

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

ISABELA MIDORI WATANABE

**GAMETA MASCULINO DE MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA  
(*LEONTOPITHECUS CHRYSOMELAS*): PARÂMETROS REPRODUTIVOS  
SEMINAIS E EPIGENÉTICOS**

São Carlos – SP

2015

ISABELA MIDORI WATANABE

**GAMETA MASCULINO DE MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA  
(*LEONTOPITHECUS CHRYSOMELAS*): PARÂMETROS REPRODUTIVOS  
SEMINAIS E EPIGENÉTICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-graduação em  
Conservação da Fauna para a obtenção  
do título de Mestre Profissional em  
Conservação da Fauna

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Cristina  
Peripato

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Del Rio  
do Valle

São Carlos - SP

2015

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

W324g Watanabe, Isabela Midori  
Gameta masculino de mico-leão-de-cara-dourada  
(*Leontopithecus chrysomelas*) : parâmetros  
reprodutivos seminais e epigenéticos / Isabela  
Midori Watanabe. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
82 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2015.

1. *Leontopithecus chrysomelas*. 2. Biotécnicas da  
reprodução. 3. Sêmen. 4. PEG3. 5. PEG1/MEST. I. Título.



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

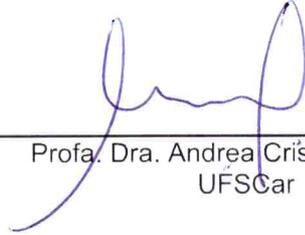
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna

---

## Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Isabela Midori Watanabe, realizada em 23/09/2015:



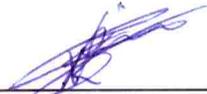
---

Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato  
UFSCar



---

Profa. Dra. Patricia Locosque Ramos  
FPZSP



---

Prof. Dr. Rafael Vilar Sampaio  
USP

**ERRATA**  
**AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp agradeço por todo apoio financeiro (processo nº 2014/02231-2) e institucional que me proporcionou ao longo de toda a minha trajetória científica,

A Deus por estar junto a mim em todos os momentos de minha vida, iluminando o meu caminho, abençoando me e me dando forças para seguir em frente com prazer e alegria.

Ao professor Gerson pela orientação científica e pelo exemplo de conduta ética e responsável com seus alunos e pela ciência. Também por todos os ensinamentos transmitidos com tanta generosidade e paciência.

Ao professor Dr. Roberto Santana da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela síntese do composto estudado.

Aos colegas de laboratório, Tereza, Carla, Ariane, Thiago, Luis, Jorge e Júlio, pelo ótimo convívio e troca de conhecimentos.

Aos membros da banca examinadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.: Lusiane Maria Bendhack e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.: Keika Inoye, pela atenção e disposição em fazer parte desta banca.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão da FAPESP. (Cláusula incluída pela Deliberação do CTA Nº 01/2013)

Instituição

*Alexandre Prata Vieira Chiva*

Alexandre P. Vieira Chiva  
Assist. em Administração  
UFSCar



## Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família por ter me oferecido suporte, carinho e atenção nos momentos difíceis, tanto em relação a mestrado, quanto aos problemas de ordem pessoal. Em especial a minha mãe, e aos meus tios Keiko e Hideo por acreditarem no meu potencial e investirem nos meus sonhos.

As minhas companheiras de mestrado: Gisele, Camila Martins, Denise, Priscila, Bruna, Camila Galvão e Yanna, por terem dividido comigo experiências ímpares ao longo deste percurso.

Aos meus amigos, especialmente: Helena, Gui, Fernanda, Vinícius, Lucão, Aninha, Aline, Cabeção, Rafael, Lashmi, Marcela, entre outros. Todos vocês sempre me apoiaram e me renderam bons momentos de diversão.

Aos meus companheiros atuais e antigos do Laboratório de Genética de Populações e Evolução, principalmente ao André, Diana, Nancy, Patrícia e Emeline que muito me ajudaram nos momentos de desespero e me proporcionaram ótimos momentos de descontração e companheirismo.

Aos meus exemplos na pesquisa: Bruno Sauce e Iderval, que apesar de não estarem presentes fisicamente em grande parte do meu mestrado, continuam sendo o meu exemplo de conduta.

Ao Prof. Dr. Rodrigo do Valle, o qual permitiu e possibilitou que eu me embrenhasse em uma área totalmente nova, me oferecendo suporte diante das novidades. A Paloma, Isadora e Jaqueline por me ajudarem tanto nos procedimentos trabalhosos de análise espermática.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito por ter me concedido o usufruto do Laboratório de Genética de Populações e Evolução e que, mesmo não sendo meu orientador formal, me auxiliou diversas vezes sempre com muita boa vontade.

A minha orientadora Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato por ter me acompanhado desde o momento em que cheguei ao laboratório com meus 18 anos, sem nenhuma experiência, até agora. Foi quem me moldou e auxiliou no meu amadurecimento profissional, sem o qual não teria condições de chegar até aqui. Agradeço imensamente o seu carinho e compreensão.

Ao apoio financeiro concedido pela FAPESP.

E finalmente ao PPGCFau, compreendido pela UFSCar e FPZSP, pela bolsa concedida e pela oportunidade única deste mestrado diferenciado.

## Resumo

O mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) é um primata endêmico do bioma Mata Atlântica que atualmente tem seu status de ameaçado de extinção. Esforços para a conservação da espécie englobam programas de conservação *in situ* e *ex situ*, e a utilização de biotécnicas da reprodução poderá auxiliar no manejo populacional, dessa forma garantindo que as populações se mantenham geneticamente saudáveis. Para tanto é necessário conhecer características reprodutivas da espécie, como parâmetros seminais e variáveis que podem influenciá-los, além de mecanismos epigenéticos envolvidos no *imprinting* genômico, uma vez que estes estão associados ao sucesso reprodutivo e alterações em seu padrão têm sido correlacionadas a técnicas de reprodução assistida. No presente estudo investigamos os parâmetros reprodutivos seminais e moleculares do gameta masculino de micos-leões-de-cara-dourada mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Esses animais foram divididos em dois grupos principais: idosos (idade média de 148,17 meses; n=6) e novos (idade média de 50,17 meses; n=6). Em relação a todos os animais, o peso não influenciou os parâmetros seminais, contrário do que foi encontrado com a variável coeficiente de endogamia por *pedigree*, em que foram encontradas correlações negativas com motilidade total (R= -0,380, p<0,001), motilidade progressiva retilínea (R= -0,443, p<0,001) e integridade de membrana plasmática (R= -0,270, p=0,018). Entre os parâmetros seminais foram encontradas correlações positivas entre os parâmetros: motilidade progressiva retilínea e motilidade total (R=0,859, p=0,001), motilidade progressiva retilínea e integridade de acrossoma (R=0,631, p=0,041), e integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma (R=0,629 e p=0,042). Encontramos correlações negativas entre pH e concentração espermática (R= -0,612 e p=0,029). Ao investigar os grupos idosos e novos verificamos diferença significativa entre eles somente para pH seminal (t(9)=2,45, p=0.04), em que os machos idosos apresentam pH mais básico do que os machos novos. Os parâmetros moleculares investigados nos espermatozoides destes primatas envolveram a análise da metilação de dois genes com *imprinting* materno, o *PEG3* e *PEG1/MEST*. A busca de tais genes e das regiões a serem investigadas foram inferidas a partir do genoma disponível de *Callithrix jacchus*. Mediante o sequenciamento por bissulfito investigamos as ilhas CpG de *PEG3* e *PEG1/MEST* com o intuito de se analisar *DMRs* putativas para os

mesmos. Dentre os gametas dos animais amostrados não foram encontradas diferenças de metilação nas regiões investigadas, de modo que a região analisada de *PEG3* se mostrou hipermetilada, e a região de *PEG1/MEST*, hipometilada. A ilha CpG estudada em *PEG3* localiza-se em um éxon, indicando não estar diretamente ligada no controle do imprinting, porém a ilha de *PEG1/MEST* localizada na região promotora do gene se mostrou hipometilada, como era esperado, além de se alinhar com região promotora do gene em humanos, sugerindo que poderia ser uma possível *DMR*. Estudos mais detalhados para verificar o funcionamento de genes de imprinting em *L. chrysomelas* devem ser empregados, porém foi possível realizar uma investigação inicial que, conjuntamente com informações de parâmetros seminais, podem contribuir para o manejo populacional de mico-leão-da-cara-dourada em cativeiro.

**Palavras-chave:** *Leontopithecus chrysomelas*; biotécnicas da reprodução; sêmen; *imprinting* genômico; *PEG3*; *PEG1/MEST*

## Abstract

The Golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) is an endemic monkey to Atlantic Forest. Nowadays, they are classified as threatened of extinction. Efforts on its conservation cover in situ and ex situ programs, and the application of the biotechnology of reproduction could assist populational management, hence ensuring the maintenance of genetically healthy populations. Therefore, it is necessary to understand species reproductive characteristics, such as seminal parameters and variables that could influence them, and also the epigenetic mechanisms involved on genomic imprinting - once they are associated with reproductive success, and alterations on its patterns have been correlated with assisted reproduction technics. In the present study we investigated seminal and molecular parameters of golden-headed lion tamarins' male gametes that are kept in captivity at São Paulo Zoological Foundation. Two main groups were outlined: seniors (mean age of 148.17 months; n=6) and young (mean age=50.14 months; n=6). Considering all animals, we could not find influence of weight on seminal parameters, as oppose to inbreeding coefficient variable, that showed negative correlation with total motility (R= -0.380, p<0.001), progressive motility (R= -0.443, p<0.001) and plasmatic membrane integrity (R= -0.270, p=0.018). Among seminal parameters, we found positive correlations between progressive motility and total motility (R=0.859, p=0.001), progressive motility and acrosome integrity (R=0.631, p=0.041), acrosome integrity and plasmatic membrane integrity (R=0.629, p=0.042). In addition, we found negative correlation between seminal pH and concentration (R= -0.612, p=0.029). There was only significant difference between seminal pH considering seniors and young males (t(9)=2.45, p=0.04), in which the seniors showed more alkaline pH. Molecular parameters investigated on these primates semen involved methylation analysis of two maternal imprinted genes: *PEG3* and *PEG1/MEST*. Based on *Callithrix jacchus* genome, we inferred genes and its CpG islands to study them in *L. chrysomelas*. Through bisulfite sequencing, we investigated these regions of *PEG3* and *PEG1/MEST* aiming to analyze putative DMRs. Among sampled animals, we could not find methylation differences on these regions, wherein all samples showed hypermethylated *PEG3* region, and hipomethylated *PEG1/MEST* region. *PEG3* CpG island is located in an exon, suggesting it is not involved in an imprinting control region. However, *PEG1/MEST* CpG island locates at a promoter region, showing

hipomethylaton -as expected-, and align with *PEG1/MEST* promoter in humans, which could indicate a potential DMR. Our results are insipient to draw a conclusion about these imprinted genes in *L. chrysomelas*, but it was relevant as an initial approach to contribute to populational manegement of golden-headed lion tamarins kept in captivity.

**Keywords:** *Leontopithecus chrysomelas*; biotechnology of reproduction: semen; genomic imprinting; *PEG3*; *PEG1/MEST*

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1</b> - Colheita de sêmen de mico-leão-de-cara-dourada. ....	27
<b>Figura 2</b> - Esfregaço com coloração Eosina-Nigrosina (1%).. ....	30
<b>Figura 3</b> - Animais da FPZSP selecionados. ....	41
<b>Figura 4</b> - Gene <i>PEG3</i> descrito em <i>Callithrix jacchus</i> .....	50
<b>Figura 5</b> - Gene <i>PEG1/MEST</i> em <i>C. jacchus</i> . ....	51
<b>Figura 6</b> - Eletroforeses em gel 1% corados.....	53
<b>Figura 7</b> - Alinhamento das 5 sequências de PCR-bissulfito.....	55
<b>Figura 8</b> - Médias de metilação por animal amostrado para cada sítio CpG das regiões <i>PEG1/MEST</i> e <i>PEG3</i> na direita.....	56
<b>Figura 9</b> - Promotores de transcrição de <i>PEG1/MEST</i> e <i>PEG1As</i> em humanos.....	59

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Peso e parâmetros seminais avaliados.....	44
<b>Tabela 2.</b> <i>Primers</i> para PCR normal e PCR bissulfito.....	52
<b>Tabela 3.</b> Genes identificados pela busca da sequência amplificada de PEG3.....	54

## Sumário

1. Introdução.....	14
1.1. Mico-leão-de-cara-dourada e conservação.....	14
1.2. Parâmetros seminais.....	16
1.3. Epigenética e reprodução .....	18
1.4. <i>Imprinting</i> genômico.....	19
1.5. Justificativa.....	23
2. Objetivos.....	24
3. Material e Métodos .....	25
3.1. Animais .....	25
3.2. Local de estudo e manejo alimentar .....	25
3.3. Delineamento amostral .....	26
3.4. Colheita de sêmen .....	26
3.5. Avaliação Seminal.....	28
3.5.1. Concentração espermática.....	29
3.5.2. Motilidade .....	29
3.5.3. Análise de integridade de membrana plasmática .....	30
3.5.4. Análise de integridade de acrossoma.....	30
3.6. Procedimentos moleculares .....	31
3.6.1. Identificação de <i>DMRs</i> putativas .....	31
3.6.2. Desenho de <i>primers</i> .....	32
3.6.3. Extração de DNA.....	32
3.6.4. Conversão por bissulfito de sódio.....	33
3.6.5. Reação em cadeia polimerase (PCR) .....	33
3.6.6. Clonagem e transformação dos fragmentos.....	35
3.6.7. Amplificação por PCR do plasmídeo presente na bactéria.....	35

3.6.8.	Sequenciamento.....	36
3.6.9.	Análise dos resultados de sequenciamento .....	36
3.6.10.	Análise de metilação das regiões estudadas.....	37
3.6.11.	Análise estatística.....	37
4.	Resultados e Discussão .....	39
4.1.	Delineamento amostral .....	39
4.2.	Colheita de sêmen .....	41
4.3.	Avaliação seminal .....	42
4.3.1.	Diferenças seminais entre grupos .....	46
4.3.2.	Variáveis Peso e Coeficiente de Endogamia (F) e suas relações com parâmetros seminais.....	47
4.4.	Procedimentos moleculares .....	49
4.4.1.	Identificação de <i>DMRs</i> putativas e desenho de <i>primers</i> .....	49
4.4.2.	Extração de DNA, conversão por bissulfito e PCR .....	52
4.4.3.	Análise de sequenciamento.....	53
4.4.4.	Análise de metilação.....	54
4.5.	Análise de metilação dos genes <i>PEG3</i> e <i>PEG1/MEST</i> .....	56
5.	Conclusão.....	61
6.	Referências bibliográficas.....	62
<b>Anexo A</b>	<b>- Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar...</b>	<b>74</b>
<b>Anexo B</b>	<b>- Protocolo regulamentado pelo IBAMA.....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo C</b>	<b>- Heredograma da população mantida na Fundação Parque Zoológico de São Paulo.....</b>	<b>78</b>
<b>Anexo C.1</b>	<b>– Representação do Grupo 1 .....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo C.2</b>	<b>- Representação do Grupo 2 .....</b>	<b>80</b>
<b>Anexo C.3</b>	<b>- Representação do Grupo 3 .....</b>	<b>81</b>
<b>Anexo C.4</b>	<b>- Representação do Grupo 4 .....</b>	<b>82</b>

## 1. Introdução

### 1.1. Mico-leão-de-cara-dourada e conservação

O mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas* – Kuhl, 1820) é um primata da família CALLITRICHIDAE endêmico da Mata Atlântica, ocupando fragmentos no estado da Bahia e a região nordeste do estado de Minas Gerais, que atualmente é classificado como “ameaçado” de extinção, tanto pela *Red List* da IUCN (IUCN, 2008), quanto pela Associação Chico Mendes (OLIVEIRA, 2015). O maior risco atual para a espécie é a perda de habitat natural, uma vez que há uma crescente taxa de retirada de florestas e diminuição da plantação de cacau (ALGER; CALDAS, 1994) devido ao aumento de plantações alternativas de óleo de palmeira africana, cocos e da pecuária (PINTO; RYLANDS, 1997). Somado a isso, as populações naturais remanescentes do primata encontram-se depauperadas e fragmentadas (IUCN, 2008).

