	47	47,75 ± 0,75		26	31,5	28,75 ± 2,75		20	17	18,5 ± 1,5		5,5	4,5	5 ± 0,5
	29.430	62		65	63,5 ± 1,5	32		18,5	25,25 ± 6,75	2		12,5	7,25 ± 5,25	4		4	4 ± 0
	29.431		51		51 ± 0		22		22 ± 0		12,5		12,5 ± 0		14,5		14,5 ± 0
	29.658	57,5	67	50,5	58,33 ± 4,78	24	25,5	36	28,5 ± 3,78	16	3,5	13,5	11 ± 3,82	2,5	4	5	3,83 ± 0, 73
Média Grupo		45,42 ± 5,18^a				26,42 ± 1,92^a				17,58 ± 3,61^a				12,54 ± 3,56^a			
Jovens	30.156	52,5	52,5	47	50,67 ± 1,83	25	25	43,5	31,17 ± 6,17	18,5	18,5	8,5	15,17 ± 3,33	4	4	0,5	2,83 ± 1,17
	30.163	57,5	66,5		62 ± 4,5	30,5	24		27,25 ± 3,25	10,5	4,5		7,5 ± 3	1,5	5		3,25 ± 1,75
	30.164	54,5	64	35,5	51,33 ± 8,38	24,5	21	45	30,17 ± 7,49	14,5	5,5	17,5	12,5 ± 3,6	6,5	9,5	2	6 ± 2,18
	30.169	55	66	42	54,33 ± 6,94	27	23,5	48,5	33 ± 7,82	15	5,5	8	9,5 ± 2,84	3	5	1,5	3,17 ± 1,01
	30.191	70,5		54	62,25 ± 8,25	24		25	24,5 ± 0,5	3,5		18	10,75 ± 7,25	2		3	2,5 ± 0,5
	30.230 ¹			41,5	41,5 ± 0			45	45 ± 0			7	7 ± 0			6,5	6,50
Média Grupo		54,21 ± 2,76^a				30,82 ± 2,65^a				11,07 ± 1,52^a				3,857 ± 0,66^b			
ICC		0,9308				0,5421				0,8237				0,9405			
ANOVA (p)		0,0306				0,0020				0,1597				0,2350			

C1, C2 e C3 são referentes aos das três colheitas de sêmen realizadas com a respectiva Média ± Erro Padrão para cada indivíduo; Os valores em branco indicam ausência da colheita específica; ¹Ausência de espermatozoides na fração líquida após incubação nas duas primeiras colheitas;^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p>0,05) entre "Velhos" e "Jovens" no teste t *Student*; ICC acima de 0,6 indica consistência entre as réplicas; em análise de medidas repetidas ANOVA p>0,05 indica repetibilidade entre as réplicas;

Tabela 8. Suplementar 4. Avaliação dos Parâmetros seminais: Morfologia do grupo "Velhos".

Defeitos Maiores	Velhos									
	Morfologia (Pré Percoll)					Morfologia (Pós Percoll)				
	27247	27690	29430	29341	2958	27247	27690	29430	29341	29658
Pequena anormal	0,00	1,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,50	0,00	0,50
Contorno anormal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	1,00	0,00
Cauda enrolada na cabeça	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
Fortemente dobrada ou enrolada	23,00	19,50	16,00	10,00	9,50	22,50	8,50	11,50	11,00	9,00
Dobrada com gota	1,00	2,00	0,00	0,00	2,50	1,00	2,50	1,00	0,00	1,50
Defeito na PI	0,00	3,00	2,00	3,00	3,50	2,50	11,00	10,50	1,00	11,50
Gota proximal	0,50	1,50	2,00	0,00	2,00	0,50	2,00	1,00	1,00	0,50
Formas duplas	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00
Defeitos menores										
Cabeça gigante	0,50	0,00	0,00	0,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50
Cabeça curta	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	1,00
Cabeça pequena normal	0,00	1,00	5,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	3,50
Cabeça isolada normal	51,50	8,00	0,00	6,00	10,00	33,00	2,50	1,50	4,00	1,00
Cauda dobrada	9,50	33,00	42,00	48,00	36,00	14,50	36,50	41,50	56,00	34,50
Cauda enrolada	0,50	6,00	3,00	2,00	5,00	5,00	1,50	2,50	3,00	4,50
Cauda curta	0,00	7,50	0,00	1,00	5,00	0,00	3,00	0,50	0,00	2,00
Retroimplantação	0,00	0,50	0,00	1,00	0,50	0,00	0,50	0,00	0,00	0,50
Implantação oblíqua	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	1,00	2,00	0,50	0,00	0,00
Gota distal	0,50	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	2,00	1,00	0,00
Cabeça isolada + PI	6,50	2,00	5,00	0,00	4,00	4,00	1,00	0,00	1,00	0,50
NORMAIS	6,50	13,00	25,00	29,00	18,50	14,50	23,50	23,50	21,00	29,00

Valores expressos em porcentagem.

Tabela 9. Suplementar 5. Avaliação dos Parâmetros seminais: Morfologia do grupo "Jovens".

Defeitos Maiores	Jovens											
	Morfologia (Pré Percoll)						Morfologia (Pós Percoll)					
	30156	30163	30164	30169	30191	30230	30156	30163	30164	30169	30191	30230
Pequena anormal	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Contorno anormal	0,50	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	1,00	0,50	0,50	0,00	0,00
Cauda enrolada na cabeça	1,50	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,50	0,00	1,00	0,50	2,00	3,00
Fortemente dobrada ou enrolada	21,00	23,00	17,00	10,50	12,50	11,00	22,50	18,00	10,00	11,00	10,00	14,00
Dobrada com gota	1,00	0,00	1,00	6,50	0,00	1,00	1,00	0,00	0,50	4,00	2,00	1,00
Defeito na PI	2,00	4,00	5,00	0,00	3,50	1,00	6,00	2,00	11,50	2,50	5,00	3,00
Gota proximal	0,50	0,00	0,00	5,00	1,00	2,00	1,00	1,00	0,50	5,00	0,00	2,00
Formas duplas	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,50	0,00	0,00	1,00
Defeitos menores												
Cabeça gigante	1,00	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	1,00	0,00
Cabeça curta	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cabeça pequena normal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Cabeça isolada normal	14,00	1,00	6,00	4,00	6,00	3,00	5,50	3,00	2,00	0,50	3,00	4,00
Cauda dobrada	28,00	41,00	26,00	36,50	43,00	58,00	33,50	41,00	39,00	42,50	52,00	49,00
Cauda enrolada	3,50	3,00	4,00	12,00	8,00	11,00	3,00	4,00	5,00	10,00	2,00	1,00
Cauda curta	5,00	0,00	10,00	3,50	3,50	3,00	1,00	1,00	1,50	2,00	2,00	2,00
Retroimplantação	0,00	0,00	1,00	0,50	0,50	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
Implantação oblíqua	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,00
Gota distal	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00	1,50	0,00	2,00	1,00	1,00	1,00
Cabeça isolada + PI	2,50	1,00	10,00	5,50	7,00	2,00	0,50	1,00	3,50	2,00	0,00	2,00
NORMAIS	20,00	26,00	17,00	13,00	13,50	8,00	22,50	27,00	20,50	18,00	20,00	15,00

Valores expressos em porcentagem.