A história de manejo populacional desses primatas em cativeiro iniciou-se nos anos 1970 com o estabelecimento dos primeiros programas de reprodução em cativeiro por Ademar Coimbra-Filho, porém a preocupação com a conservação ocorreu de fato na década de 1980, quando um grande número de indivíduos foi ilegalmente exportado do Brasil para traficantes ilegais e colecionadores de animais exóticos, principalmente no Japão e na Bélgica (KLEIMAN; MALLINSON, 1998). Uma vez que o tráfico resultou na retirada de muitos indivíduos, o órgão governamental “Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal”, atualmente conhecido como IBAMA, requereu a criação de uma IRMC (*International Recovery and Management Committee*) para a espécie, cujo intuito inicial era a repatriação dos animais contrabandeados (KLEIMAN; MALLINSON, 1998).

Visto que a fragmentação das populações e do habitat de *L. chrysomelas* foram/são as maiores causas para a ameaça da sobrevivência da espécie, a melhor abordagem conservacionista escolhida foi o manejo em forma de metapopulações, integrando populações in situ, já conhecidas, com populações cativas cientificamente manejadas (KLEIMAN; MALLINSON, 1998). Essa abordagem permite unir as

vantagens da conservação *in situ* - cujo intuito é preservar o habitat natural da espécie, e desse modo, resguardando não só o meio-ambiente, como o animal foco (MARGULES; PRESSEY, 2000) -, como da conservação *ex situ*, que consiste em reproduzir e estabelecer espécies em cativeiro (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004). Tais populações cativas podem ser uma garantia para a espécie e servir como um reservatório de indivíduos para reintrodução. Além do mais, animais em cativeiro podem auxiliar em estudos que são de valor inestimável para o manejo de espécies selvagens e servir como inspiração social para apreciação e auxílio para iniciativas de conservação *in situ* (PUKAZHENTHI et al., 2006).

Um dos grandes desafios da manutenção de populações *ex situ* é mantê-las geneticamente saudáveis, uma vez que o cativeiro oferece grandes efeitos colaterais, como a perda de variabilidade genética, a depressão endogâmica e a adaptação genética ao ambiente (FRANKHAM, 1995). Dessa forma, populações cativas com registro de pedigree têm sido manejadas para maximizar a diversidade genética através da diminuição do coeficiente médio de parentesco (BALLOU; LACY, 1995; FRANKHAM, 2010). Não obstante, algumas vezes os esforços mostram-se insuficientes para a manutenção de pequenas populações ou da diversidade genética, dessa forma novas tecnologias têm sido desenvolvidas procurando estabelecer populações viáveis através de técnicas de reprodução assistida ou de novas biotécnicas reprodutivas. Há esperança que tais ferramentas poderiam acarretar em aumento da progênie de parentais previamente selecionados e reduzir o intervalo entre as gerações (ANDRABI; MAXWELL, 2007).

Biotécnicas da reprodução podem oferecer diversas ferramentas, dentre elas a utilização de espermatozoides maduros. Tal tecnologia permite a movimentação de informação genética masculina dentro e entre as populações sem a necessidade da presença física ou atividade reprodutiva, dessa forma, possibilitando a introdução de “genes fundadores” sem a remoção de indivíduos de vida livre ou translocação de indivíduos entre diferentes instituições. Ela também permite superar desafios de incompatibilidade sexual, como agressão masculina ou seleção preferencial de machos, além de poder preservar potencial reprodutivo de um indivíduo mesmo após sua morte por meio de metodologias de armazenamento a longo prazo (PUKAZHENTHI et al., 2006).

A futura utilização dessas biotécnicas depende de um conhecimento bem documentado sobre a biologia reprodutiva da espécie foco, uma vez que existem

diferenças de mecanismos reprodutivos, de fenótipos e genótipos entre espécies, mesmo entre aquelas intimamente relacionadas (PUKAZHENTHI et al., 2006).

Apesar de existir informações acerca da reprodução em mico-leão-de-cara-dourada ou em calitriquídeos em geral, estas se baseiam no comportamento reprodutivo e em informações mais básicas. Pouco se sabe sobre os parâmetros seminais da espécie, quais fatores podem influenciá-los e como algumas informações genéticas podem ser transmitidas por meio destes gametas. Logo, o presente estudo tem intuito de fazer uma investigação preliminar sobre estas informações visando obtenção de conhecimentos importantes para a aplicação de biotécnicas reprodutivas na conservação de mico-leão-de-cara-dourada.

## 1.2. Parâmetros seminais

Quando se trata da possibilidade de realizar criopreservação, inseminação artificial ou *in vitro*, é providencial que se conheça parâmetros seminais normais, uma vez que somente amostras representativas de boa qualidade poderão sobreviver ciclos de congelação-descongelação, e serem capazes de fecundar um óvulo e produzir embrião. A partir do conhecimento dos parâmetros normais, se torna possível identificar indivíduos subfêrteis, estes que demandarão intervenções, caso se deseje utilizá-los como reprodutores (FRANCOISE, 2014).

Para se estimar valores padrão de características seminais deve se ter cautela em relação a diferentes fatores que podem influenciá-las, como por exemplo idade dos indivíduos (MARSON, 1991), masturbação ou acasalamento prévio à colheita (MARSON et al., 1989), sazonalidade (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2002), doenças (FRANCOISE, 2014), endogamia na população (ROLDAN et al., 1998) e peso (VALLE et al., 2014).

Medidas padrão de qualidade seminal incluem volume, motilidade espermática, morfologia e concentração (DURRANT, 1990). Outras medidas podem ser inclusas, como pH seminal, integridade do acrossoma (percentual de espermatozoides com acrossoma íntegro) e integridade de membrana plasmática

(percentual de espermatozoides viáveis) (SCHAFFER et al., 1989; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

A maioria dos primatas são conhecidos por ter um sêmen com muitos fluidos seminais que se coagulam logo após a ejaculação, formando desde coágulos menos densos, até *plugs* vaginais (DIXSON; ANDERSON, 2002). Geralmente são observadas duas frações, a líquida e o coágulo, este que aglutina espermatozoides tornando assim necessária a sua dissolução anteriormente às análises seminais para liberação de espermatozoides que se encontrem em seu interior (DIXSON; ANDERSON, 2002; SCHAFFER et al., 1989). A dissolução completa deste coágulo se torna possível quando trata-se o ejaculado com soluções enzimáticas, o que pode causar alterações em características seminais. Uma outra forma é incubar o ejaculado imediatamente em meio diluidor, permitindo que uma porção dos espermatozoides presos no coágulo sejam liberados (SCHAFFER et al., 1989).

A concentração e a motilidade podem ser consideradas medidas padrão nas análises espermáticas, sendo que a movimentação espermática pode ser classificada em: espermatozoides imóveis, móveis e, dentre estes, os que apresentam motilidade progressiva retilínea (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Tratando-se de animais silvestres com algum risco de extinção, a motilidade pode ser um importante indicador uma vez que se correlaciona positivamente com fertilidade e, negativamente com baixa heterozigosidade e taxas altas de endogamia (ASA et al., 2007; MALO et al., 2010).

A averiguação da integridade de membrana plasmática é uma forma de se avaliar a viabilidade espermática, uma vez que técnicas de coloração se baseiam no princípio que membranas plasmáticas danificadas permitem a entrada de colorações das quais normalmente são impermeáveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Essa análise pode ser feita por meio do uso dos corantes Eosina-Nigrosina (1%) - a técnica tem sido rotineiramente utilizada para essa finalidade em humanos e já está validada para utilização em *Leontopithecus chrysomelas* (SANTOS et al., 2014).

O acrossoma é uma vesícula localizada na porção anterior da cabeça do espermatozoide que contém diversas enzimas necessárias para a reação acrossômica, processo necessário para a penetração do espermatozoide na zona pelúcida do óvulo. Se a membrana acrossômica está previamente danificada não será possível a fecundação do gameta feminino, tornando assim necessária a avaliação da

condição da vesícula para estimativas de fertilidade (GRAHAM, 1990). Existem várias técnicas de avaliação da integridade do acrossomo baseadas na utilização de colorações, como o corante comercial *Spermac* que já foi utilizado em *Callithrix jacchus* (VALLE, 2007) e *Alouatta caraya* (CARVALHO et al., 2014), o corante à base de fluorescência *FITC-PSA* que também já foi utilizado em *C. jacchus* (VALLE et al., 2008) e a coloração simples para acrossoma, desenvolvida por POPE, ZHANG e DRESSER (1991), esta que já foi validada para uso em *C. jacchus* (VALLE et al., 2008) e em *L. chrysomelas* (em preparação por Valle, RR).

Existem diferenças de fertilidade entre sêmen de diferentes machos, e entre sêmen fresco e congelado-descongelado do mesmo macho, sendo assim análises laboratoriais para amostras seminais foram desenvolvidas com a expectativa de prover indicações sobre o potencial de fertilização das amostras. A combinação dos resultados de análises que avaliam diferentes aspectos seminais são altamente correlacionadas com fertilidade dos indivíduos (GRAHAM, 1990).

### 1.3. Epigenética e reprodução

O termo epigenética foi proposto pela primeira vez por WADDINGTON (1959), referindo-se à regulação gênica que modula o desenvolvimento. Epigenética, atualmente, é definida como as alterações hereditárias na expressão dos genes que não podem ser explicadas por mudanças na sequência primária de DNA (RUSSO; MARTIENSSEN; RIGGS, 1996). Tais alterações irão controlar a expressão gênica por meio de diferentes mecanismos, como: metilação de DNA, modificações de histonas ou uma grande variedade de RNAs não codificantes (RNAnc) (JABLONKA; RAZ, 2009; JAENISCH; BIRD, 2003). A metilação do DNA é uma modificação pós-replicação em que há união covalente de um grupo metil a uma base citosina que, em mamíferos, possui uma guanina adjacente (CpG). Essa modificação pode impedir a união de fatores de transcrição, reprimindo a transcrição do *locus* (LAW; JACOBSEN, 2010). As histonas são complexos de proteínas que auxiliam na compactação do DNA e possuem extensões como caudas que podem ser modificadas pela adição de vários grupos químicos (metilação, acetilação, fosforilação e sumoilação) que irão ativar ou

reprimir a transcrição local (ZHOU; GOREN; BERNSTEIN, 2011). E finalmente os RNAnc (RNAs não-codificantes) são transcritos e recrutados na ativação ou repressão do complexo transcricional por meio da complementação de bases (TAFT et al., 2010).

O gameta masculino, por meio de mecanismos epigenéticos, pode ter papel importante no desenvolvimento fetal (NG et al., 2010; SOUBRY et al., 2013). Durante a espermiogênese, as espermátides passam por alterações para a compactação do material genético no interior do espermatozoide, como a substituição da maioria das histonas por outras proteínas menores, as protaminas (WOUTERS-TYROU et al., 1998). No entanto, 2 a 15% das histonas da cromatina espermática são mantidas e podem manter modificações que regulam a transcrição sendo importantes para expressão do zigoto no início do desenvolvimento (HAMMOUD et al., 2009). Fatores ambientais poderão comprometer as marcas epigenéticas que poderão afetar o desenvolvimento do embrião e conseqüentemente estádios mais tardios no filhote (YOUNGSON; WHITELAW, 2011). Componentes e moléculas do espermatozoide também são passadas durante a fecundação, entre elas os centrossomos, fatores de ativação de oócitos (SUTOVSKY; SCHATTEEN, 1999), e uma grande variedade de RNAs, sendo eles RNAm e RNAnc. Os RNAs encontrados parecem não ser apenas remanescentes da espermatogênese e podem ter efeito na fertilidade e na regulação do desenvolvimento embrionário (BOERKE; DIELEMAN; GADELLA, 2007; LI; ZHOU, 2012).

#### 1.4. *Imprinting* genômico

O *imprinting* genômico refere-se a um processo em que ocorre expressão gênica específica de acordo com a origem parental e é determinado por modificações epigenéticas. Sendo assim, um gene maternalmente *imprinted* é epigeneticamente alterado para evitar sua expressão, ou seja, somente a cópia paterna do gene estará sendo expressa no embrião, resultando em uma expressão monoalélica, e o contrário para um gene paternalmente *imprinted* (SWALES; SPEARS, 2005). Menos de 200 genes em mamíferos funcionam através de *imprinting* genômico (TIAN, 2014), poucos destes têm esse funcionamento em marsupiais e não

foram encontrados em mamíferos monotremados (WILKINS, 2005), indicando que o mecanismo evoluiu recentemente na maioria dos *loci* (CHEONG et al., 2015). Porém, apesar do *imprinting* genômico ser observado na maioria dos mamíferos, os genes com esse funcionamento podem diferenciar em cada espécie, por exemplo, de todos os genes *imprinted* em humanos e camundongos, somente 37 são *imprinted* nas duas espécies (TIAN, 2014).

Este processo é regulado diferentemente em cada gene, sendo que a maioria dos genes de *imprinting* se localizam agrupados, formando um domínio. O controle neste domínio ocorre através de uma ICR (região de controle de *imprinting*, do inglês *Imprinting Control Region*), em que somente um gene ou elemento genético carrega a marca epigenética primária, sendo então diretamente influenciado por esta. Os outros genes deste domínio tem sua expressão indiretamente dependente do status epigenético desta ICR. A principal característica das ICRs é que elas são diferencialmente metiladas de acordo com sua origem parental, ou seja, um gene de *imprinting* paterno, o qual é diretamente influenciado por uma ICR, apresentará esta região hipometilada no alelo materno e hipermetilada no alelo paterno, uma vez que a metilação nesta região funciona como um repressor de expressão gênica. Os outros genes de *imprinting* deste domínio podem apresentar DMRs (*Differentially Methylated Regions*, ou regiões diferencialmente metiladas) secundárias que irão determinar sua expressão individual, estas que podem ser influenciadas pelas ICRs. Nem todos os genes de *imprinting* se localizam em domínios, e neste caso, o controle de seu *imprinting* é somente determinado por DMRs sobrepostas à região promotora do gene (HANNA; KELSEY, 2014).

A metilação do DNA é considerada a característica principal envolvida neste processo, justificada pela sua estabilidade e associação a longos estados de silenciamento, estes que podem ser até mesmo definitivos, dessa forma atuando de maneira herdável para o desenvolvimento da prole e podendo influenciar até a maturidade (DUFFIÉ; BOURC'HIS, 2013). A enzima DNA metiltransferase é responsável pela metilação da citosina localizada a 5' de uma guanina (CpG), tornando o nucleotídeo uma 5-metilcitosina (5mC). A ocorrência de CpGs no genoma de vertebrados é rara, e geralmente aparece em grupos chamados "ilhas CpG" (ANTEQUERA; BIRD, 1993), definidas como uma região com no mínimo 200 pares de base, com uma proporção de guaninas ou citosinas maior que 50% e razão de maior que 0,6 de CpG observadas/esperadas (EDWARDS; FERGUSON-SMITH,

2007). A ação da metilação na progênie depende de um ciclo de reprogramação epigenética: durante o desenvolvimento das células germinativas no organismo em formação, o *imprinting* é apagado, processo evidenciado pela evidente desmetilação do DNA, e em estádios fetais avançados começa o ciclo de reestabelecimento das metilações, que irá continuar depois do nascimento do organismo e somente ficará completo com a plena maturação dos gametas (REIK; WALTER, 2001).