CAPÍTULO 2

EXTRAÇÃO DE RNA ESPERMÁTICO DO COÁGULO SEMINAL DE MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA (*LEONTOPITHECUS CHRYSOMELAS*)

Patrícia Hergert Bacher¹, Rodrigo del Rio do Valle² e Andréa Cristina Peripato¹

¹ Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, ²Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista, São Paulo, SP, Brazil, ³Instituto Biopesca, Praia Grande, SP Brasil.

RESUMO

A validação de técnicas de reprodução assistida para espécies ameaçadas de extinção representa uma abordagem importante para os esforços conservacionistas. Um grande desafio à criopreservação de gametas de primatas neotropicais, como o mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*), tem sido a coagulação imediata do sêmen após a colheita. Nele fica retida uma parcela considerável de espermatozoides, que não podem ser destinados à criopreservação e à reprodução assistida. Para otimizar a utilização das amostras de sêmen o presente trabalho estabeleceu um protocolo de extração de RNA espermático total de mico-leão-de-cara-dourada. A perspectiva de que os gametas masculinos possam contribuir com fatores epigenéticos, como os RNAs espermáticos, tem despertado grande interesse de pesquisa ao longo das últimas décadas. O isolamento dos transcritos presentes no gameta é parte essencial para a identificação e entendimento de como os RNAs podem regular a expressão gênica e influenciar o sucesso reprodutivo. Para tanto, o isolamento dos espermatozoides dos demais componentes do ejaculado foi realizado mediante seleção em gradiente descontínuo de Percoll 40-80%. As amostras de cada animal foram concentradas em dois *pool*, o primeiro correspondente à fração líquida do ejaculado e o segundo referente à porção coagulada do sêmen. A extração de RNA espermático dessas amostras foi feita com TRIzol e a quantificação em fluorômetro Qubit. A avaliação dos perfis de RNA total foi feita em Bioanalyzer, sugerindo que a população espermática é composta majoritariamente por moléculas pequenas de RNA.

PALAVRAS-CHAVE: espermatozoides, fração líquida, coágulo seminal, TRIzol

INTRODUÇÃO

Diversas espécies de primatas neotropicais são afetadas pelo processo de perda e fragmentação de habitat, de modo que a conservação *ex situ* e o incentivo ao desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas como a criopreservação de sêmen, inseminação artificial, e produção e transferência de embriões configuram estratégias importantes para a manutenção da viabilidade de espécies sob ameaça em ambientes naturais (PUKAZHENTHI et al., 2006). O mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) é uma dessas espécies ameaçadas, que felizmente, se reproduz bem em cativeiro e tem mostrado resultados promissores na validação de biotécnicas (HENRIQUE et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Porém, o entendimento de aspectos associados ao sucesso reprodutivo desses animais é tão escasso quanto fundamental ao desenvolvimento de técnicas em reprodução assistida.

De maneira geral, grande parte dos esforços de pesquisa na área de reprodução são voltados ao esclarecimento da contribuição materna, pelo seu investimento tanto pré-zigótico quanto pós-zigótico. É preconizado que os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário são controlados pelas informações maternas, uma vez que o ooplasma forma o citoplasma do embrião após a fecundação e fornece componentes indispensáveis ao seu desenvolvimento (SIRARD et al., 2006; MARTEIL, RICHARD-PARPAILLON, KUBIAK, 2009). Porém, a contribuição paterna apresenta grande relevância para o sucesso reprodutivo, pois o gameta masculino não é somente um veículo de entrega do genoma haplóide, como se pensava. Ele também é responsável pela ativação do oócito e, recentemente, a entrega de componentes moleculares vem sendo apontada como um dos fatores epigenéticos capazes de modular a expressão gênica durante a fecundação, desencadeando o desenvolvimento inicial do embrião (OSTERMEIER, et al., 2004). Vale ressaltar que os fatores epigenéticos são aqueles que podem regular a expressão gênica mediante modificações químicas no DNA ou cromatina, ou ainda pode ser mediados por RNA (GIBBS, 2007; BOERKE *et al.*, 2007; SHARMA, KELLY, JONES, 2010). Apesar da pouca quantidade, comparado ao oócito, existe uma complexa variedade de RNAs no gameta masculino que atua sobre diferentes mecanismos, podendo influenciar o sucesso reprodutivo (RAUBER, 2013). Neste contexto, a função dos RNAs espermáticos vem sendo intensamente investigada. Até pouco tempo essas moléculas eram interpretadas como resquícios do processo de diferenciação celular. Contudo, a identificação de alguns transcritos de origem paterna

no gameta feminino fertilizado tem sugerido que os RNAs possam ter papel determinante na ativação do gameta feminino, no controle genético embrionário e no estabelecimento de *imprints* genômicos (expressão monoalélica de genes bialélicos) no início do desenvolvimento (OSTERMEIR et al., 2004), incluindo os pequenos RNAs não codificantes, como microRNAs. Essas moléculas podem regular a expressão gênica e atuar como uma mudança epigenética permanente e hereditária no embrião (RAUBER, 2013). A identificação de transcritos espermáticos também tem sido considerada uma ferramenta valiosa para o diagnóstico não invasivo da fertilidade masculina (PESSOT et al., 1989; BOERKE et al., 2007). Essas evidências sugerem que padrões epigenéticos nesses gametas e consequentemente nos embriões podem ser extremamente sensíveis às manipulações associada às biotécnicas de reprodução (LUCIFERO, CHAILLET, TRASLER, 2004) tornando seu entendimento fundamental para o sucesso na reprodução assistida.

No presente trabalho foram utilizados machos de mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) como modelo para o estabelecimento de um protocolo de extração de RNA espermático. O estabelecimento de protocolos para extração de RNA de gametas masculinos para diversas espécies tem sido desafiador, especialmente por conta da instabilidade e baixa concentração de transcritos (KRAWETZ, 2005), e pela ausência de RNA ribossômicos intactos nos espermatozoides (GOODRICH, ANTON, KRAWETZ, 2013). Assim, a contaminação com células somáticas, que contém rRNA, pode resultar em perfis enviesados do RNA espermático. Além disso, os métodos que utilizam índices baseados na integridade dos rRNAs para avaliar a qualidade das amostras podem não ser aplicados aos RNA espermáticos, mas possibilitam aferir sobre possível contaminação com outros tipos celulares (CASAS, VAVOURI, 2014). Portanto, os protocolos devem considerar a presença de diferentes tipos celulares no sêmen e a importância do isolamento da população espermática, afim de evitar a extração de RNA exógeno. Além disso, a validação de protocolos de extração depende das características intrínsecas da amostra. A diferenciação celular confere aos espermatozoides máxima especialização ergonômica e estrutural para a entrega do genoma haplóide (BALHORN et al., 1999), isso implica em modificações na membrana plasmática, que se torna mais rígida (FLESCHE; GADELLA, 2000; CHAN et al., 2015), característica importante para assegurar a viabilidade celular frente as adversidades do trato genital feminino, mas que demanda adequações nos protocolos de extração.

Em *Leontopithecus chrysomelas* temos outra particularidade, associada aos primatas neotropicais, que torna o estabelecimento de protocolo de extração de RNA espermático ainda mais desafiador e consiste na coagulação do sêmen imediatamente após a ejaculação. Essa característica tem representado um dos maiores desafios à criopreservação e utilização de amostras em biotecnologias da reprodução, pois mesmo com a utilização de diluidores, dificilmente o coágulo seminal é totalmente liquefeito, afetando a disponibilidade de gametas com potencial fecundante (VALLE et al., 2004). Por esse motivo, o coágulo remanescente da diluição do sêmen muitas vezes é descartado (VIDAL et al., 2007). Como o procedimento de colheita de sêmen nos micos envolve cuidados especiais para minimizar o estresse dos animais, visamos o melhor aproveitamento da amostra. Dessa forma, estabelecemos aqui um protocolo de extração de RNA da fração de espermatozoides liquefeita após a diluição do coágulo e testamos esse protocolo, com adequações, para o coágulo seminal remanescente, afim de eliminar as células somáticas constantes na amostra. Os resultados aqui encontrados poderão tornar a colheita de sêmen dos micos mais efetivas, pois a fração líquida poderá ser utilizada nas técnicas reprodutivas, enquanto que a fração de espermatozoides contida no coágulo poderá ser utilizada, por exemplo, como abordagem não invasiva para avaliação da fertilidade de mico-leão-da-cara-dourada e de outros primatas neotropicais proximamente relacionados.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

As amostras de sêmen de mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) foram obtidas a partir de colheita por vibroestimulação peniana realizada no setor de Veterinária da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Foram realizadas 3 campanhas de colheita de sêmen, das quais foram obtidas 29 amostras de 12 indivíduos sexualmente maduros de mico-leão-da-cara-dourada. Para detalhes verificar Bacher, Arakaki, Sauce, Valle, Peripato, *Influência da idade e peso sobre parâmetros seminais de mico-leão-de-cara-dourada (Leontopithecus chrysomelas) mantidos em cativeiro*, 2016 (em preparação).

Os procedimentos de amostragem foram realizados mediante aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos N° 045/2014 e autorização do SISBio para atividades com finalidade científica (n°46715-1) provido pelo Instituto

Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/ Ministério do Meio Ambiente (ICMBio/MMA).

Preparação das amostras

O ejaculado obtido dos animais foi incubado em meio BWW (*World Health Organization*, 2010) durante 30 minutos a 37°C para a dissolução parcial do coágulo seminal. Em seguida, a fração líquida foi separada do coágulo e conduzida para centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll[®] (*GE Healthcare Bioscience* - Uppsala, Suécia) isotônico (40/80%), para separação de espermatozoides viáveis de outros componentes celulares presentes no ejaculado, como células somáticas e bacterianas. Após a centrifugação o *pellet* contendo os espermatozoides selecionados foi ressuspenso na razão 1:2 em meio BWW (para detalhes verificar Bacher, Arakaki, Sauce, Valle e Peripato, em preparação, 2016). A fração líquida e o coágulo de cada amostra foram mantidos separadamente em *RNA holder* (*BioAgency*, São Paulo, Brasil) armazenados em freezer a -80°C até o momento da extração.

Extração de RNA

Para a extração do RNA espermático de mico-leão-da-cara-dourada foi necessário concentrar as amostras. Dessa forma, para cada animal, as amostras das três colheitas de sêmen foram concentradas em dois diferentes *pools*: (1) *Pool* da fração líquida: referente ao *pellet* resultante da seleção em gradiente descontínuo de Percoll[®] e; (2) *Pool* do coágulo seminal: porção do ejaculado que não foi liquefeita após a incubação em meio BWW.

No *pool* do coágulo seminal foi necessário a lise de células somáticas para a extração de RNA somente de espermatozoides contidos no coágulo. Para essa lise adequamos o protocolo de Rauber (2008). Na extração do RNA espermático foi utilizado o protocolo de fenol/clorofórmio (CHOMCZYNSKI, SACCHI, 1987). No protocolo final tivemos:

Ambas amostras de fração líquida e de coágulo foram descongeladas e centrifugadas a 10000xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em solução hipotônica com 0,5% de Triton-X. Para a lise de células somáticas presentes no coágulo ou remanescentes da seleção com Percoll o *pellet* foi inicialmente ressuspenso em 300µL de solução hipotônica. Com auxílio de um pistilo

foi realizada a maceração das amostras por cerca de um minuto e, em seguida, completou-se o volume com mais 700µL da solução. Para os coágulos seminais foi necessária a utilização de bisturi para cortá-los em pedaços, afim de aumentar a superfície de contato antes da maceração.

Posteriormente, os microtubos foram agitados rapidamente em vórtex e as amostras incubadas por 10 minutos, em gelo. Procedeu-se a centrifugação dos tubos a 5000xG por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com PBS 1x preparado a partir da solução estoque (250mM Na₂HPO₄; 1,25mM NaCl; 250mM KH₂PO₄; 1,25mM KCl). Os microtubos foram submetidos às mesmas condições de centrifugação anterior.

O *pellet* resultante foi ressuspendido em 1mL de solução contendo TRIzol® (*Invitrogen*) e β-mercaptoetanol (7µL para cada mililitro de TRIzol®) e o conteúdo passado 3 vezes pela agulha 30G, agitados em vórtex por 30 segundos e incubado em gelo durante 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000xG por 10 minutos a 4°C. O conteúdo foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 300µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas em gelo por 5 minutos, posteriormente foram centrifugadas a 12000xG por 15 minutos a 4°C.

A fase orgânica foi transferida para um novo microtubo ao qual foi adicionado 1 volume de isopropanol puro, 1 µL de glicogênio azure e 0,1 volume de 7,5 M de acetato de amônio para a precipitação do RNA espermático. Os microtubos foram incubados durante 30 minutos em gelo e centrifugados a 14000xG por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido com a pipeta e o *pellet* lavado com 500µl de etanol 80%. Os *pellets* foram secos a 60°C em termobloco e ressuspendidos em 20µl de água com Diethylpyrocarbonate - DEPC (*Invitrogen*). Após a utilização o RNA foi mantido em ultrafreezer -80°C.