Há uma gama de técnicas descritas para avaliação de metilação no DNA, como pode ser verificado na revisão de CLARK et al. (2006), porém a técnica de sequenciamento do DNA tratado por bissulfito de sódio tornou-se um padrão desde que foi descrita pela primeira vez por FROMMER et al. (1992) e otimizada por CLARK et al. (1994). Ela foi desenvolvida com intuito de prover uma metodologia de sequenciamento de DNA que proporcionasse a identificação e localização de citosinas metiladas no DNA genômico. Baseia-se na conversão por bissulfito de sódio, em que ocorre a eliminação do grupo amina da citosina, convertendo-a então a uma uracila, o que não ocorre em citosinas metiladas. Posteriormente é feita uma bissulfito PCR (reação em cadeira polimerase) com este DNA modificado, em que as uracilas (citosinas convertidas) são lidas como timinas. Uma vez que a conversão por bissulfito ocorre somente em fitas únicas, que após a conversão deixam de ser complementares, a PCR é feita com *primers* específicos, sendo que cada par é endereçado a uma das fitas da região de interesse. Os produtos da bissulfito PCR podem ser diretamente sequenciados ou clonados e, em ambos os casos, o resultado do sequenciamento é alinhado com sua sequência de referência, em que não há conversão, possibilitando assim a identificação de timinas originárias de citosinas convertidas. Com sequenciamento direto é obtida uma média de metilação para cada sítio CpG (semi-quantitativa) e com a clonagem pode-se obter a metilação para cada CpG em uma única molécula (quantitativa) tornando possível observar heterogeneidade de metilação entre as amostras, porém esse tipo de análise demanda o sequenciamento de, no mínimo, 5 clones (CLARK et al., 2006; HERNÁNDEZ et al., 2013).

Genes com *imprinting* genômico estão envolvidos na regulação do crescimento fetal e embrionário, como também de várias funções placentárias, como seu crescimento e sistemas de transporte (genes *GTL2/MEG3*, *H19*, *KCNQ1OT1*, *SNRNP*, *PLAGL1*, *TP73*, entre outros - FROST; MOORE, 2010; REIK et al., 2003; SATO et al., 2011). Distúrbios de *imprinting* causados por epimutações já foram

correlacionados com doenças humanas como as Síndromes de Angelmann e Beckwith-Wiedemann (YOUNG et al., 2001) (ARNAUD; FEIL, 2005; GIRARDOT; FEIL; LLÈRES, 2013) e Síndrome da Prole Grande em ovelhas (em inglês: *large offspring syndrome*) (YOUNG et al., 2001). Acredita-se que mudanças de padrão de metilação em genes de *imprinting* causadas por procedimentos de reprodução assistida sejam as responsáveis pela alta incidência de tais síndromes em animais e humanos concebidos através desta tecnologia (PAOLONI-GIACOBINO; CHAILLET, 2004).

O gene *PEG3* (*paternally expressed gene 3*) foi o primeiro gene de funcionamento *imprinting* encontrado na região proximal do cromossomo 7 de camundongos (KUROIWA et al., 1996). Sua expressão é materna e se localiza em um grande domínio com mais 6 genes de *imprinting* genômico (THIAVILLE et al., 2013). Mudanças em seu padrão de metilação em espermatozoides já foram correlacionadas com infertilidade em humanos: o estudo de KOBAYASHI et al. (2007) encontrou casos de metilação na *DMR* deste gene em homens com oligospermia moderada e severa. Ele também está envolvido na regulação da temperatura corporal, obesidade e cuidado materno em camundongos (CHIAVEGATTO et al., 2012; CURLEY et al., 2004; LI, 1999).

O gene *PEG1/MEST* (*mesoderm-specific transcript*) é um gene de *imprinting* materno que é expresso abundantemente em embriões precoces e que também é especificamente expresso em tecidos mesodérmicos (KOBAYASHI et al., 1997). Como em *PEG3*, foram encontradas relações entre diferença de metilação e problemas relacionados à fertilidade, um exemplo é a correlação entre hipermetilação de *DMRs* do gene *PEG1/MEST* com baixa contagem, baixa motilidade e alta incidência de morfologias anormais em espermatozoides de homens com infertilidade idiopática (POPLINSKI et al., 2009). E também hipometilação do gene em oócitos em crescimento de mulheres inférteis tratadas com tecnologias de reprodução assistida (SATO et al., 2006).

Devido à influência desses dois genes, *PEG3* e *PEG1/MEST* sobre características reprodutivas em humanos, eles se tornam candidatos para uma investigação inicial de metilação e reprodução em micos-leão-de-cara-dourada.

### **1.5. Justificativa**

Além dos fatores seminais que podem estar correlacionados com a fertilidade dos animais, existem ainda fatores associados com a expressão dos genes (epigenéticos) que podem alterar características seminais influenciando diretamente o sêmen, como também em como as informações genéticas estão sendo transmitidas para a formação do embrião. Não obstante, em humanos e em animais de produção, técnicas de reprodução assistida estão sendo associadas com doenças epigenéticas. Logo, entender estes fatores relacionados à reprodução, além de fornecer informações importantes referentes à espécie, podem auxiliar em futuras pesquisas em reprodução assistida e biotecnologias de reprodução.

## 2. Objetivos

O trabalho teve como objetivo geral investigar parâmetros reprodutivos seminais e moleculares do gameta masculino de mico-leão-de-cara-dourada potencialmente envolvidos no sucesso reprodutivo.

Os objetivos específicos foram:

- Obter um panorama geral do perfil seminal de mico-leão-de-cara-dourada;
- Verificar diferenças seminais entre grupos distintos do primata: novos e idosos;
- Verificar a influência das variáveis peso e coeficiente de endogamia (F) sobre parâmetros seminais;
- Fazer um estudo inicial de fatores epigenéticos que possam estar envolvidos no *imprinting* genômico dos genes *PEG3* e *PEG1/MEST*.

### **3. Material e Métodos**

Todos os procedimentos utilizados no presente trabalho seguiram os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (n° 059/2013 - Anexo A) e foram regulamentados pelo IBAMA (SISBIO n° 41976-1 – Anexo B).

#### **3.1. Animais**

Para o presente estudo foram amostrados machos de mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP).

#### **3.2. Local de estudo e manejo alimentar**

Os animais eram mantidos tanto em recinto de exposição, quanto em recintos chamados de micários, estes localizados no setor extra. Os ambientes são semiabertos, permitindo a entrada de luz natural e exposição às mudanças climáticas da FPZSP, ainda assim oferecendo abrigo. A FPZSP localiza-se no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), um remanescente de Mata Atlântica do município de São Paulo (SP, Brasil), que apesar de representar de maneira geral o bioma natural da espécie, Mata Atlântica, apresenta fitofisionomias diferentes do habitat natural.

A alimentação disponibilizada para os animais era balanceada, e a dieta supervisionada pelo Setor de Alimentação Animal/FPZSP, responsável pela adequação da dieta frente aos hábitos e necessidades nutricionais das espécies.

### 3.3. Delineamento amostral

Para a escolha dos animais foi feito um levantamento das fichas dos micos-leões-de-cara-dourada atualmente mantidos na FPZSP, e destes foram levantadas fichas de seus ascendentes até o primeiro animal a ser mantido na instituição. Com os registros foi possível a compilação de dados relevantes acerca de idade, origem (cativeiro ou silvestre), grau de parentesco, recintos e manejo, possibilitando assim a construção de uma genealogia com o auxílio do programa *GenoPro 2011 v. 5.4*. (Disponível em <http://www.genopro.com>). Para a designação dos genitores foi feita uma suposição por formação de família, uma vez que os Callitrichidae se organizam em grupos familiares em que geralmente somente o casal dominante se reproduz por meio da supressão da reprodução entre os indivíduos subordinados (EAZA, 2010), sendo que no gênero *Leontopithecus* tal supressão ocorre por meio de comportamentos agressivos da fêmea dominante sobre as fêmeas subordinadas (KLEIMAN, 1979).

Após a construção da genealogia foi possível fazer o cálculo de coeficiente de endogamia por *pedigree* (F) com o programa *Pedigree Viewer* versão 6.5b (KINGHORN, 1994). Foram selecionados 12 machos sexualmente maduros para a investigação de parâmetros reprodutivos seminais e moleculares do gameta masculino. Esses animais foram divididos em dois grupos principais: **idosos** (idade média de 148,17 meses; n=6) e **novos** (idade média de 50,17 meses; n=6). Vale ressaltar que essa seleção foi baseada em dados da genealogia, informações reprodutivas, origem dos animais (cativeiro ou vida livre) e coeficiente de endogamia por *pedigree*.

### 3.4. Colheita de sêmen

A colheita de sêmen foi feita por meio de vibroestimulação peniana, procedimento que oferece diversas vantagens frente à colheita de sêmen por eletroejaculação, uma vez que não necessita de contenção química (anestesia) e

oferece sêmen de melhor qualidade (SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004; YEOMAN et al., 1998). O vibrador peniano pessoal para uso humano FERTI CARE®personal (Multicept, Copenhagen, Dinamarca) foi adaptado com um pequeno tubo de borracha em que foi acoplado um tubo de vidro cilíndrico com bordas arredondadas (32 mm de comprimento, 7 mm de diâmetro e 1 mm de espessura) com intuito de servir como uma vagina artificial, proporcionando assim os estímulos vibratórios (KUEDERLING et al., 2000; VALLE et al., 2008).

Os procedimentos foram realizadas no período da manhã, entre os meses de julho a setembro. Os animais foram retirados de seus respectivos recintos, pesados e levados para a sala de procedimentos veterinários, onde foram fisicamente contidos por um médico veterinário da FPZSP com o auxílio de uma toalha. O pênis e a região perianal foram lavados com água morna e secos com gases esterilizadas. O animal foi então posicionado sobre a mesa e suas pernas foram mantidas delicadamente abertas, expondo a região genital, permitindo o contato do aparato com a região a ser estimulada, como pode ser observado na **Figura 1**.



**Figura 1.** Mico-leão-de-cara-dourada durante procedimento de vibroestimulação peniana (Foto: Patrícia Bacher, 15/08/2014).

O ciclo de estimulação seguiu-se com dois minutos de estímulos e 30 segundos de intervalo até que a ejaculação ocorresse. Os estímulos iniciavam-se com 1,0 mm de amplitude e 70 Hz de frequência, sendo que a frequência era gradualmente

aumentada até no máximo 85 Hz. O procedimento respeitou o limite máximo de 20 minutos de estímulos, e caso não ocorresse a ejaculação, o procedimento somente era repetido com o mesmo animal após, no mínimo, 15 dias de intervalo. Durante os procedimentos foram oferecidas larvas de tenébrio (*Tenebrio molitor*), criados e mantidos na própria FPZSP, como recompensa alimentar.

A ejaculação ocorria dentro do tubo de vidro cilíndrico, dessa forma um volume pré-estipulado de meio diluidor (300 µL de meio BWW com 5% de acetilcisteína) foi utilizado para lavagem do tubo para colher a maior quantidade possível de espermatozoides. A solução contendo o sêmen (coágulo espermático e a fração líquida do sêmen) e o diluidor foi então realocada para um microtubo de 1,5 mL (previamente autoclavado e pesado). Este foi incubado em banho-maria a 37°C por meia hora com intuito de dissolver parcialmente o coágulo espermático.

Após a incubação foram feitas alíquotas:

- **Alíquota A:** Parte da fração líquida espermática separada para as análises seminais, mantida a 37°C em banho seco;
- **Alíquota B:** Parte da fração líquida espermática separada para as análises moleculares, armazenada em *RNA holder* (BioAgency Biotecnologia, Brasil) na proporção 1:5, incubada por dois dias a -2°C e depois alocada para freezer -80°C;
- **Alíquota C:** Coágulo espermático separado para análises moleculares, armazenada como a alíquota B.

### **3.5. Avaliação Seminal**

Para estas avaliações foi utilizada a **alíquota A** descrita no tópico “Colheita de sêmen”.

O **volume** de ejaculado foi medido pesando-se os microtubos antes e depois da adição de sêmen diluído. Dessa forma, foi subtraído do peso final o valor inicial e o peso da solução diluidora levando-se em consideração 1 µL de solução equivalente a 1 µg (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O valor de **pH** foi aferido com fita medidora de pH (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) diretamente na glândula do pênis, após a ejaculação.

### 3.5.1. Concentração espermática

A quantificação das células espermáticas foi realizada em câmara de contagem celular (câmara Neubauer espelhada). Para a contagem foi utilizada uma alíquota de 10 µL de sêmen diluído preparada com 90 µL de solução de formol a 10% em solução fisiológica. Foram adicionados 10 µL da mistura em cada grade de contagem e foram contados cinco quadrantes de cada lado com auxílio de microscópio em aumento de 400X.

O cálculo de concentração espermática deu-se pela seguinte fórmula:

$$\frac{SPZ}{2} \times 5 \times \frac{10}{mm^3} \times FT = \frac{SPZ}{mm^3} = \frac{SPZ}{\mu L}$$

Em que:

SPZ = somatória dos espermatozoides contados nas duas grades

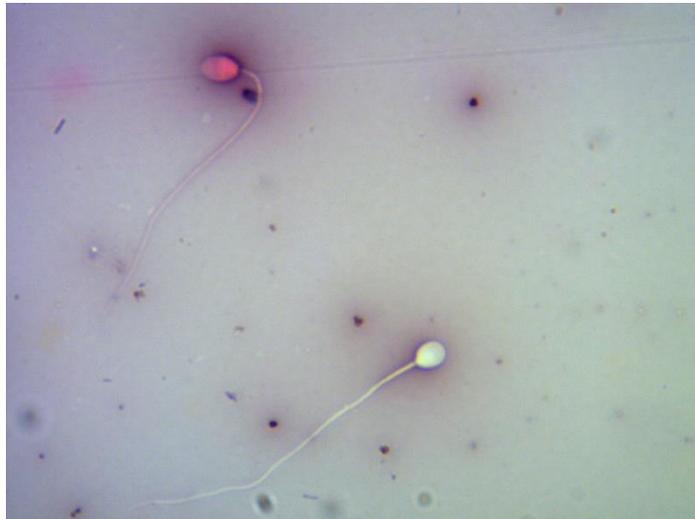
FT = fator de diluição, calculado como  $FT = \frac{Vol(diluidor+ejaculado)}{volumedoejaculado} \times 10$

### 3.5.2. Motilidade

A motilidade espermática foi avaliada em lâmina. Para cada ejaculado foi preparada uma lâmina (mantida a 37°C para se evitar choque térmico) com 10 µL do sêmen diluído. Em um campo de visão de microscópio em aumento de 400X foi atribuída uma porcentagem a cada ejaculado, de acordo com espermatozoides móveis e espermatozoides com motilidade progressiva rápida e retilínea.

### 3.5.3. Análise de integridade de membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática do gameta masculino foi utilizada a coloração Eosina-Nigrosina (1%) em 5 µL do sêmen diluído. A partir de dois esfregaços, secos à temperatura ambiente, foi realizada a leitura das lâminas, no mesmo dia, com auxílio de microscópio (1000x, sob imersão em óleo). Foram feitas duas contagens de 100 espermatozoides – classificados em íntegros (sem coloração) e não-íntegros (coloração rósea), como visto na **Figura 2**.



**Figura 2.** Espermatozoides após esfregaço com coloração Eosina-Nigrosina (1%). Célula corada: membrana plasmática danificada; célula não corada: membrana plasmática íntegra. Aumento 1000X. (Foto: Paloma Arakaki, 15/10/2014).

### 3.5.4. Análise de integridade de acrossoma

Para a análise de integridade de membrana acrossomal foi utilizada a técnica de coloração simples de acrossoma (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991), validada para *Callithrix jacchus* (VALLE et al., 2008) e para *L. chrysomelas* (em preparação, Valle, R. del Rio).

Em um microtubo âmbar foram adicionados 5 µL da solução de sêmen com diluidor e 5 µL da solução corante, e o homogeneizado incubado a 37°C por 120 segundos. Foram feitos dois esfregaços, cada um com 5 µL da mistura, que depois de secos à temperatura ambiente, foram analisados sob imersão em óleo com aumento de 1000X em microscópio. Foram feitas duas contagens e averiguações de 100 células – espermatozoides com acrossoma íntegro apresentam a região acrossomal mais escura, enquanto aqueles com acrossoma danificado apresentam essa região com coloração não destoante do restante da célula.

### **3.6. Procedimentos moleculares**

#### **3.6.1. Identificação de DMRs putativas**

O primata mais próximo de *L. chrysomelas* com genoma sequenciado até o momento, é o sagui-de-tufo-branco, *Callithrix jacchus* (WORLEY et al., 2014), ambos são pertencentes da subfamília Callitrichinae (HARRIS et al., 2014). No entanto, não existem descrições de DMRs para genes nessa espécie, tampouco para *L. chrysomelas*. Assim, para a busca de tais regiões, a identificação foi inferida de DMRs descritas em humanos, principalmente baseadas em KOBAYASHI et al. (2007).

As sequências dos genes *PEG3* e *PEG1/MEST* foram obtidas no banco de dados da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (GEER et al., 2010), disponíveis para humanos e *C. jacchus*. Utilizando as sequências dos genes e de suas respectivas DMRs em humanos, localizamos por meio da ferramenta *Megablast* (MCGINNIS; MADDEN, 2004) as sequências DMR putativas utilizando o genoma de *C. jacchus* como referência. As regiões putativas em *C. jacchus* foram então analisadas no programa *MethPrimer* disponível em <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi> (LI; DAHIYA, 2002). Esse programa permitiu identificar ilhas CpG através da ferramenta “*CpG Island Prediction*” e gerar *primers* para amplificação de DNA convertido por bissulfito dos genes candidatos.

### 3.6.2. Desenho de primers

Uma vez que para as análises de metilação é necessário ter sequências de referências (não convertidas), foram sintetizados para cada região de interesse dois conjuntos de *primers* – um para a amplificação sem conversão por bissulfito, outro para amplificação de produtos convertidos (estes elaborados pelo *software MethPrimer* descrito no tópico anterior). Todos os *primers* foram analisados pela plataforma *OligoAnalyzer 3.1* (disponível em <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) e foram sintetizados pela mesma empresa.

### 3.6.3. Extração de DNA

As amostras de sêmen denominadas “**Alíquotas B**” (fração líquida + *RNA holder*) foram descongeladas à temperatura ambiente e seguiu-se protocolo de extração de DNA de sêmen previamente publicado por (WEYRICH, 2012) com algumas modificações. Uma vez que o protocolo citado foi desenvolvido para amostras congeladas em palhetas e nossas amostras foram armazenadas em microtubos contendo *RNA holder*, a primeira centrifugação foi feita com intuito de se separar os espermatozoides da solução de armazenamento, a partir disso foram feitas as duas lavagens com etanol 70%, como indicado no protocolo; a precipitação do DNA foi feita por duas horas no freezer -80°C com solução de Acetato de Amônio 5M (1/10 do volume), etanol absoluto (2X o volume) e 1 µL glicogênio azure (20mg/mL); e, finalmente o DNA foi ressuscitado com 50 µL de água ultrapura.

Cada amostra de DNA genômico foi quantificada com o kit *Qubit dsDNA HS assay* (*Life Technologies*, EUA) no fluorômetro *Qubit*, e a qualidade verificada em espectrofotômetro *Nanovue* (*GE Healthcare Life Sciences*, EUA).

#### **3.6.4. Conversão por bissulfito de sódio**

A conversão das amostras de DNA genômico por bissulfito de sódio foi feita com o kit *MethylEdge™ Bisulfite Conversion System* (Promega, EUA) seguindo instruções do fabricante. Para cada amostra foi feita uma conversão com 500ng de DNA genômico iniciais e, ao fim do processo, o DNA convertido foi eluído em 20 µL de *ME Elution Buffer*, sendo que cada amostra convertida foi dividida em quatro microtubos de PCR em alíquotas de 5 µL. Estes foram identificados, embalados em papel alumínio para evitar incidência de luz e armazenados em caixas opacas em freezer -20°C.

#### **3.6.5. Reação em cadeia polimerase (PCR)**

##### **a) DNA não convertido**

Foi feita somente amplificação de uma amostra não convertida para cada região de interesse com intuito de se utilizá-la como referência para análise de metilação. As duas regiões foram amplificadas com as mesmas condições de reação (H<sub>2</sub>O; 1X *High Fidelity PCR buffer*, MgSO<sub>4</sub> (2,0mM); BSA (0,01µg/µL); dNTP (0,2mM cada); DMSO (5%) e *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (1U) (*Invitrogen, Life Technologies*, EUA). Em microtubos foram adicionados individualmente os primers *forward e reverse* (0,2µM) e o DNA (50ng).

A ciclagem para cada reação constituiu-se de 90 segundos a 95°C (desnaturação inicial); 35 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos com T<sub>m</sub> específica, 30 segundos a 68°C; extensão final por 3 minutos a 68°C e finalizando com 4°C contínuos.

Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio com utilização de marcador de peso molecular *Gene Ruler 100bp DNA Ladder* (*Life Technologies*, USA).

## b) DNA convertido

A amplificação de DNA convertido por bissulfito de sódio foi realizada após descongelamento da alíquota a 2°C evitando-se a incidência de luz sobre as amostras. Procurou-se utilizar cada alíquota para todas as análises, uma vez que o descongelamento-congelamento não é recomendado devido ao fato do DNA convertido ser muito instável por sua conformação em fita única.

Sendo assim, para cada alíquota foram feitas 3 PCRs com os *primers* abaixo listados (BC: *primer* para DNA convertido; e NC: *primer* para DNA não convertido):

- Amplificação com *primers* para DNA convertido: PEG1.BC
- Amplificação com *primers* para DNA convertido: PEG3.BC
- Amplificação controle: *primers* para sequências não convertidas, com reação e ciclos termais otimizados para PEG1.NC (descritos no subitem PCR – DNA não convertido).

A concentração de cada alíquota de DNA convertido foi verificada em espectrofotômetro *Nanovue*.

As reações foram otimizadas com as seguintes condições para um volume final de 25 µL: H<sub>2</sub>O; 1X *High Fidelity PCR Buffer*, dNTP (0,25 mM cada); MgSO<sub>4</sub> (2,0 mM); glicerol (1%); BSA (1mg/mL); *Platinum® Taq DNA High Fidelity Polymerase* (1U), *primer Left* e *primer Right* (0,25 µM cada) e DNA convertido.

A ciclagem para cada reação constitui de 90 segundos a 95°C (desnaturação inicial); 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos em T<sub>m</sub> específico e 120 segundos a 68°C; 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos em T<sub>m</sub> específica e 90 segundos a 68°C; extensão final por 4 minutos a 68°C, e finalmente 4°C contínuos.

A qualidade da PCR foi verificada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

As amostras foram purificadas utilizando PEG 8000 (Polietilenoglicol) (LIS; SCHLEIF, 1975) em uma solução de PEG 8000 (20%) e NaCl (2,5 M) padronizada para precipitar produtos com mais de 200 pares de base. Os produtos

pós-purificação foram quantificados mediante a utilização do espectrofotômetro *Nanovue*.

### **3.6.6. Clonagem e transformação dos fragmentos**

Os fragmentos das PCR foram ligados ao vetor *pTZ57R/T* do kit comercial *InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, EUA)* seguindo recomendações do fabricante.

A mistura de ligação foi utilizada para transformar a bactéria *E. coli DH5 $\alpha$*  por choque térmico. Alíquotas de bactérias competentes foram descongeladas em gelo, e para cada transformação foi feita uma mistura em microtubo com 7,5  $\mu$ L de reação de ligação e 20  $\mu$ L de solução de bactérias competentes. A mistura foi homogeneizada e incubada em gelo por 10 minutos e, logo após, transferida para banho-maria a 42°C por 25 segundos. A reação foi então novamente incubada em gelo por 5 minutos e 500 $\mu$ L de *C-Medium* (do próprio Kit de ligação) foram adicionados para a mistura ser incubada por 1 hora em termobloco a 37°C. Os microtubos foram então centrifugados a 3.000 rpm por 2 minutos e 400 $\mu$ L do sobrenadante foram descartados. Cada reação de transformação foi utilizada para plaquear duas placas de meio LB sólido (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e ágar 1,5%). Estas foram vedadas e incubadas por 18 horas em estufa a 37°C.

### **3.6.7. Amplificação por PCR do plasmídeo presente na bactéria**

Foram coletadas oito colônias de cada transformação que foram fervidas e utilizadas para amplificação com *primers M13*.

Cada reação foi feita com H<sub>2</sub>O, *1X High Fidelity PCR Buffer*, MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM); dNTP (0,2 mM cada); *primer M13 forward* e *reverse* (0,2  $\mu$ M cada); *taq polymerase Fermentas (Life Technologies, EUA)*; e 3  $\mu$ L de colônia fervida. A ciclagem

foi de 1 minuto a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 45 segundos a 72°C; e finalizando com 10 minutos a 72°C.

Foi verificado o sucesso da PCR e tamanho do fragmento em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com utilização de marcador de peso molecular *Gene Ruler 1kb DNA Ladder* (Life Technologies, USA).

### **3.6.8. Sequenciamento**

Para análise do grau de metilação foram enviados os produtos das PCR dos clones para sequenciamento na empresa *Macrogen* (Seul, Coréia do Sul). Para cada região não convertida foi enviada uma amostra da região denominada **PEG3** e outra da região denominada *PEG1*. Para cada amostra de PCR bissulfito foram sequenciados cinco (5) clones independentes.

### **3.6.9. Análise dos resultados de sequenciamento**

As sequências geradas no sequenciamento foram observadas manualmente e analisadas com o programa *BioEdit* versão 7.2.5 (HALL, 1999), em que foram retiradas as sequências de plasmídeos e verificada a qualidade. As sequências de referência foram submetidas a uma busca no *NCBI Genomes* através do mecanismo “*search*” do software *Geneious v.8.0.4* (KEARSE et al., 2012), dessa forma elas foram comparadas com sequências já anotadas.

### 3.6.10. Análise de metilação das regiões estudadas

Com auxílio da ferramenta *BISMA* do software *BDPC* (ROHDE et al., 2010), as sequências de sequenciamento bissulfito foram analisadas utilizando os seguintes critérios:

- Mínimo limiar de taxa de conversão: 80%
- Mínimo limiar de identidade de sequência: 90%
- Máximo limiar de n-sites em posições de citosinas: 20%
- Máximo limiar de inserções/deleções: 20%

Sequências que não atendiam a estes critérios foram excluídas da análise.

Com o resultado foi possível identificar o *status* de metilação para cada CpG, o aparecimento de citosinas (não localizadas em CpG) não convertidas, a incidência de citosinas em locais não esperados e a média de metilação para cada CpG analisada.

Com as ferramentas *Compilation* e *Clustering* do software *BDPC*, previamente indicado, foi possível compilar os dados para melhor analisá-los e verificar diferenças de metilação da mesma região entre diferentes amostras.

### 3.6.11. Análise estatística

Verificamos se os dados referentes aos parâmetro seminais obedeciam aos critérios de Distribuição Normal através do teste de *Shapiro-Wilk*. Fizemos análise de correlação entre os parâmetros avaliados através do teste de correlação de *Spearman*, uma vez que nem todos os parâmetros apresentavam distribuição normal. O *test t* de *student* bicaudal foi empregado para comparar os resultados dos parâmetros entre os dois grupos principais (idosos e novos). A análise de influência

dos peso e F (coeficiente de endogamia por *pedigree*) também foi feita através do teste de correlação de *Spearman*. Todas as análises foram feitas no programa *GraphPad Prism* v. 6.01 (*GraphPad Software*, San Diego Califórnia USA). Valores de  $p > 0,05$  não foram considerados significativos.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Delineamento amostral

A partir de 101 fichas dos animais oriundas da FPZSP, foi possível construir a genealogia de micos-leões-de-cara-dourada que compõem a população da Fundação (**Anexo C**). Três indivíduos não possuem informações sobre seus pais, sendo então alocados fora do diagrama – 30.169, 30.224 e 30.225. Dois indivíduos nasceram em vida livre e foram transferidos para cativeiro após serem apreendidos sob posse ilegal – 29.430 e 29.695. Tais indivíduos tiveram sua idade mínima estimada:

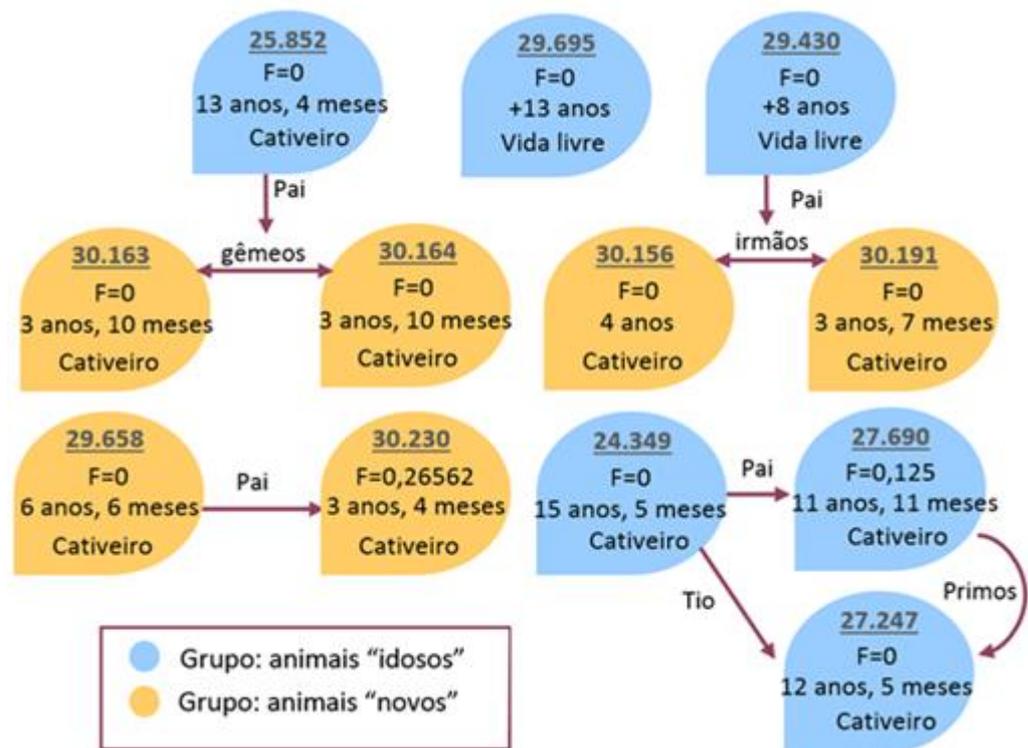
- Animal 29.430 – entrada na FPZSP em 15/02/2007, sendo que em 30/10/2007 seus filhotes nasceram. Existem evidências de que machos de mico-leão-de-cara-dourada se tornem fisiologicamente férteis aos 15 meses (DE VLEESCHOUWER; VAN ELSACKER; LEUS, 2001) e o tempo de gestação geralmente é de 125 dias (FRENCH; PISSINATTI; COIMBRA-FILHO, 1996), sendo assim, calculamos a idade desse indivíduo como +8 anos.
- Animal 29.695 – entrada no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) em 15/12/2000, sua idade foi estimada em +13 anos.

Com as informações de família foi possível obter o coeficiente de endogamia por *pedigree* (F), e somente dois indivíduos apresentaram coeficiente diferente de 0, sendo eles: 30.230 (F=0,26562) e 27.690 (F=0,125).

O pequeno número de machos vivos com coeficiente de endogamia diferente de zero pode ser explicado pelo fato do heredograma ter sido baseado somente nos dados dos animais da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Uma vez que a história de manejo populacional desses primatas em cativeiro se iniciou nos anos 1970 (KLEIMAN; MALLINSON, 1998), perdemos informações mais detalhadas sobre os primeiros fundadores. A falta de informações sobre esses indivíduos, conjuntamente com ausência de dados sobre a ascendência de alguns indivíduos comprometeu a análise, dado que para esta averiguação, indivíduos sem informações

sobre seus genitores são considerados como “fundadores”. Em programas de manutenção de populações em cativeiro, estes seriam equivalentes a indivíduos de vida-livre, ou de outros programas de reprodução, desde que não correlacionados – assume-se que “fundadores” tenham possibilidade maior de ter alelos únicos ou raros, proporcionando assim alto fitness para a população (LACY, 2012). Dessa forma, os valores de F encontrados para os animais amostrados foram subestimados, o que explicaria a ocorrência de somente dois indivíduos com valores diferentes de zero. Essa ocorrência poderia ser reparada com a análise do *studbook* internacional da espécie, onde estão descritos a origem (vida livre ou cativeiro), progenitores, além de outras informações sobre os micos-leões (LUDWIG; GALBUSERA, 2011) – frisando que compreende informações de indivíduos desde a primeira edição do documento, em 1987 (KLEIMAN; MALLINSON, 1998). Os *studbooks* são documentos que compilam todas as informações relevantes à população cativa de uma certa espécie, estas são coletadas e continuamente atualizadas. No entanto, a detenção deste documento é restrita a entidades e instituições mantenedoras de espécies em cativeiro, tornando seu acesso restrito.