Quantificação e análise

Cinco microlitros de cada amostra correspondente à fração líquida e ao coágulo foram destinados à quantificação em fluorômetro, utilizando o kit Qubit® *RNA HS Assay* (Life Technologies, EUA) para quantificação de moléculas grandes de RNA; um microlitro das mesmas amostras foi usado no kit Qubit® *microRNA Assay* para detecção de pequenos RNAs.

Os perfis do RNA extraído da fração líquida e do coágulo seminal de mico-leão-da-cara-dourada foram avaliados com o *Bioanalyzer* (Agilent Technologies, EUA), uma plataforma de eletroforese para análise qualitativa e quantitativa de RNA, utilizando o kit *RNA 6000 Pico* (Agilent Technologies, EUA), para a visualização em amostras com concentrações de RNA muito baixas.

RESULTADOS

A obtenção de amostras de sêmen para a formação dos *pools* espermáticos estiveram condicionadas ao sucesso da colheita de sêmen de mico-leão-de-cara-dourada. Conforme apresentado na Tabela 1 pode-se verificar que para três indivíduos amostrados foi possível apenas uma colheita. O volume do *pool* também é mostrado e podemos observar que na fração de sêmen coagulada o volume médio foi de 298,34 μ L (entre 63-525 μ L), não sendo possível estimar a concentração referente a estas amostras, enquanto que para a fração líquida do sêmen o volume médio utilizado na extração de RNA foi de 224,58 μ L (entre 60-310 μ L) com uma concentração média de 52,10x10⁶ espermatozoides.

A quantificação das amostras de RNA espermático extraído realizada no fluorômetro *Qubit* é apresentada na Tabela 1 indicando que as concentrações, tanto do coágulo quanto da fração líquida do sêmen foram bastante variáveis nos dois *kits* utilizados. A quantidade média de RNA detectada no coágulo seminal foi de 70,53 ng variando 0 a 145,6 ng com o *kit HS RNA*, e observou-se média de 123,2 ng de RNA com variação de 0 a 290 ng nas mesmas amostras do coágulo seminal quantificadas com o *kit microRNA Assay* específico de detecção de pequenas moléculas. Para a extração realizada a partir de amostras da fração líquida foi detectada, em média, 40,6 ng, variando entre 0 e 80,8 ng pelo uso do *Kit HS RNA*, já as quantificações conduzidas em *kit microRNA Assay* a média referente à extração da fração líquida foi de 193,7 ng com variação de 0 à 502 ng.

A análise qualitativa das amostras avaliadas em *Bioanalyzer* mostrou perfil similar em todas as amostras. Na Figura 1 observamos o perfil obtido do mesmo indivíduo, em que não apresenta diferença entre os perfis obtidos pela extração de RNA do coágulo seminal (Figura1 A) e da fração líquida do sêmen (Figura1 B), com pico de fluorescência emitida com cerca de 25 segundos de corrida, região correspondente aos microRNAs. Em ambos os perfis é possível notar a ausência dos picos referentes às subunidades 18S e 28S de RNAs ribossômicos.

Tabela 10. Dados da colheita e da quantificação das amostras de sêmen de mico-leão-de-cara-dourada.

amostra	Pool (n° de amostras)		Volume (µL)		Concentração (esperm. x 10 ⁶)		Quantificação Qubit HS RNA (ng)		Quantificação Qubit microRNA (ng)	
	Coágulo	Fração	Coágulo	Fração	Coágulo	Fração	Coágulo	Fração	Coágulo	Fração
	seminal	líquida	Seminal	líquida	seminal*	líquida	seminal	líquida	seminal	líquida
1	1	1	89,5	60	-	3,69	0	0	0	0
2	3	3	736,8	270	-	45,2	145,6	0	147,2	142,6
3	3	3	378,9	270	-	65,37	64	0	290	196,4
4	3	3	302,7	310	-	50,13	71,2	70,4	246	294
5	1	1	104	40	-	11,23	99,2	0	69,4	0
6	3	3	257,6	265	-	63,05	77,6	77,6	126	502
7	3	3	225,6	180	-	39,2	135,2	0	199,6	73,6
8	2	2	196,9	150	-	40,95	0	61,6	0	388
9	3	3	525	260	-	79,74	0	80,8	94,4	438
10	3	3	402	300	-	116,19	111,2	52	168,2	0
11	3	3	298	440	-	109,08	0	79,2	60,8	290
12	1	1	63,1	150	-	1,44	142,4	65,6	77	0

* Não foi possível estimar a concentração espermática do coágulo seminal.