Apesar de termos acesso às fichas de natimortos e abortos ocorrentes desde o ano 2000, algumas fichas se encontravam com poucas informações sobre tais ocorrências. Somado a isso, algumas fichas de fêmeas descreviam partos e a identificação de sua prole, porém muitas vezes essas informações estavam desconstruídas, impossibilitando assim, uma avaliação acurada sobre o sucesso e/ou insucesso reprodutivo dos animais viventes. Apesar das dificuldades encontradas na análise das informações derivadas das fichas dos animais, foi possível selecionar 12 animais para o presente estudo, levando em consideração a genealogia, origem dos animais (cativeiro ou vida livre) e coeficiente de F por *pedigree*. Estes foram divididos em dois grandes grupos: “novos” e “idosos (**Figura 3**).



**Figura 3.** Animais da FPZSP selecionados para amostragem, evidenciando a identificação dos animais (ID), o valor de F, a idade, a origem e o parentesco entre eles.

#### 4.2. Colheita de sêmen

O protocolo de colheita de sêmen foi eficaz para onze dos animais designados - estes ejacularam no primeiro procedimento. A frequência em que os animais ejacularam variou entre 70 e 85 Hz. A ejaculação ocorreu, em média, em 13 minutos de procedimento. Os animais foram pesados antes do procedimento e o peso foi em média 714,1 g (**Tabela 1**).

O animal 29.695 (vida livre, com idade estimada em +13 anos) não ejaculou no primeiro procedimento. Um novo procedimento foi realizado 35 dias após o primeiro, e novamente não ocorreu ejaculação após vinte minutos de estímulos. O animal apresentava alopecia e parecia apático, logo decidiu-se por não submetê-lo a novos procedimentos. Há relatos de ausência de ejaculação em outros primatas neotropicais, mesmo quando os indivíduos foram submetidos a novas tentativas de colheitas. No estudo de TAKABAYASHI, SUZUKI e KATOH (2015) dois machos de

*Callithrix jacchus* não ejacularam, mesmo após três procedimentos. No caso de *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1998), três indivíduos não ejacularam durante a vibroestimulação e apresentavam grande agitação, uma vez que dois destes já haviam apresentado respostas positivas ao procedimento, acredita-se que o estado emocional dos animais possa ter interferido no sucesso do protocolo. O indivíduo 29.695 apresentava apatia, alopecia e se encontrava em uma idade mais avançada em relação aos outros animais amostrados, dessa forma mais estudos devem ser empregados para se investigar possíveis causas de falhas do protocolo de colheita de sêmen em mico-leão-de-cara-dourada.

A taxa de sucesso do procedimento de colheita de sêmen foi de 84,61%, sendo que todos os ejaculados apresentavam espermatozoides. A colheita de sêmen já foi realizada em *L. chrysomelas* com a técnica de eletroejaculação (VIDAL et al., 2007) e neste caso, o sucesso foi de 100%. Porém, YEOMAN et al. (1998) comparando os dois procedimentos em *Saimiri boliviensis* elucidou que a colheita por vibroestimulação leva a um ejaculado com maior volume e mais espermatozoides totais, e estes apresentaram maior taxa de motilidade, quando comparados à eletroejaculação. Adicionalmente, o procedimento utilizado neste projeto não necessita de anestesia, o que é considerado um fator de risco no outro procedimento (SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004).

O protocolo de vibroestimulação peniana tem sido usado para colheita de sêmen em *L. chrysomelas* pelo grupo do Prof. Dr. Rodrigo do Valle (SANTOS et al., 2014; Valle, RR em preparação) e sua eficácia já havia sido verificada em outros primatas, como *Callithrix jacchus*, com sucesso variando de 82,2 a 89,2% (ARAKAKI, 2013; SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004; TAKABAYASHI; SUZUKI; KATOH, 2015; VALLE et al., 2014) e *Saimiri boliviensis*, com 80% de sucesso (YEOMAN et al., 1998).

#### **4.3. Avaliação seminal**

O ejaculado de micos-leão-de-cara-dourada, assim como o da maioria dos primatas, forma um coágulo durante ou após a ejaculação, podendo dificultar a

avaliação do sêmen (VALLE, 2002). Nas colheitas do presente estudo, os coágulos espermáticos não foram completamente dissolvidos mesmo após a incubação em banho-maria a 37°C, mas não impediu a avaliação dos parâmetros seminais. Neste caso, somente foi feita a avaliação espermática da fração líquida enriquecida com os espermatozoides liberados do coágulo por meio da incubação. Este procedimento já foi realizado com *C. jacchus* e *S. boliviensis* (CUI et al., 1991; YEOMAN et al., 1998), em que os coágulos não dissolvidos foram descartados das análises.

Os parâmetros seminais avaliados estão representados na Tabela 1, em que são mostrados os valores individuais para cada análise, a média e erro padrão da média para cada grupo (novos e idosos) e a média e erro padrão da média considerando todos os animais.

**Tabela 1.** Peso e parâmetros seminais avaliados em machos de mico-leão-de-cara-dourada

Grupos	ID	Peso (G)	Tempo (M)	pH	Volume (µL)	Motilidade total (%)	Motilidade progressiva retilínea (%)	Concentração (SPZ/mL)	Integridade da Membrana Plasmática (%)	Integridade do acrossoma (%)
Novos	30.230	<b>635</b>	18	7,2	69	<b>10</b>	<b>2</b>	2,19x10 <sup>8</sup>	<b>57</b>	56
	30.191	670	13	7,2	97	40	20	1,07x10 <sup>8</sup>	82	<b>51</b>
	30.164	<b>635</b>	<b>4</b>	7,2	84	70	40	1,13x10 <sup>8</sup>	85,5	94,5
	30.163	700	7	<b>7</b>	67	<b>90</b>	50	<b>3,89x10<sup>8</sup></b>	84	85
	29.658	720	10	<b>7</b>	55	75	60	1,29x10 <sup>8</sup>	87,5	93,5
	30.156	665	14	7,4	61	80	70	3,60x10 <sup>8</sup>	88,5	<b>97</b>
	<b>Média ± EP/grupo</b>	670,83 ± 13,98	11 ± 2,06	7,16 ± 0,06*	72,17 ± 6,36	60,83 ± 12,27	40,33 ± 10,4	2,20x10 <sup>8</sup> ± 5,18x10 <sup>7</sup>	80,75 ± 4,85	79,5 ± 8,41
Idosos	24.349	750	<b>22</b>	7,4	61	50	30	2,37x10 <sup>8</sup>	70,5	88,5
	27.690	665	13	<b>7,8</b>	96	80	50	<b>1,01x10<sup>8</sup></b>	86,5	96,5
	25.852	720	20	7,2	<b>44</b>	<b>90</b>	70	3,67x10 <sup>8</sup>	77	95,5
	27.247	<b>995</b>	7	7,4	<b>98</b>	<b>90</b>	70	1,14x10 <sup>8</sup>	<b>96,5</b>	95,5
	29.430	700	15	7,4	50	<b>90</b>	<b>80</b>	1,02x10 <sup>8</sup>	77,5	93
	<b>Média ± EP/grupo</b>	766 ± 58,89	15,4 ± 2,66	7,44 ± 0,1*	69,8 ± 11,44	80 ± 7,75	60 ± 8,94	1,41x10 <sup>8</sup> ± 5,87x10 <sup>7</sup>	81,6 ± 4,51	93,8 ± 1,45
<b>Média ± EP/Geral</b>	714,09 ± 30,14	13 ± 1,71	7,29 ± 0,06	71,09 ± 5,91	69,55 ± 7,82	49,27 ± 7,32	1,84x10 <sup>8</sup> ± 3,88x10 <sup>7</sup>	81,14 ± 3,18	86 ± 4,97	

ID refere-se a identificação do animal; Peso refere-se ao peso do animal no dia da colheita; Tempo refere-se ao intervalo desde o início do procedimento até a ejaculação; pH e volume refere-se ao pH e volume do ejaculado, respectivamente; Concentração medida em SPZ/mL, sendo que SPZ refere-se a espermatozoides; Asterisco (\*) refere-se a diferença significativa entre grupos ( $p < 0.05$ ). Valores em negrito indicam os valores mínimos e máximos em cada análise, levando em consideração todos os animais.

Comparando os parâmetros avaliados em *L. chrysomelas* com sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) (VALLE et al., 2014) e sagui-do-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) (ARAKAKI, 2013), o mico-leão-de-cara-dourada apresenta valores médio para os parâmetros: pH menor (7,53 em *C. penicillata* e 7,6 em *C. jacchus*), volume seminal maior (16,83  $\mu\text{L}$  em *C. penicillata*, e 29,59  $\mu\text{L}$  em *C. jacchus*), e valores de motilidade total e progressiva retilínea, além de porcentagem de integridade membrana plasmática e acrossômica maiores que em *C. penicillata* (56,67; 41,67; 62,83 e 76,67% respectivamente) e menores que em *C. jacchus* (82,7; 76,3; 84,7 e 84,6% respectivamente). A concentração espermática em *L. chrysomelas* aparentou ser menor comparada com os outros saguis, sendo que *C. penicillata* apresentou concentração média de  $1473,85 \times 10^6$  espermatozoides por mililitro e *C. jacchus*,  $1062,59 \times 10^6$  espermatozoides por mililitro.

A principal característica encontrada para os parâmetros avaliados foi a grande variação individual para os parâmetros analisados, isto também foi observado nas colheitas dos primatas citados acima. O estudo anterior de CUI et al. (1991) realizado com *C. jacchus* indicou que além de variação interindividuais foram encontradas variações intraindividuais quando analisados vários ejaculados do mesmo indivíduo, frisando assim a importância de se analisar várias amostras de um mesmo indivíduo para se ter um panorama seminal mais acurado.

Para analisarmos correlação entre os parâmetros seminais verificamos se estas obedeciam ao padrão de Distribuição Normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Nem todas apresentavam esta distribuição, de forma que as variáveis espermáticas foram analisadas para correlação através do teste de Spearman (análise não-paramétrica). Foram encontradas correlações positivas entre:

- Motilidade progressiva retilínea e motilidade total:  $R=0,859$ ,  $p=0,001$
- Motilidade progressiva retilínea e integridade de acrossoma:  $R=0,631$ ,  $p=0,041$
- Integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma:  $R=0,629$  e  $p=0,042$

E correlações negativas entre:

- pH e concentração espermática:  $R = -0,612$  e  $p = 0,029$

A correlação positiva encontrada entre motilidade progressiva retilínea e motilidade total, e também com integridade de acrossoma; e a correlação positiva entre integridade de acrossoma e integridade de membrana plasmática, indicam que estas avaliações conjuntamente podem oferecer pistas sobre a qualidade espermática. De acordo com GRAHAM (1990) a correlação entre fertilidade e motilidade dos espermatozoides é muito baixa, porém quando este parâmetro é utilizado associado com informações sobre integridade de acrossoma, viabilidade e atividade mitocondrial, a associação com fertilidade se torna mais forte. Uma vez que é necessário espermatozoides móveis, viáveis e com acrossoma intacto para que ocorra fecundação, ejaculados que possuem tais características com valores elevados podem oferecer maior percentual de fertilidade (BIRKHEAD; HOSKEN; PITNICK, 2008).

Também foi encontrada correlação negativa entre o pH e a concentração espermática, de forma em que maior concentração espermática é encontrada em pH mais ácido, diferentemente do que foi encontrado por VALLE (2007) na avaliação de sêmen de *Callithrix jacchus*, em que a correlação encontrada foi positiva. As diferentes relações entre pH e concentração espermática apresentadas pelas duas espécies de primatas neotropicais precisa ser investigada, ressaltando que, apesar de serem primatas pertencentes a mesma subfamília, existem diferenças no tipo e também na formação do coágulo espermático, este que é influenciado pela composição do plasma seminal.

#### **4.3.1. Diferenças seminais entre grupos**

Apesar de verificarmos diferenças entre os parâmetros avaliados entre grupos de animais novos e idosos, essa diferença somente foi significativa para o parâmetro pH ( $t(9) = 2,45$ ,  $p = 0,04$ ), em que os machos idosos apresentam pH mais

básico do que os machos novos. De acordo com o manual “Análise e processamento de sêmen humano” da *WORLD HEALTH ORGANIZATION* (2010) o pH seminal é resultado do balanço do pH das secreções da vesícula seminal (alcalino) e da próstata (ácido), existe então a possibilidade de variação na proporção de secreções no sêmen entre os diferentes grupos. VALLE (2007) encontrou associação entre pH ácidos com maiores detecções de defeitos em características seminais negativamente associadas a fertilidade (defeitos maiores e de cauda fortemente dobrada) no sêmen de sagui-de-tufo-branco. No entanto nossos dados não permitem corroborar essa associação e também não permitem inferir que os animais novos apresentariam maiores problemas com fertilidade. Essa diferença não foi encontrada em bugios-pretos no sêmen colhido por eletroejaculação, cuja idade variou de 5 anos (novos) a 8 anos (velhos) (CARVALHO et al., 2014), porém as diferenças de idade foram menores que as amostradas neste trabalho.

#### 4.3.2. Variáveis Peso e Coeficiente de Endogamia (F) e suas relações com parâmetros seminais

A partir da análise de correlação de Spearman também foi possível verificar a influência das variáveis peso e F (coeficiente de endogamia por *Pedigree*) sobre os parâmetros seminais.

A variável peso não se correlacionou com nenhum dos parâmetros seminais, porém foi encontrada correlação com a idade dos animais ( $R=0,716$ ,  $p=0,017$ ). O estudo comparativo de machos de *C. jacchus* em cativeiro e em vida-livre verificou um aumento progressivo de peso nos animais de acordo com seu estágio de maturidade: filhote, juvenil, subadulto e adulto (ARAÚJO et al., 2000), além disso acredita-se que o peso se estabilize aos dois anos, quando o sagui-de-tufo-branco se torna adulto e depois decaia em idades avançadas (POWER et al., 2001; TARDIF et al., 2003). Todos os machos de mico-leão-de-cara-dourada avaliados neste projeto são considerados adultos, e existe a possibilidade de que, diferentemente do sagui, o acúmulo de massa corpórea acompanhe o envelhecimento destes animais.

Apesar de somente dois indivíduos terem coeficiente de endogamia por *pedigree* (F) diferente de zero, foi possível encontrar correlação negativa entre esta variável e as variáveis:

- Motilidade total:  $R = -0,380$ ,  $p < 0,001$
- Motilidade progressiva retilínea:  $R = -0,443$ ,  $p < 0,001$
- Integridade de membrana plasmática:  $R = -0,270$ ,  $p = 0,018$

Em outras espécies em que foram confrontados dados de endogamia e aspectos seminais também foram encontradas tais correlações, como por exemplo no trabalho de MALO et al. (2010) em que uma aumento de 0,03 em F se traduziu na redução de 30% da motilidade espermática em camundongos da espécie *Peromyscus leucopus noveboracensis*. O estudo com gazelas *Gazella cuvieri* apontou correlação negativa entre a endogamia (também medida através de *pedigree*) e outros parâmetros como: volume, motilidade total e progressiva, morfologia normal e integridade de acrossoma (ROLDAN et al., 1998). Existe possibilidade que a endogamia tenha levado a um aumento da frequência de alelos deletérios, dessa forma influenciando a qualidade seminal, esta que pode influenciar negativamente a reprodução de animais com alto valor de endogamia. Porém, apesar de haver relatos na literatura sobre a influência da endogamia em medidas seminais, o que corrobora a análise de correlação, esta deve ser vista com cautela. Uma vez que de 11 indivíduos, somente 2 apresentavam coeficiente de endogamia por *pedigree* (F) diferente de zero, a correlação somente analisou três valores: 0; 0,2656 (indivíduo 30.230) e 0,125 (indivíduo 27.690) – o que enfraquece a análise. O presente estudo pode indicar uma possível influência da variável endogamia sobre estes parâmetros seminais, e estudos com maior número amostral devem ser feitos no intuito de obter uma estimativa mais confiável de como esta variável pode influenciar a qualidade espermática. Vale ressaltar que esse coeficiente pode estar subestimado, pois não foi possível utilizar os dados dos animais do *studbook*.

Quanto aos parâmetros reprodutivos seminais investigados aqui em *Leontopithecus chrysomelas*, podemos verificar que o procedimento de colheita de sêmen se mostrou eficaz para obtenção de ejaculados de mico-leão-de-cara-dourada, com uma taxa de sucesso de 84,61%, valor aproximado com o de outros primatas não

humanos que foram colhidos por meio desta técnica. Em média, o sêmen obtido apresentou boa qualidade, com valores de volume, integridade de membrana plasmática (viabilidade), motilidade total e progressiva retilínea e integridade de acrossoma condizentes com outros primatas neotropicais. Não foram encontradas diferenças significativas, além do pH seminal, entre os diferentes grupos de idade, sugerindo, que no ponto de vista prático, não há diferenças seminais que poderiam impedir indivíduos mais velhos de serem usados na obtenção de gametas para utilização em biotécnicas reprodutivas. O peso parece também não interferir nestes parâmetros. Um indicativo de efeito negativo do cativeiro poderia ser sugerido pelas correlações negativas entre coeficiente de endogamia e parâmetros seminais, porém o baixo número amostral requer cautela para predições. O indivíduo 30.230 é filho de irmãos, e apresenta o maior coeficiente de F (**Figura 3**), e os piores desempenhos espermáticos, diferindo drasticamente dos outros animais (**Tabela 1**), indicando a necessidade de cautela no manejo destes animais para evitar que indivíduos nesta situação se reproduzam.

Sendo assim, foi possível obter um panorama inicial de parâmetros seminais de *L. chrysomelas* e verificar a influência de variáveis sobre estes parâmetros, informações que podem contribuir para entender fatores reprodutivos da espécie.

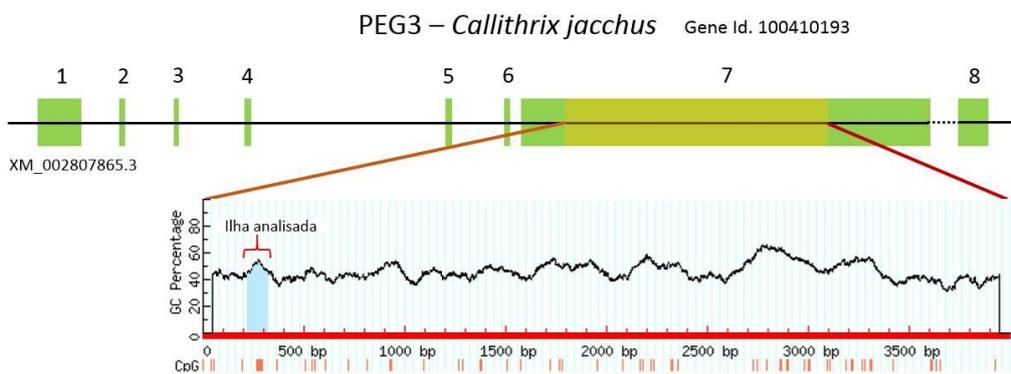
#### **4.4. Procedimentos moleculares**

##### **4.4.1. Identificação de DMRs putativas e desenho de primers**

###### **a) PEG3**

A DMR do gene *PEG3* em humanos descrita por KOBAYASHI et al. (2007) localiza-se na porção inicial do gene, e foi observado que há uma DMR conservada entre humanos, camundongos e bovinos proximalmente do primeiro éxon

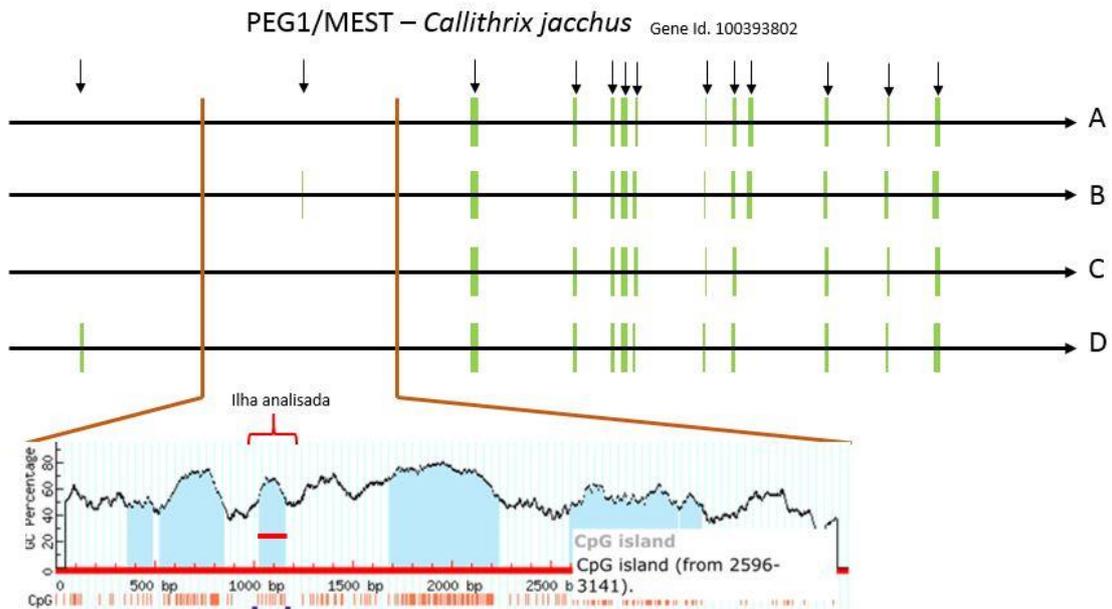
de *PEG3* (HUANG; KIM, 2009). Logo, identificamos o gene *PEG3* descrito em *Callithrix jacchus* (Gene Id.100410193) anotado no banco de dados *NCBI*. Com a sequência do gene em mãos utilizamos a ferramenta *CpG Island Prediction*, do programa *MethPrimer*, iniciando a busca do começo ao fim do gene, uma vez que o programa tem um limite de análise de sequências de no máximo 4000 pares de base. Não foram identificadas ilhas CpG do início do gene, porém uma ilha foi encontrada no interior do éxon 7, como pode ser visto na **Figura 4**.



**Figura 4.** Gene *PEG3* descrito em *C. jacchus*, com éxons indicados em retângulos verdes, a parte pontilhada indica região com nucleotídeos desconhecidos. No éxon 7, a parte em amarelo indica a sequência analisada pelo software *MethPrimer* (ferramenta *CpG Island Prediction*). A imagem abaixo da sequência indica o resultado gerado pelo software, em que a parte azul é uma ilha CpG. Neste caso, essa foi a região analisada no projeto.

## b) *PEG1/MEST*

A *DMR* deste gene em humanos também localiza-se na porção inicial do gene - cerca de 6000 pares de base após o início (gene com ~20kb). Utilizamos a ferramenta *BLAST* para procurar a *DMR* de humanos no genoma de *C. jacchus*, e encontramos similaridade com região também localizada na porção inicial de *PEG1/MEST* (Gene Id. 100393802) deste primata. O software *MethPrimer* identificou uma grande ilha CpG localizada nesta região de interesse, porém devido a fragmentação de DNA após a conversão por bissulfito, amplificar regiões com mais de 300 pares de base se torna um grande desafio, que no presente momento seria inviável. Desse modo, escolhemos para este projeto uma ilha CpG menor, *upstream* da ilha de interesse, como visto na **Figura 5**:



**Figura 5.** Esquema representativo do gene **PEG1/MEST** em *C. jacchus*. Os quatro esquemas indicam diferentes combinações de regiões codificadoras para o mesmo gene – estas indicadas pelos traços em verde. Acima da imagem, as flechas indicam as localizações delas. A região flanqueada por traços marrons indica a região analisada pelo software *CpG Island Prediction*, e as partes azuis denotam ilhas CpG previstas e aquela com traço vermelho, a ilha analisada no presente estudo. Legenda das sequências: **A** com CDS das sequências XM\_009003068, XM\_009003069, XM\_009003071.1 e XM\_009003073.1; **B** com XM\_002752021.3; **C** com XM\_009003070.1 e XM\_009003075.1; e finalmente **D** com XM\_009003074.1.

### c) Desenho de *primers* para análise das ilhas CpG inferidas

Utilizamos dois conjuntos de *primers* para analisar cada ilha CpG inferida, um conjunto para utilização em PCR bissulfito, estes desenhados pelo programa *Methprimer*, outro conjunto, desenhados manualmente para sequências não convertidas, de forma a flanquear a ilha CpG inferida. Todos os *primers* utilizados podem ser verificados na **Tabela 2**.

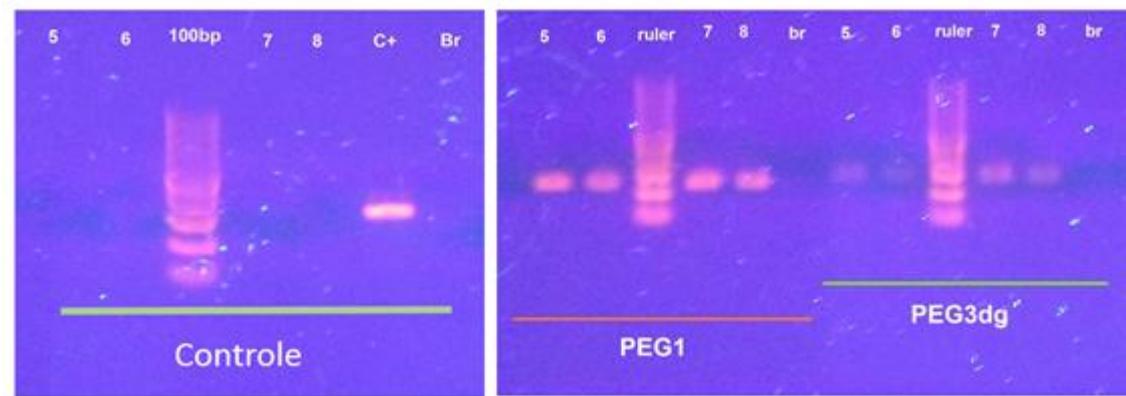
**Tabela 2.** *Primers* para PCR normal e PCR bissulfito para os genes *PEG3* e *PEG1/MEST*

Nome	Amostra	Direção	Primer	Tm
PEG3.NC.A	DNA genômico	Forward	GAAGCCTTCATGCCTAGC	53°C
PEG3.NC.B	DNA genômico	Reverse	GTTTCCTCACACACTTTACCC	
PEG3.BC.C	DNA convertido	Left	AGTTTTAGAAAATTTATGGTAAAGATAAAT	47,1°C
PEG3.BC.D	DNA convertido	Right	TCTTTCAAAAATAAACTATAAAAAA	
PEG1.NC.C	DNA genômico	Forward	CTCCCTCTTTCTTGTGCCTC	50,3°C
PEG1.NC.B	DNA genômico	Reverse	GTAACAGATTCATGGATGACC	
PEG1.BC.A	DNA convertido	Left	GTTTTTGGGTGTTTGTATTGTGAT	60°C
PEG1.BC.B	DNA convertido	Right	AAATTACACAAAATCCAATTTCTCC	

NC seguido ao nome do gene refere-se ao primer associado ao DNA não convertido e BC ao convertido por bissulfito de sódio.

#### 4.4.2. Extração de DNA, conversão por bissulfito e PCR

A extração de DNA seguindo o protocolo mencionado foi bem sucedida, com um valor médio de 52,67 ng/μL por fração líquida extraída. O processo de conversão por bissulfito também foi bem sucedido, e as ampliações das amostras de referência e das amostras convertidas foram otimizadas, tanto quanto à composição dos reagentes e ciclagem, quanto em relação às temperatura de anelamento. Foram feitas PCR controle com as amostras convertidas, de modo em que as amostras convertidas por bissulfito foram amplificadas com *primers* e protocolo de PCR de amostras não convertidas – todas não amplificaram, indicando a eficiência da conversão (**Figura 6**).



**Figura 6.** Imagens de eletroforeses em gel 1% corados com brometo de etídio com amostras das seguintes PCRs: na esquerda, ausência de amplificação das amostras controle, em que **Br** indica o branco, e **C+** indica o controle positivo (DNA não convertido). Na direita, as mesmas amostras convertidas por bissulfito (numeradas de 5 a 8) amplificadas com *primers* específicos, **Br** indica o branco da PCR.

#### 4.4.3. Análise de sequenciamento

Tanto as sequências de PCR normal (para referência), quanto as sequências de bissulfito PCR tiveram as regiões flangeadoras originária dos plasmídeos retiradas e então, foram verificadas. Submetemos as sequências de referência a uma busca por similaridades no banco de dados *NCBI genomes* com a ferramenta *BLASTn* disponível no software *Geneious*.

##### a) PEG3

Nossa sequência amplificada de *Leontopithecus chrysomelas* teve alta similaridade (>90% de identidade) com sequências já depositadas de outros primatas, sendo que na maioria dos casos, ela correspondia ao gene *PEG3*, porém em casos específicos, houve correlação com o gene *ZIM2* (*zinc finger, imprinted 2*). A **Tabela 3** apresenta somente dados de quatro dos primatas encontrados: *Saimiri boliviensis* com a sequência de maior identidade; *Callithrix jacchus*, cujo gene foi usado como referência; *Macaca fascicularis* e *Homo sapiens*, nos quais a sequência correspondeu ao gene *ZIM2*, e no último, tanto ao gene *ZIM2*, quanto ao gene *PEG3*.

**Tabela 3.** Genes identificados pela busca da sequência amplificada de *PEG3* (*L. chrysomelas*)

ORGANISMO	GENE (ID)	IDENTIDADE (%)	<i>Expected Value</i>	Nº DE ACESSO
<i>Saimiri boliviensis</i>	<i>PEG3</i> (101041957)	95,7	$4,23 \times 10^{-145}$	NW_003943802
<i>Macaca fascicularis</i>	<i>ZIM2</i> (102127237)	94,7	$1,69 \times 10^{-137}$	NC_022290
<i>Callithrix jacchus</i>	<i>PEG3</i> (100410193)	94,3	$1,80 \times 10^{-143}$	NC_013917
<i>Homo sapiens</i>	<i>PEG3</i> (5178) <i>ZIM2</i> (23619)	91,6	$5,51 \times 10^{-131}$	NC_018930

#### b) PEG1/MEST

A sequência amplificada de *Leontopithecus chrysomelas* teve alta similaridade com sequências de *PEG1/MEST* de diversos primatas, sendo os com maior identidade *Aotus nancymaae* (94,5% de identidade, *expected value*= $1,47 \times 10^{-98}$ , número de acesso: NW\_012184646) e *Callithrix jacchus* (93,7% de identidade, *expected value*= $7,59 \times 10^{-96}$ , número de acesso: NC\_013903).

#### 4.4.4. Análise de metilação

Analisamos o grau de metilação de cada região amplificada com o ferramenta *BISMA* do software *BDPC*, em que cinco sequências foram alinhadas com a sequência de referência para cada animal amostrado. O software identificou todos os sítios CpGs localizados na sequência de referência e à partir desta verificou o grau de metilação para cada um destes sítios nas sequências alinhadas. Também foi possível estimar a porcentagem de conversão à partir de citosinas não convertidas localizadas fora de posição CpG. O grau de metilação de cada sítio CpG foi feito através das médias das cinco sequências (**Figura 7**).

Sequence_id	0	0
Reference	TTTATGAGTGTAGGGTGTGTAAGGAAACGTTTTTTTATAGTTT	
7.PEG3.1	TTTATGAGTGTAGGGTGTGTAAGGAAACGTTTTTTTATAGTTT	
7.PEG3.2	TTTATGAGTGTAGGGTGTGTAAGGAAACGTTTTTTTATAGTTT	
7.PEG3.3_ANTIGO	TTTATGAGTGTAGGGTGTGTAAGGAAACGTTTTTTTATAGTTT	
7.PEG3.4_ANTIGO	TTTATGAGTGTAGGGTGTGTAAGGAAACGTTTTTTTATAGTTT	
7.PEG3.6	TTTATGAGTGTAGGGTGTGTAAGGAAACGTTTTTTTATAGTTT	

methyated CpG position
unmethyated CpG position
unconverted cytosine
cytosine at unexpected position

**Figura 7.** Alinhamento das 5 sequências de PCR-bissulfito para a região *PEG3* do animal 27.690 (indicado pelo número 7) com a sequência de referência. No caso está sendo mostrado o primeiro sítio CG da sequência, que é considerado como 100% metilado, uma vez que em todas as sequências não houve conversão da citosina.