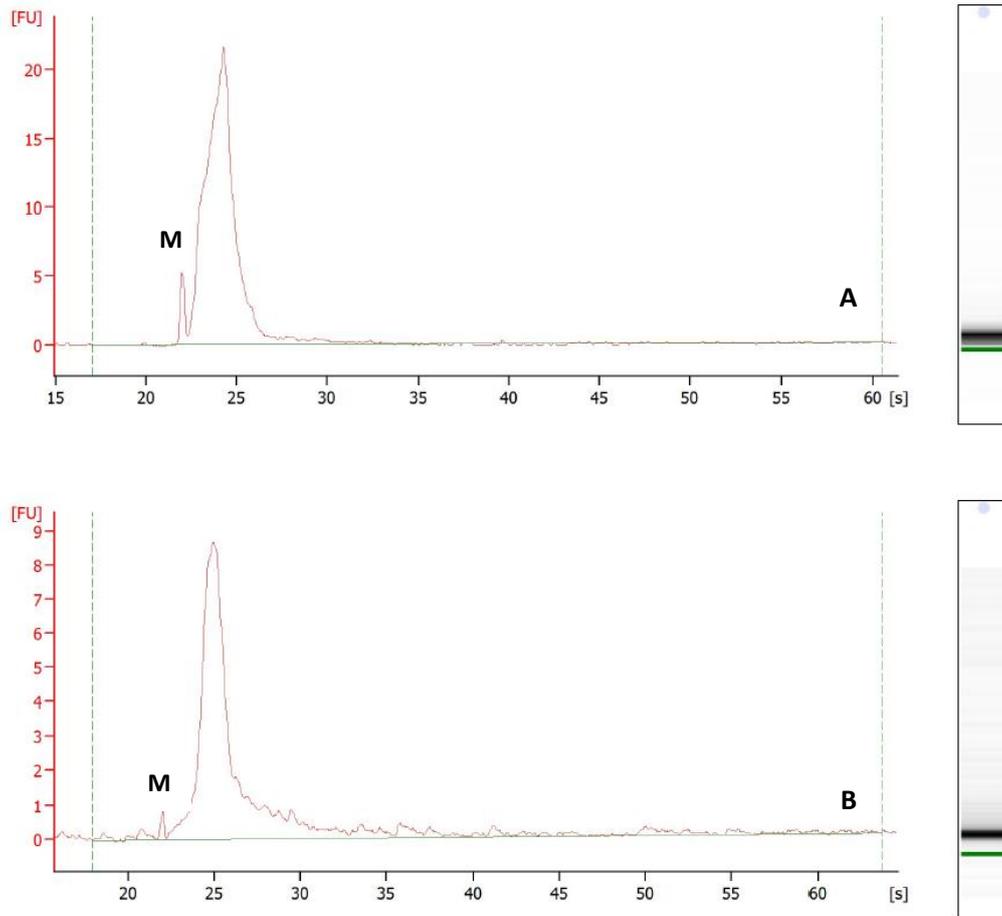


Figura 7. Perfil de RNA espermático em *Bioanalyzer*. FU - Unidades de Fluorescência; s- segundos; M - marcador 25pb.; A- RNA extraído do coágulo seminal; B- RNA extraído da fração líquida.

DISCUSSÃO

A colheita de sêmen por vibroestimulação foi efetiva, apesar de nem todos os animais terem sido amostrados em triplicata devido a particularidades individuais (para detalhes ver Bacher, Arakaki, Sauce, Valle, Peripato, *Influência da idade e peso sobre parâmetros seminais de mico-leão-de-cara-dourada (Leontopithecus chrysomelas) mantidos em cativeiro*, 2016 (em preparação)). Para estes indivíduos os parâmetros avaliados apresentaram valores menores em relação aos indivíduos amostrados em triplicata, o que era esperado, por terem acumulado volumes menores nos *pools*.

O protocolo de extração de RNA adequado para esse estudo foi eficiente para a extração de RNA espermático de mico-leão-de-cara-dourada e os perfis, tanto do coágulo seminal quanto da fração líquida foram muito semelhantes. A concentração de espermatozoides obtida com os *pools* de amostras foi menor do que a utilizada por outros

trabalhos que fizeram uso do TRIzol para a extração de RNA espermático, nos quais a concentração era de 100×10^6 espermatozoides. Conseqüentemente, o rendimento final de RNA obtido neste trabalho foi menor do que o observado, por exemplo, para bovinos (DAS et al., 2010) e suínos (RAUBER, 2008).

Como especificado pelo fabricante, o *kit Qubit HS RNA* foi capaz de quantificar com acurácia o RNA total presente nas amostras, mesmo em baixas concentrações, contudo essa quantificação diz respeito às moléculas maiores, como RNA ribossômicos e mensageiros. Para quantificação de moléculas pequenas com cerca de 20 nucleotídeos utilizamos o kit específico para microRNAs que permitiu contrastar com os valores obtidos na quantificação de RNA total. Tal como observado nas quantificações apresentadas na Tabela 1 as moléculas maiores estão presentes em concentrações muito baixas, sendo a população de RNAs espermáticos majoritariamente representada por moléculas pequenas. Na quantificação avaliada em *Bioanalyzer* (Figura 1) estão ausentes os picos referentes a RNAs ribossômicos, o que era de se esperar, uma vez que os espermatozoides são inativos transcricionalmente e as células somáticas que compõem o ejaculado foram removidas com a seleção em gradiente descontínuo de densidade e pela etapa de lise de células somáticas, tal como descrito na metodologia. Perfis qualitativos semelhantes avaliados em microeletroforese foram obtidos na extração espermática de bovinos, suínos, ovinos e humanos (GILBERT et al., 2007; RAUBER, 2008; GOODRICH, ANTON, KRAWETZ, 2013; NADJ, HUNTRISS, MILLER, 2014; CARD, 2014). Este é um perfil considerado normal para espermatozoides, uma vez que os gametas masculinos durante a espermiogênese perdem a maior parte do conteúdo citoplasmático, e isso inclui a perda da maior parte dos RNAs. Por representarem eventos transcricionais ocorridos na espermiogênese esse perfil pode ser utilizado como marcadores da qualidade seminal, caracterizando uma ferramenta não invasiva para avaliação da fertilidade masculina em bovinos (GILBERT et al., 2007).

Com relação aos RNAs ribossômicos, ao contrário do que se observa em células somáticas, para as quais estão presentes em grandes concentrações, nos espermatozoides verifica-se naturalmente que as subunidades ribossomais, incluindo as mitocondriais, são essencialmente fragmentadas, um mecanismo decorrente do silenciamento traducional (SANDLER et al., 2013). A ausência de subunidades ribossomais, portanto, é considerada indicativo de qualidade na preparação de amostras destinadas à extração de RNA, caracterizando amostras puras de espermatozoides livres da presença das células somáticas que também compõem o ejaculado (MILLER et al., 1999; OSTERMIER et al., 2002; DAS et

al., 2013), o que reitera a importância das etapas de preparação das amostras. Os resultados sugerem, portanto, que a seleção em gradiente descontínuo de Percoll e o tampão de lise de células somáticas utilizados neste trabalho foram eficientes para a purificação dos espermatozoides presentes no sêmen, inclusive do coágulo seminal, o qual foi seccionado em porções menores para facilitar a ação do tampão de lise; e apresentou o mesmo perfil que as amostras da fração líquida, e a quantificação mostrou que em alguns casos a concentração foi maior.

Às pequenas moléculas de RNA não codificante (*Small non-coding RNA* - sncRNA) são atribuídos diversos mecanismos de regulação da expressão gênica. A população de pequenos RNAs espermáticos também pode ter efeito sobre a fertilidade masculina, sugerindo que a concentração desses transcritos é indiretamente proporcional à fertilidade. (KRAWETZ et al., 2011). A complexidade de transcritos presentes nos espermatozoides tem despertado interesse na identificação dos RNA, sejam mensageiros ou não codificantes, entregues durante a fecundação e seu respectivo papel funcional na ativação do embrião e no desenvolvimento inicial do embrião. O protocolo de extração é o primeiro passo para a investigação do papel dos RNAs espermáticos como mediadores epigenéticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho destaca a importância do aproveitamento do coágulo seminal para estudos moleculares. Por meio de simples adaptações este material, que por vezes é descartado, mostrou resultados semelhantes aos obtidos com a extração de RNA da fração líquida do sêmen. Quando se trata de espécies silvestres, especialmente aquelas que se encontram sob algum grau de ameaça, idealmente o uso das amostras biológicas deve ser otimizado diante da sua preciosidade e esforço de coleta. A utilização em estudos moleculares consiste de uma boa forma de destinação do coágulo seminal, quando sua aplicação em técnicas de reprodução assistida não for possível. Além disso, a validação do protocolo de extração de RNA espermático para a espécie abre caminho para a investigação da contribuição epigenética do gameta masculino e dos fatores que influenciam o sucesso reprodutivo, e devem ser considerados no desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas.