A ferramenta “*Compilation*” do mesmo *software* permitiu converter todas as informações geradas pelas análises iniciais em um único diagrama para cada região estudada (**Figura 8**).



**Figura 8.** Médias de metilação por animal amostrado para cada sítio CpG (indicado pelos números) das regiões *PEG1/MEST* à esquerda e *PEG3* na direita. A escala de cor indica a porcentagem de metilação destes sítios.

A ferramenta *Clustering* foi utilizada, porém, apesar de haver pequenas diferenças de metilação em alguns sítios CpG, todas as amostras de cada região apresentaram hipometilação, no caso de *PEG1/MEST* e hipermetilação, no caso de *PEG3*, indicando que não houve diferenças entre elas.

#### 4.5. Análise de metilação dos genes *PEG3* e *PEG1/MEST*

As regiões estudadas se mostraram muito homogêneas entre as amostras. Todos os animais amostrados apresentaram a *DMR* putativa de *PEG3*

hipermetilada e a *DMR* putativa de *PEG1/MEST* hipometilada, apesar de alguns sítios CpG indicarem variação mínima de metilação (**Figura 8**).

Tal resultado indica que o padrão epigenético está sendo mantido, mesmo considerando indivíduos com características diferentes, como: 30.230 que nesta amostragem apresentou sêmen com qualidade inferior (**Tabela 1**) e tem o coeficiente de endogamia mais alto ( $F=0,265$ ); e 29.430, nascido na natureza.

O gene *PEG3* (*paternally expressed gene 3*) foi o primeiro gene de funcionamento *imprinting* encontrado em camundongos (KUROIWA et al., 1996), subsequentemente foram encontrados mais 6 genes de funcionamento *imprinting* na região denominada domínio *PEG3*: três deles são paternalmente expressos (*USP29*, *Zfp64* e *APeg3*) e três maternalmente expressos (*Zim1*, *Zim2* e *Zim3*) (THIAVILLE et al., 2013).

HUANG e KIM (2009) fizeram um estudo comparativo do domínio contrastando a região em humanos, camundongos e bovinos. E apesar de diferenças espécie específicas, como a quantidade de ilhas CpG, localização destas, diferentes *DMRs* e pequenas mudanças na composição dos genes do local, foi sugerido que uma *DMR* localizada proximalmente ao primeiro éxon de *PEG3* é bem conservada, pois apresentou padrões de metilação igual nos animais estudados. Dessa forma, procuramos ilhas CpG na região do início do gene *PEG3*, porém não foi possível encontra-las através do programa *MethPrimer*.

A única ilha CpG encontrada se localiza no éxon 7 do gene em *Callithrix jacchus*, ou seja, não em uma região promotora. Não foram encontrados relatos de análise de metilação em tal região exônica de *PEG3* em outros animais, porém estudos têm sido feitos para compreender o caráter desta marca dentro dos genes. SINGER et al. (2015) verificaram que a metilação dentro de éxons se correlaciona positivamente com expressão gênica, e MAUNAKEA et al. (2013) que a metilação pode estar envolvida em *splicing* alternativo. É pouco provável que a ilha CpG analisada dentro deste gene atue diretamente no *imprinting* genômico, mas pode indicar que este gene tem potencial de se expressar após a fecundação.

CHEONG et al. (2015) ao analisar várias *DMRs* putativas de genes de *imprinting* em *Macaca fascicularis*, entre eles uma de *PEG3*, a encontrou não metilada, tanto em oócitos, quanto em espermatozoides, contrariamente do que foi encontrado em outros mamíferos (HUANG; KIM, 2009). Foi sugerido então, que existe

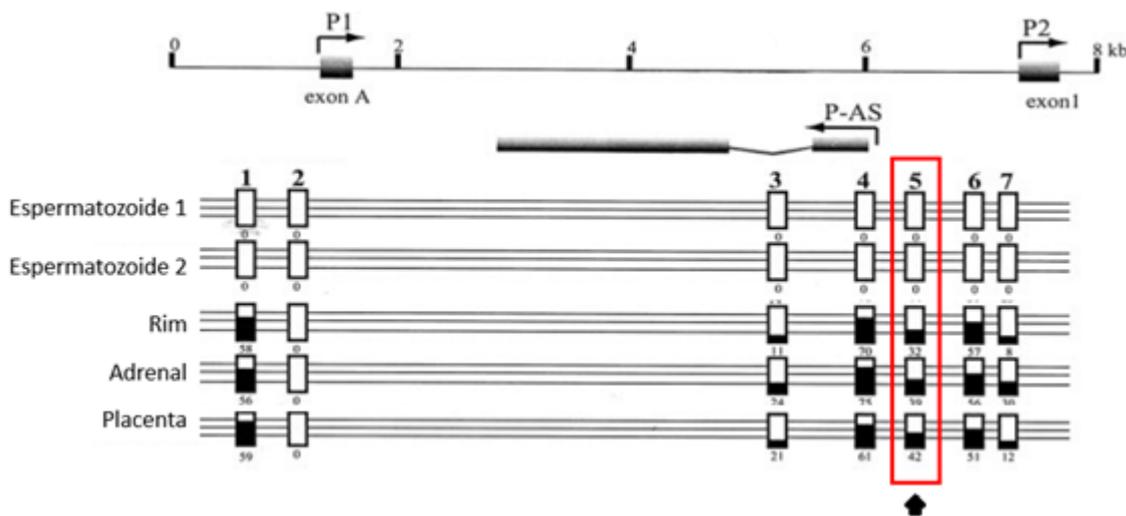
a possibilidade do *imprinting* deste genes ser adquirido após a fertilização, uma vez que foi encontrada expressão diferencial em tecidos somáticos do mesmo primata.

A complexidade da região também pode ser verificada pelo resultado da busca de similaridades entre a sequência de referência amplificada de *L. chrysomelas* com sequências de outros primatas. Encontramos similaridade com a sequência de *C. jacchus* utilizada para construir os *primers*, como também de outros primatas, a maioria indicando regiões do gene *PEG3*. Porém a similaridade com humanos indicou que a sequência se correspondia tanto ao gene *PEG3*, quanto ao gene *ZIM2* (*zinc finger imprinted 2*), e a similaridade com *Macaca fascicularis*, somente ao gene *ZIM2*. A comparação do domínio *PEG3* entre camundongos e diferentes primatas indicou a perda do gene *ZIM1*, presente em camundongos, e a aproximação de *ZIM2* de *PEG3*, sendo que em humanos e em chimpanzés os dois genes se sobrepuseram (KIM et al., 2004). Em humanos os dois genes dividem 7 éxons, sendo que o *splicing* alternativo é responsável pela transcrição diferencial desses genes (KIM; BERGMANN; STUBBS, 2000).

Apesar de existir a possibilidade de que a *DMR* dita conservada se encontre a *upstream* do início do gene de *C. jacchus* anotado no *NCBI*, devemos considerar a complexidade da região em que o gene *PEG3* se encontra, dessa forma outras investigações deverão ser empregadas para podermos verificar o funcionamento/composição do domínio, e neste caso, o estudo deverá ser empregado não em *L. chrysomelas*, mas em *C. jacchus*, cuja existência do genoma permite a averiguação da região.

O gene *PEG1/MEST* (*mesoderm-specific transcript*) é um gene de *imprinting* materno que é expresso abundantemente em embriões precoces e que também é especificamente expresso em tecidos mesodérmicos (KOBAYASHI et al., 1997). Em humanos foram reportadas duas regiões promotoras do gene, *P1* e *P2*, localizadas nos éxons *A* e *1*, respectivamente (**Figura 9**). Cada promotor controla a transcrição de diferentes isoformas, sendo que o promotor *P1* é responsável pelas isoforma 2, e o promotor *P2* pelas isoforma 1. Somente a isoforma 1 do gene tem funcionamento *imprinting*, cuja expressão materna é reprimida pela metilação de *P2*; a isoforma 2 tem expressão bialélica (KOSAKI et al., 2000). Entre os promotores *P1* e *P2* foi encontrado *PEG1-AS* (*anti-sense*), cujo transcrito foi encontrado abundantemente em espermatozoides e testículos, indicando um papel importante

tanto na fisiologia seminal, quanto na fertilização. Este gene também tem funcionamento *imprinting* e, como *PEG3*, sua expressão é paterna. Com a descoberta deste novo transcrito foram feitas buscas pela identificação de sua região promotora, e foi verificado que este gene divide com *PEG1* (isoforma 1) a região promotora, esta que se encontra altamente hipometilada em espermatozoides, e apresenta metilação dividida em outros órgãos (LI et al., 2002) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Esquema representativo dos promotores de transcrição de *PEG1/MEST* e *PEG1As* em humanos. *P1* indica a região promotora da isoforma 2; *P2* promotor da isoforma 1, que tem expressão monoalélica; e *P-As* a região promotora de *PEG1-As*, também com expressão monoalélica. Abaixo os quadrados indicam o grau de metilação de cada região em diferentes órgãos. Quadrados brancos indicam ausência de metilação, e quadrados parcialmente pretos se referem ao grau de metilação encontrado em cada órgão. Em vermelho, a região em que foi encontrada similaridade com a sequência de *L. chrysomelas*. Figura modificada de (LI et al., 2002a).

Quando utilizamos a ferramenta *BLASTn* com a sequência de referência para a *DMR* putativa de *PEG1/MEST* de *L. chrysomelas* amplificada sem conversão por bissulfito, encontramos correspondência com o mesmo gene em diversos primatas, entre eles humanos. Ao verificar as *DMRs* localizadas na região promotora (*P2*) analisadas por LI et al., (2002) em humanos, verificamos que a sequência analisada em *L. chrysomelas* se alinhava justamente nesta região, e uma vez que na análise de metilação todas as amostras apresentaram hipometilação, este poderia ser um indício de que nossa sequência seja uma *DMR* em micos.

Contudo, para se identificar uma *DMR* envolvida em *imprinting* é necessário verificar que a metilação na região aparece somente em um alelo parental, identificar em qual gene ou qual sequência regulatória esta metilação está ligada e

também entender quando ocorre a metilação do local (BARLOW; BARTOLOMEI, 2014).

Existe a possibilidade de verificar a expressão diferencial desta região ao analisar diferentes tecidos de mico-leão-de-cara-dourada, porém, em exceção de falecimento natural, a utilização de indivíduos para este tipo de pesquisa é extremamente restrito devido ao fato deste animal estar ameaçado de extinção.

Uma vez que há relatos de epimutações nas regiões promotoras do gene *PEG1/MEST* estarem correlacionadas com oligospermia idiopática em humanos (KOBAYASHI et al., 2007; MONTJEAN et al., 2013) e com alta incidência de doenças de *imprinting* em humanos concebidos através de reprodução assistida (HIURA et al., 2012; MANIPALVIRATN; DECHERNEY; SEGARS, 2009), o que se supõe ser causado pelas técnicas de cultivo de gametas, como no caso a sua criopreservação (NICKKHOLGH et al., 2014). Padrões de metilação de DNA anormais no gameta masculino também tem sido associados à não continuidade de gestação em mulheres (BENCHAIB, 2005), evidenciando o papel de genes de *imprinting* no sucesso reprodutivo. A análise de metilação da região analisada (*PEG1/MEST*), uma vez confirmada se tratar de uma *DMR*, poderá ser utilizada como marcador para verificar casos de insucesso reprodutivo dos animais em cativeiro, ou além disso, verificar efeitos de técnicas de cultivo celular visando reprodução assistida.

Entender o efeito de aspectos epigenéticos envolvidos nos gametas masculinos de mico-leão-de-cara-dourada pode ser um dos fatores chave para a viabilidade da reprodução dessas populações em cativeiro. A partir dessas informações poderemos investigar se esses fatores podem também estar associados a ausência de sucesso reprodutivo em outras espécies de *Leontopithecus sp.*, além de desenvolver marcadores que poderão ser utilizados em biotécnicas da reprodução.

## 5. Conclusão

Encontramos uma grande variabilidade interindividual nos parâmetros seminais analisados, características já verificadas em outros primatas neotropicais. Verificamos a influência de diferentes fatores sobre a qualidade espermática, como o peso individual, a idade e o coeficiente de endogamia por *pedigree*. O peso dos animais indicou não interferir nestes parâmetros, diferentemente dos outros fatores. No caso da idade, verificamos uma diferença significativa no pH seminal entre os grupos “novos” e “idosos”, porém não há indicativos que tal característica possa interferir na fertilidade. Encontramos correlação negativa entre o coeficiente de endogamia por *pedigree* e motilidade total, motilidade progressiva retilínea e integridade de membrana plasmática, sugerindo a possibilidade de aumento da frequência de alelos deletérios que estejam influenciando negativamente tais parâmetros.

Realizamos também um estudo inicial com os genes de *imprinting* *PEG3* e *PEG1/MEST*. Encontramos ilhas CpG destes genes que se mostraram hipermetiladas no caso de *PEG3* e hipometiladas em *PEG1/MEST*, porém não foram encontradas diferenças de metilação entre os indivíduos. A ilha CpG do gene *PEG3* se localiza numa região exônica, e pouco provavelmente tem papel direto no *imprinting* do gene, porém a ilha CpG do gene *PEG1/MEST* se mostrou completamente hipometilada, e se alinha com a região promotora deste gene em humanos, sugerindo ser uma possível *DMR* atuante no *imprinting* do gene em mico-leão-de-cara-dourada.

Sendo assim, o presente estudo possibilitou a visualização de um panorama geral dos parâmetros seminais de mico-leão-de-cara-dourada, e também a identificação de focos para estudos futuros visando o entendimento de variáveis que possam estar influenciando a fertilidade na espécie. Além disso, se a ilha CpG do gene *PEG1/MEST* for comprovada como *DMR*, esta poderá ser utilizada como marcador molecular de possíveis interferências negativas de biotécnicas da reprodução. O conjunto destas informações terão um papel fundamental na conservação de espécies do gênero *Leontopithecus*, uma vez que a utilização de biotécnicas reprodutivas será uma grande aliada na manutenção de populações geneticamente saudáveis.

## 6. Referências bibliográficas

ALGER, K.; CALDAS, M. The declining cocoa economy and the Atlantic Forest of Southern Bahia, Brazil: Conservation attitudes of cocoa planters. **The Environmentalist**, v. 14, n. 2, p. 107–119, jun. 1994.

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 3-4, p. 223–243, jun. 2007.

ANTEQUERA, F.; BIRD, A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11995–11999, 15 dez. 1993.

ARAKAKI, P. R. **Avaliação de duas concentrações de glicerol na criopreservação do sêmen de duas espécies de primatas neotropicais**. dissertação de mestrado—São Paulo: USP, 2013.

ARAÚJO, A. et al. Body Weight of Wild and Captive Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). **International Journal of Primatology**, v. 21, n. 2, p. 317–324, abr. 2000.

ASA, C. et al. Relationship of inbreeding with sperm quality and reproductive success in Mexican gray wolves. **Animal Conservation**, v. 10, n. 3, p. 326–331, ago. 2007.

BALLOU, J. D.; LACY, R. C. Identifying Genetically Important Individuals for Management of Genetic Variation in Pedigreed Populations. **Population Management for Survival and Recovery: Analytical Methods and Strategies in Small Population Conservation**, p. 76, 1995.

BARLOW, D. P.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic Imprinting in Mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 2, p. a018382–a018382, 1 fev. 2014.

BENCHAIB, M. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. **Human Reproduction**, v. 20, n. 3, p. 768–773, 2 fev. 2005.

BIRKHEAD, T. R.; HOSKEN, D. J.; PITNICK, S. S. **Sperm Biology: An Evolutionary Perspective**. [s.l.] Academic Press, 2008.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S. J.; GADELLA, B. M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, v. 68, p. S147–S155, set. 2007.