Agradecimentos: à equipe técnica da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, especialmente à Paula Andréa, pelo auxílio na coleta de amostras; ao Laboratório de Genética de Populações da Universidade Federal de São Carlos e ao Professor Dr. Reinaldo Alves de Brito, pelo suporte laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALHORN, R.; COSMAN, M.; THORNTON, K.; KRISHNAN, V.V.; CORZETT, M.; BENCH, G. et al. Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In: Gagnon C, editor. **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Vienna, IL: CacheRiver Press, p. 55–70, 1999.
- BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, D.M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, p. 147-155, 2007.
- CASAS, E.; VAVOURI, T. Sperm epigenomics: challenges and opportunities. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 330, 2014.
- CARD, C.J. The bovine spermatozoal transcriptome and sire fertility. **Open Access Dissertations**. 2014.
- CHAN, P.J.; ORZYLOWSKA, E.M; CORSELLI, J.U.; JACOBSON, J.D.; WEI, A.K. A simple sperm DNA toroid integrity test and risk of miscarriage. *Biomed. Res. Int.* v.2015, 2015. disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310444/>>, acesso 12/07/2016.
- CHOMCZYNSKI, P; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.
- DAS, P. J. et al. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 1099-1106, 2010.
- GILBERT, I. et al. A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1073-1086, 2007.
- FLESCHE, F.M; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1469, p. 197-235, 2000.
- GIBBS, W. W. Além do DNA. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 16, Edição Especial, Genoma: o código da vida, p. 44-51, 2007.
- GOODRICH, R. J.; ANTON, E.; KRAWETZ, S.A. Isolating mRNA and small noncoding RNAs from human sperm. **Spermatogenesis: Methods and Protocols**, p. 385-396, 2013.
- HENRIQUE, P. C. ; Carvalho, F. M. ; ARAKAKI, P. R. ; LOPEZ, R. P. G. ; VALLE, R. R. . Colheita e análise de sêmen de mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*). In: XVI Congresso e XXII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2013, Salvador. Anais do XVI Congresso e XXII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. São Paulo: ABRAVAS, 2013. p. 228-229.
- KRAWETZ, S.A. Paternal contribution: new insights and future challenges. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 8, p. 633-642, 2005.
- KRAWETZ, S.A. *et al.* A survey of small RNAs in human sperm. **Hum Reprod**, v.26, p.3401-3412, 2011.

LUCIFERO, D.; CHAILLET, J. R.; TRASLER, J.M. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. **Human reproduction update**, v. 10, n. 1, p. 3-18, 2004.

MILLER, D.; BRIGGS, D.; SNOWDEN, H.; HAMLINGTON, J.; ROLLINSON, S.; LILFORD, R.; KRAWTZ, S.A. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene*, v. 237, p. 385–392, 1999.

MARTEIL, G.; RICHARD-PARPAILLON, L.; KUBIAK, J.Z. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. **Reproductive biology**, v. 9, n. 3, p. 203-224, 2009.

NADJ, S.; HUNTRISS, J.; MILLER, D. Deep RNA Sequencing of Mammalian Sperm RNA: Identifying Common Cross-Species Expression Markers that Indicate Functionality, 2014.

OSTERMEIER, G.C; DIX, D.J.; MILLER, D, KHATRI, P.; KRAWTEZ, S.A. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*, v. 360, p.772–777, 2002.

OSTERMEIER, G.C. *et al.* Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. Brief communications, *Reproductive Biology*. **Nature**, vol. 429, p. 154, 2004.

PESSOT,C.A.; BRITO, M.; FIGUEROA, J.; CONCHA, I.; YANEZ, A.; BURZIO, L.O. Presence of RNA in the sperm nucleus. **Biochem.Biophys. Res. Commun.**, 158, p. 272–278, 1989.

PUKAZHENTHI, B. *et al.* Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, fertility and development**, v. 16, p.33-46, 2006.

RAUBER, L.P. **Qualitative and quantitative analysis of porcine sperm transcripts and characterization of a normalized cDNA library**. 2008. Tese de Doutorado. Ludwig-Maximilians-Universität München.

RAUBER, L. P. RNA espermático, uma visão holística. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 4, p. 309-317, 2013.

SENDER, E. *et al.* Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. **Nucleic acids research**, p. 132, 2013.

SANTOS, I. L. S. A. ; CARVALHO, J. C. ; ARAKAKI, P. R. ; RASSY, F. B. ; NICHI, M. ; VALLE, R. R. . Validação da coloração com eosina/nigrosina para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*). In: XVII Congresso e XXIII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2014, São Paulo. Anais do XVII Congresso e XXIII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. São Paulo: Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2014. v. 1. p. 318-319.

SHARMA, S.; KELLY, T.K.; JONES, P.A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**. Vol 31, p.27-36. Oxford University, 2010.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. Vol. 65, p.126-136, 2006.

VALLE, R. R. et al. Collection and evaluation of semen from captive howler monkeys (*Alouatta caraya*). **Theriogenology**, v. 62, n. 1, p. 131-138, 2004.

VIDAL, F.D.; LUZ, M.S.; PINHO, T.G.; PISSINATTI, A. Coleta de sêmen em mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (Kuhl, 1820) através da eletroejaculação Callitrichidae - primates. **R. bras. Ci. Vet.**, v.14, n. 2, p. 67-71, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Examination and processing of human semen. 5 ed. Geneva.: World Health Organization, 2010.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Para as espécies silvestres, os estudos e propagação de conhecimentos básicos e preliminares são muito requisitados diante da enorme limitação de informações sobre a biologia reprodutiva, de modo que toda nova informação pode adicionar conhecimentos aplicáveis à conservação. Este trabalho destacou a importância do entendimento sobre os diversos aspectos envolvidos com o sucesso reprodutivo das espécies silvestres e como essas informações podem contribuir com o manejo reprodutivo. A influência do peso e da idade sobre os parâmetros seminais de mico-leão-de-cara-dourada, por exemplo, pode auxiliar na escolha de indivíduos, nas estratégias de reprodução assistida e no planejamento de colheita e criopreservação de gametas. O protocolo de seleção em gradiente descontínuo de Percoll evidenciou a necessidade de validação de protocolos para espécies silvestres, visto que esta é a técnica mais difundida na reprodução de espécies domésticas, mas não se mostrou tão eficiente quando aplicada para *Leontopithecus chrysomelas*, necessitando ainda de adequações metodológicas para a efetiva utilização em procedimentos de reprodução. A validação da extração de RNA espermático, apesar de ser uma abordagem preliminar, é significativa considerando a espécie, para a qual o conhecimento de aspectos moleculares envolvidos na reprodução é praticamente nulo. Além disso, a possibilidade de extração de RNA espermático do coágulo seminal garante o maior aproveitamento das amostras biológicas e oportunidade de estudos acerca da biologia reprodutiva da espécie. Este trabalho abre caminho para a investigação da contribuição paterna no sucesso reprodutivo e para o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas, considerando a perspectiva de utilização dos RNAs espermáticos como marcadores moleculares da fertilidade. A oportunidade de pesquisa utilizando mico-leão-de-cara-dourada visa contribuir com o manejo reprodutivo de outras espécies do gênero *Leontopithecus sp.*, como o mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*), que apresenta baixo sucesso reprodutivo em cativeiro. Os fatores de influência seminal e epigenéticos podem ser a chave para o entendimento das diferenças observadas no sucesso reprodutivo entre espécies proximamente relacionadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRABI, S.M.H; MAXWELL, W.M.C. A review in reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**. 99. The University of Sydney, Camden, Australia, p. 223-243, 2007.
- BATISTA, A. M. **Influência das técnicas de seleção Swim-up e gradiente de densidade (Percoll® e CapriPure®) na viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. 2009. 54f.** 2009. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BEYDOLA, T.; SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Sperm preparation and selection techniques. In.: RIZK, B; AZIZ, N.; AGARWAL, A. **Male Infertility Practice**. p. 244-251, 2013.
- BLOTTNER, S. Semen preservation for the management of reproduction in rare and endangered species. **Adv. Ethol.**, v. 33, p. 9-13, 1998.
- BRASIL, A.F., **Avaliação histológica da população de folículos pré-antrais ovarianos e da taxa de atresia folicular em fêmeas de diferentes espécies e posições hierárquicas de *Leontopithecus* (CALLITRICHIDAE – PRIMATES) mantidas em cativeiro.** Dissertação. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2008.
- BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, D.M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, p. 147-155, 2007.
- CARDOSO, N. *et al.* Resultados preliminares da distribuição atual de mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*). The Smithsonian National Zoological Park, 2005.
- CARVALHO, F.A. *et al.* A importância dos remanescentes florestais da Mata Atlântica da baixada costeira fluminense para a conservação da biodiversidade na APA da bacia do Rio São João/mico-leão-dourado/IBAMA-RJ. In: **Livro de resumos do IV Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação**. Curitiba-PR. Vol. 1- Trabalhos Técnicos, p. 106-113, 2004.
- CUI, K. H.; FLAHERTY, S. P.; NEWBLE, C. D.; GUERIN, M. V.; NAPIER, A. J.; MATTHEWS, C. D. Collection and analysis of semen from the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Andrology**, v. 12, n. 13, p. 214-220, 1991.
- DE VLEESCHOUWER, K; LEUS, K.; VAN ELSACKER, L. Characteristics of Reproductive Biology and Proximate Factors Regulating Seasonal Breeding in Captive Golden-Headed Lion Tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*). **American Journal of Primatology**, v. 60, p. 123–137, 2003.
- DOMINGUES, S.F.S.; LIMA, J.S.; OLIVEIRA, K.G.; SANTOS, R.R. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação in situ de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.124-129, 2011.
- DURRANT, B. S. Semen collection, evaluation, and cryopreservation in exotic animal species: Maximizing reproductive potential. **ILAR Journal**, v. 32, n. 1, p. 2-10, 1990.

COIMBRA-FILHO, A.F.; MITTERMEIER, R.A. Distribution and ecology of the genus *Leontopithecus*. *Primates*. Harvard University. p. 47-66, 1973.

EISENBERG, J.F. Comparative ecology and reproduction of New World Monkeys. In: KLEIMAN, D.G., (Ed.). **The Biology and Conservation of the Callitrichidae**. Washington: Smithsonian Institution Press, p. 13-22. 1977.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and conservation of endangered species. Review. **Eur J Wildl Res**. Vol:53, p. 81–89, 2007.

FRANCOISE, J.M. Semen Collection and Seminal Quality in Primates. **J. Primatol.**, v. 3, p.1:2, 2014.

GIBBS, W. W. Além do DNA. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 16, Edição Especial, Genoma: o código da vida, p. 44-51, 2007.

GROOM, M. J., MEFFE, G.K.; CARROLL, C. R. **Principles of Conservation Biology**. 3ª Edição. Sinauer associates, Sunderland, 2006.

GUIDORIZZI, C.E. **Ecologia e comportamento do mico-leão-da-cara-dourada, *Leontopithecus chrysomelas* (Kuhl, 1820) (PRIMATES- CALLITRICHIDAE) Bahia, Brasil**. Tese. Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós Graduação em Zoologia. Ilhéus, Bahia, 2008.

GINSBERG, J. R.; HUCK, U. W. Sperm competition in mammals. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 4, n. 3, p. 74-79, 1989.

HANKS, J., Conservation strategies for Africa's large mammals. *Reproduction, Fertility and Development*. 13, 459–468, 2002.

HENRIQUE, P. C., CARVALHO, F. M., ARAKAKI, P. R., LOPEZ, R. P. G., VALLE, R. R. Colheita e análise de sêmen de mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) In: XVI Congresso e XXII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2013, Salvador. **Anais do XVI Congresso e XXII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens**. São Paulo: ABRAVAS, p.228 – 229, 2013.

HOLT, W.V. Advances in artificial insemination and semen freezing in mammals. **Symp. Zool. Soc. Lond.** v. 64, p. 19–35, 1992.

KLEIMAN, D.G.; MALLINSON, J.J.C. Recovery and management committees for lion tamarins: partnerships in conservation planning and implementation. **Conservation Biology**, v. 12, n. 1, p. 27-38, 1997.

HORSTHEMKE, Bernhard; LUDWIG, Michael. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. **Human reproduction update**, v. 11, n. 5, p. 473-482, 2005.

INBAR-FEIGENBERG, Michal et al. Basic concepts of epigenetics. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 3, p. 607-615, 2013.

IUCN. **2007 IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 10 agosto de 2016.

IVY, J.A. *et al.* Methods and prospects for using molecular data in Captive Breeding Programs: An empirical example using Parma Wallabies (*Macropus parma*). American Genetic Association. **Journal of Heredity**, p. 441-454, 2009.

JENSEN, T.K. *et al.* Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. **Fertility and sterility**, v. 82, n. 4, p. 863-870, 2004.

KORT, H.I. *et al.* Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. **Journal of andrology**, v. 27, n. 3, p. 450-452, 2006.

LUCIFERO, D.; CHAILLET, J. R.; TRASLER, J.M. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. **Human reproduction update**, v. 10, n. 1, p. 3-18, 2004.

MARTINS, C.D. **Conservação do mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*): Três Tipos de Manejo Avaliados Através da Ecologia e Comportamento**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Campinas, 2003.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Disponível em www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index, acesso em 14 set. 2007.

MEYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. 403: 853-845, 2000.

MORAES, A.M. **Avaliação da Estrutura Genética das Populações de Mico-leão-de-cara-dourada, *Leontopithecus chrysomelas* (Kuhl, 1820)(PRIMATES: CALLITRICHIDAE), no Sul da Bahia**, Brasil. 2011, 83f. Dissertação (Mestrado Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.

MORRELL, J.M. Artificial insemination in non-human primates. In: **Ganslosser, U., Hodges, J.K., Kaumanns, W. _Eds., Research and Captive Propagation**. Filander Verlag, Fuerth, p. 59–70, 1995.

MORRELL, J. M. *et al.* Artificial insemination in *Callithrix jacchus* using fresh or cryopreserved sperm. **Animal reproduction science**, v. 52, n. 2, p. 165-174, 1997.

MORRELL, J. M.; HODGES, J. K. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. **Animal reproduction science**, v. 53, n. 1, p. 43-63, 1998.

MULLER, H.R.; PRADO, K.B. Epigenética: um novo campo da Genética. **RUBS**, vol.1, p. 61-69. Curitiba, 2008.

NAGLE, C. A.; DENARI J.H. The cebus monkey (*Cebus apella*), p 39-67. In: HEARN, J.P. **Reproduction of new world primates**. Lancaster: MTP Press, p. 149-179, 1983.

OSTERMEIER, G.C. *et al.* Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. Brief communications, Reproductive Biology. **Nature**, vol. 429, p. 154. 2004.

PANYABORIBAN, S. et al.. Reproductive seasonality and sperm cryopreservation in the male tufted deer (*Elaphodus cephalophus*). **Theriogenology**. 2016.

PESSOT, C.A.; BRITO, M.; FIGUEROA, J.; CONCHA, I.; YANEZ, A.; BURZIO, L.O. Presence of RNA in the sperm nucleus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.158, p. 272–278, 1989.

PUKAZHENTHI, B. et al. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, fertility and development**, v. 16, p.33-46, 2006.

REZENDE, G.C. **Mico-leão-preto: A história de sucesso na conservação de uma espécie ameaçada**. Editora Matrix, p:84, 2014.

RABOY, B.E & DIETZ, J.M. Diet, Foraging, and Use of Space in Wild Golden-Headed Lion Tamarins. **American Journal of Primatology** v.63, p.1–15, 2004.

RYLANDS, A.B. Sympatric brazilian callitrichids: The black tufted ear marmoset (*Callithrix kuhli*), and the golden headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*). **Journal of Human Evolution**. v.18, p. 679-695, 1989.

SANTOS, I.L.S; CARVALHO, J. C. ; ARAKAKI, P. R. ; RASSY, F. B. ; NICHI, M. ; VALLE, R. R. . **Validação da coloração com eosina/nigrosina para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*)**. In: XVII Congresso e XXIII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2014, São Paulo. Anais do XVII Congresso e XXIII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. São Paulo: Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2014. v. 1, p. 318-319.

SCHNEIDERS, A.; SONKSEN, J.; HODGES, J.K. Penile vibratory stimulation in the marmoset monkey: a practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality. *Journal of Medical Primatology*, v. 33, p. 98-104, 2004.

SHARMA, S.; KELLY, T.K.; JONES, P.A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**. Vol 31, p.27-36. Oxford University. 2010.

SITZMANN, B.D.; URBANSKI, H. F.; OTTINGER, M.A. Aging in male primates: reproductive decline, effects of calorie restriction and future research potential. **Age**, v. 30, n. 2-3, p. 157-168, 2008.

SOLLARS, V. et al. Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution. **Nature genetics**, v. 33, n. 1, p. 70-74, 2003.

SOUZA-ARAÚJO, N.L. Reprodução de Primatas Neotropicais: Avanços e Perspectivas. **Ciência Animal**, v.22, p.296-307, 2012.

SUSSMAN, R. W.; GARBER, P. A. A new interpretation of the social organization and mating system of the Callitrichidae. **International Journal of Primatology**, v. 8, n. 1, p. 73-92, 1987.

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**. Vol.1. p 132-138. 2005.

- VALLE, R. R. **Características físicas e morfológicas do sêmen de *Allouata cayara* (Humboldt, 1812) mantidos em cativeiro.** 2002, 66f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- VALLE, R. R. **Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*).** 2007. 169 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- VALLE, R. R. et al. Semen characteristics of captive common marmoset (*Callithrix jacchus*): a comparison of a German with a Brazilian colony. **Journal of medical primatology**, v. 43, n. 4, p. 225-230, 2014.
- VIDAL, F.D.; LUZ, M.S.; PINHO, T.G.; PISSINATTI, A. Coleta de sêmen em mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (Kuhl, 1820) através da eletroejaculação Callitrichidae - primates. **R. bras. Ci. Vet.**, v.14, n. 2, p. 67-71, 2007.
- WAGGONER, D. Mechanisms of disease: epigenesis. **Seminars in Pediatric Neurology**, Philadelphia, v. 14, p. 7-14, 2007.
- WILDT, D.E.; ROTH, T.L. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. **International Zoo Yearbook**, v. 35, n. 1, p. 164-172, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Examination and processing of human semen.** 5. ed. Geneva: World Health Organization, p. 286, 2010.
- ZEIGLER, S. et al. Identifying important forest patches for the long-term persistence of the endangered golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*). **Tropical Conservation Science**, v. 3, n. 1, p. 63-77, 2010.

ANEXO 1.

Ficha para a categorização de defeitos maiores e menores utilizada na avaliação da morfologia espermática.

Morfologia					
DEFEITOS MAIORES					
Defeitos no acrossomo					
Cabeça subdesenvolvida					
Cabeça isolada patológica					
Estreitamento na base					
Cabeça piriforme					
Cabeça pequena anormal					
Contorno anormal					
<i>Pouch formation</i>					
Cauda enrolada na cabeça					
Cauda fortemente dobrada ou enrolada					
Cauda dobrada com gota					
Defeitos na peça intermediária					
Gota proximal					
Formas teratológicas					
Formas duplas					
DEFEITOS MENORES					
Cabeça delgada					
Cabeça gigante					
Cabeça pequena normal					
Cabeça larga					
Cabeça isolada normal					
Cauda dobrada					
Cauda enrolada					
Retroimplantação					
Implantação abaxial					
Implantação oblíqua					
Gota distal					
Cabeça isolada com peça intermediária					
ESPERMATOZOIDES NORMAIS					