CARVALHO, F. M. et al. Evaluation of sperm quality in successive regular collections from captive black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*). **Animal Reproduction**, v. 11, p. 11–18, 2014.

CHEONG, C. Y. et al. Germline and somatic imprinting in the nonhuman primate highlights species differences in oocyte methylation. **Genome Research**, v. 25, n. 5, p. 611–623, maio 2015.

CHIAVEGATTO, S. et al. Hypothalamic expression of *Peg3* gene is associated with maternal care differences between SM/J and LG/J mouse strains: Maternal Care and *Peg3* Variation. **Brain and Behavior**, v. 2, n. 4, p. 365–376, jul. 2012.

CLARK, S. J. et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 15, p. 2990–2997, 1994.

CLARK, S. J. et al. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2353–2364, dez. 2006.

CUI, K. H. et al. Collection and analysis of semen from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Andrology**, v. 12, n. 3, p. 214–220, jun. 1991.

CURLEY, J. P. et al. Coadaptation in mother and infant regulated by a paternally expressed imprinted gene. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 271, n. 1545, p. 1303–1309, 22 jun. 2004.

DE VLEESCHOUWER, K.; VAN ELSACKER, L.; LEUS, K. Multiple Breeding Females in Captive Groups of Golden-Headed Lion Tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*): Causes and Consequences. **Folia Primatologica**, v. 72, n. 1, p. 1–10, 2001.

DIXSON, A. F.; ANDERSON, M. J. Sexual Selection, Seminal Coagulation and Copulatory Plug Formation in Primates. **Folia Primatologica**, v. 73, n. 2-3, p. 63–69, 2002.

DUFFIÉ, R.; BOURC'HIS, D. Parental Epigenetic Asymmetry in Mammals. In: **Current Topics in Developmental Biology**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 104p. 293–328.

DURRANT, B. S. Semen Collection, Evaluation, and Cryopreservation in Exotic Animal Species: Maximizing Reproductive Potential. **ILAR Journal**, v. 32, n. 1, p. 2–10, 1 jan. 1990.

EDWARDS, C. A.; FERGUSON-SMITH, A. C. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 281–289, jun. 2007.

FRANCOISE, J. Semen Collection and Seminal Quality in Primates. **Journal of Primatology**, v. 03, n. 01, 2014.

FRANKHAM, R. Conservation Genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 29, n. 1, p. 305–327, 1 jan. 1995.

FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological Conservation**, v. 143, n. 9, p. 1919–1927, set. 2010.

FRENCH, J. A.; PISSINATTI, A.; COIMBRA-FILHO, A. F. Reproduction in captive lion tamarins (*Leontopithecus*): Seasonality, infant survival, and sex ratios. **American Journal of Primatology**, v. 39, n. 1, p. 17–33, 1996.

FROMMER, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, p. 1827–1831, 1 mar. 1992.

FROST, J. M.; MOORE, G. E. The Importance of Imprinting in the Human Placenta. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 7, p. e1001015, 1 jul. 2010.

GEER, L. Y. et al. The NCBI BioSystems database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database issue, p. D492–496, jan. 2010.

GRAHAM, J. K. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 1, p. 55–64, 1 jul. 1990.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAMMOUD, S. S. et al. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. **Nature**, 14 jun. 2009.

HANNA, C. W.; KELSEY, G. The specification of imprints in mammals. **Heredity**, v. 113, n. 2, p. 176–183, ago. 2014.

HARRIS, R. A. et al. Evolutionary genetics and implications of small size and twinning in callitrichine primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 4, p. 1467–1472, 28 jan. 2014.

HERNÁNDEZ, H. G. et al. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. **BioTechniques**, v. 55, n. 4, p. 181–197, out. 2013.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L. et al. Sperm quality differences between the rainy and dry seasons in captive black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). **American Journal of Primatology**, v. 57, n. 1, p. 35–41, maio 2002.

HIURA, H. et al. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. **Human Reproduction**, v. 27, n. 8, p. 2541–2548, 1 ago. 2012.

HUANG, J. M.; KIM, J. DNA methylation analysis of the mammalian *PEG3* imprinted domain. **Gene**, v. 442, n. 1-2, p. 18–25, ago. 2009.

IUCN. *Leontopithecus chrysomelas*: Kierulff, M.C.M., Rylands, A.B., Mendes. S.L. & de Oliveira, M.M.: **The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T40643A10347712**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/40643/0>>. Acesso em: 9 nov. 2015.

JABLONKA, E.; RAZ, G. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. **The Quarterly Review of Biology**, v. 84, n. 2, p. 131–176, jun. 2009.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3s, p. 245–254, mar. 2003.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 15 jun. 2012.

KIM, J. et al. Lineage-specific imprinting and evolution of the zinc-finger gene *ZIM2*. **Genomics**, v. 84, n. 1, p. 47–58, jul. 2004.

KIM, J.; BERGMANN, A.; STUBBS, L. Exon Sharing of a Novel Human Zinc-Finger Gene, *ZIM2*, and *Paternally Expressed Gene 3 (PEG3)*. **Genomics**, v. 64, n. 1, p. 114–118, fev. 2000.

KINGHORN, B. P. **Pedigree viewer - A graphical utility browsing pedigreed data sets** Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. **Anais...** In: 5TH INTERNATIONAL COMMITTEE FOR WORLD CONGRESSES ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION. Guelph, Canada: 1994

KLEIMAN, D. G. Parent-offspring Conflict and Sibling Competition in a Monogamous Primate. **The American Naturalist**, v. 114, n. 5, p. 753–760, 1979.

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, 1998.

KOBAYASHI, H. et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 21, p. 2542–2551, 21 jun. 2007.

KOBAYASHI, S. et al. Human *PEG1/MEST*, an Imprinted Gene on Chromosome 7. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 5, p. 781–786, 1 maio 1997.

KOSAKI, K. et al. Isoform-Specific Imprinting of the Human *PEG1/MEST* Gene. **The American Journal of Human Genetics**, v. 66, n. 1, p. 309–312, jan. 2000.

KUEDERLING, I. et al. 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, nov. 2000.

KUROIWA, Y. et al. *Peg3* imprinted gene on proximal chromosome 7 encodes for a zinc finger protein. **Nature Genetics**, v. 12, n. 2, p. 186–190, fev. 1996.

LACY, R. C. Extending Pedigree Analysis for Uncertain Parentage and Diverse Breeding Systems. **Journal of Heredity**, v. 103, n. 2, p. 197–205, 1 mar. 2012.

LAW, J. A.; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 3, p. 204–220, mar. 2010.

LI, C.; ZHOU, X. Gene transcripts in spermatozoa: Markers of male infertility. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 13-14, p. 1035–1038, jul. 2012.

LI, L. Regulation of Maternal Behavior and Offspring Growth by Paternally Expressed *Peg3*. **Science**, v. 284, n. 5412, p. 330–334, 9 abr. 1999.

LI, L.-C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 18, n. 11, p. 1427–1431, nov. 2002.

LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic Acids Research**, v. 2, n. 3, p. 383–389, mar. 1975.

LI, T. et al. An imprinted *PEG1/MEST* antisense expressed predominantly in human testis and in mature spermatozoa. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13518–13527, 2002.

LUDWIG, K.; GALBUSERA, P. **International Studbook: Golden-headed Lion Tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*)**. Antwerp, Belgium: World Association of Zoos and Aquariums, 2011.

MALO, A. F. et al. Effects of Genetic Captive-Breeding Protocols on Sperm Quality and Fertility in the White-Footed Mouse. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 4, p. 540–548, 1 out. 2010.

MANIPALVIRATN, S.; DECHERNEY, A.; SEGARS, J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 2, p. 305–315, fev. 2009.

MARGULES, C. R.; PRESSEY, R. L. Systematic conservation planning. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 243–253, 11 maio 2000.

MARSON, J. et al. Influence of ejaculation frequency on semen characteristics in chimpanzees (*Pan troglodytes*). **Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 43–50, 1 jan. 1989.

MARSON, J. Puberty in the male chimpanzee: progressive maturation of semen characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 44, n. 3, p. 448–455, 1 mar. 1991.

MAUNAKEA, A. K. et al. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. **Cell Research**, v. 23, n. 11, p. 1256–1269, nov. 2013.

MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W20–W25, 1 jul. 2004.

MONTJEAN, D. et al. Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 5, p. 1241–1247.e2, nov. 2013.

NG, S.-F. et al. Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 963–966, 21 out. 2010.

NICKKHOLGH, B. et al. Genetic and epigenetic stability of human spermatogonial stem cells during long-term culture. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 6, p. 1700–1707.e1, dez. 2014.

OLIVEIRA, L. DE C. **Leontopithecus chrysomelas: Mico-leão-da-cara-dourada**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/7209-mamiferos-leontopithecus-chrysomelas-mico-leao-da-cara-dourada.html>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

PAOLONI-GIACOBINO, A.; CHAILLET, J. R. Genomic imprinting and assisted reproduction. **Reproductive Health**, v. 1, n. 1, p. 6, 26 2004.

PINTO, L. P. DE S.; RYLANDS, A. B. Geographic Distribution of the Golden-Headed Lion Tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*: Implications for Its Management and Conservation. **Folia Primatologica**, v. 68, n. 3-5, p. 161–180, 1997.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for quantifying the acrosomal status of cat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 257, jan. 1991.

POPLINSKI, A. et al. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of *MEST* and *IGF2/H19 ICR1*. **International Journal of Andrology**, out. 2009.

POWER, R. A. et al. Relations among measures of body composition, age, and sex in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Comparative Medicine**, v. 51, n. 3, p. 218–223, jun. 2001.

PUKAZHENTHI, B. et al. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 2, p. 77, 2006.

PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 16, n. 1-2, p. 33–46, 2004.

REIK, W. et al. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. **The Journal of Physiology**, v. 547, n. 1, p. 35–44, 15 fev. 2003.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Reviews. Genetics**, v. 2, n. 1, p. 21–32, jan. 2001.

ROHDE, C. et al. BISMA - Fast and accurate bisulfite sequencing data analysis of individual clones from unique and repetitive sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 230, 2010.

ROLDAN, E. R. S. et al. Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1392, p. 243–248, 7 fev. 1998.

RUSSO, V. E. A.; MARTIENSSEN, R. A.; RIGGS, A. D. (EDS.). **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

SANTOS, I. L. S. A. et al. **Validação da coloração com eosina/nigrosina para avaliação da integridade de membrana plasmática de espermatozoides de Mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*)** Anais do XVII Congresso e XXIII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. **Anais...** In: XVII CONGRESSO E XXIII ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS. Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Abravas, 10/10 2014

SATO, A. et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. **Human Reproduction**, v. 22, n. 1, p. 26–35, 10 out. 2006.

SATO, S. et al. Methylation dynamics of *Ig*-DMR and *Gtl2*-DMR during murine embryonic and placental development. **Genomics**, v. 98, n. 2, p. 120–127, ago. 2011.

SCHAFFER, N. et al. Semen collection and analysis in the conservation of endangered nonhuman primates. **Zoo Biology**, v. 8, n. S1, p. 47–60, 1989.

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, n. 2, p. 98–104, abr. 2004.

SINGER, M. et al. A diverse epigenetic landscape at human exons with implication for expression. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. 3498–3508, 20 abr. 2015.

SOUBRY, A. et al. Paternal obesity is associated with *IGF2* hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 29, 2013.

SUTOVSKY, P.; SCHATTEN, G. Paternal Contributions to the Mammalian Zygote: Fertilization after Sperm-Egg Fusion. In: **International Review of Cytology**. [s.l.] Elsevier, 1999. v. 195p. 1–65.

SWALES, A. K. E.; SPEARS, N. Genomic imprinting and reproduction. **Reproduction**, v. 130, n. 4, p. 389–399, 1 out. 2005.

TAFT, R. J. et al. Non-coding RNAs: regulators of disease. **The Journal of Pathology**, v. 220, n. 2, p. 126–139, jan. 2010.

TAKABAYASHI, S.; SUZUKI, Y.; KATOH, H. Development of a modified artificial insemination technique combining penile vibration stimulation and the swim-up method in the common marmoset. **Theriogenology**, v. 83, n. 8, p. 1304–1309.e2, maio 2015.

TARDIF, S. D. et al. Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Comparative Medicine**, v. 53, n. 4, p. 364–368, ago. 2003.

THIAVILLE, M. M. et al. Identification of an evolutionarily conserved cis-regulatory element controlling the *Peg3* imprinted domain. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e75417, 2013.

TIAN, X. (CINDY). Genomic Imprinting in Farm Animals. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 23–40, fev. 2014.

VALLE, R. DEL R. **Características físicas e morfológicas do sêmen de *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812) mantidos em cativeiro**. dissertação de mestrado—São Paulo: USP, 2002.

VALLE, R. DEL R. **Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie de modelo de primata neotropical, Sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*)**. Tese de doutorado—São Paulo: USP, 2007.

VALLE, R. DEL 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, ago. 2014.

VALLE, R. R. et al. Validation of non-fluorescent methods to reliably detect acrosomal and plasma membrane integrity of common marmoset (*Callithrix jacchus*) sperm. **Theriogenology**, v. 70, n. 1, p. 115–120, jul. 2008.

VIDAL, F. D. et al. Coleta de sêmen em mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (Kuhl, 1820) através da eletroejaculação Callitrichidae – primates. **Brazilian Journal of Veterinary Science**, p. 67–71, 2007.

WADDINGTON, C. H. Canalization of Development and Genetic Assimilation of Acquired Characters. **Nature**, v. 183, n. 4676, p. 1654–1655, 13 jun. 1959.

WEYRICH, A. Preparation of genomic DNA from mammalian sperm. **Current Protocols in Molecular Biology / Edited by Frederick M. Ausubel ... [et Al.]**, v. Chapter 2, p. Unit 2.13.1–3, abr. 2012.

WILKINS, J. Genomic imprinting and methylation: epigenetic canalization and conflict. **Trends in Genetics**, v. 21, n. 6, p. 356–365, jun. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (ED.). **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5th ed ed. Geneva: World Health Organization, 2010.

WORLEY, K. C. et al. The common marmoset genome provides insight into primate biology and evolution. **Nature Genetics**, v. 46, n. 8, p. 850–857, 20 jul. 2014.

WOUTERS-TYROU, D. et al. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. **Biochimie**, v. 80, n. 2, p. 117–128, fev. 1998.

YEOMAN, R. R. et al. Penile vibratory stimulation yields increased spermatozoa and accessory gland production compared with rectal electroejaculation in a neurologically intact primate (*Saimiri boliviensis*). **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 13, n. 9, p. 2527–2531, set. 1998.

YOUNG, L. E. et al. Epigenetic change in *IGF2R* is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, n. 2, p. 153–154, fev. 2001.

YOUNGSON, N. A.; WHITELAW, E. The effects of acquired paternal obesity on the next generation. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 2, p. 195–196, mar. 2011.

ZHOU, V. W.; GOREN, A.; BERNSTEIN, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 1, p. 7–18, jan. 2011.

**Anexo A** - Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9879  
Fax: (016) 3351.8025  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[ceua@ufscar.br](mailto:ceua@ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

---

**Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**nº 059/2013**

Protocolo nº. 059/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Epigenoma do gameta masculino de mico-leão-da-cara-dourada (Leontopithecus chrisonelas)*", submetido pelo pesquisador Andréia Cristina Peripato.

São Carlos, 18 de Dezembro de 2013.

**Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza**

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

## Anexo B - Protocolo regulamentado pelo IBAMA



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

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41976-1	Data da Emissão: 26/11/2013 11:52	Data para Revalidação*: 26/12/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: Andréa Cristina Peripato	CPF: 142.596.068-59
Título do Projeto: Epigenoma do gameta masculino de mico-leão-da-cara-dourada ( <i>Leontopithecus chrysomelas</i> )	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS	CNPJ: 45.358.058/0001-40

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de sêmen de micos-leão-da-cara-dourada para análise de expressão gênica	11/2013	03/2015

## Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Isabela Midori Watanabe	Executora do Projeto	229.583.038-96	459963405 SSP-SP	Brasileira

## Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO PAULO	SP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	Fora de UC Federal

## Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>

## Material e métodos

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 26581428





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

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 41976-1</b>	<b>Data da Emissão: 26/11/2013 11:52</b>	<b>Data para Revalidação*: 26/12/2014</b>
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Andréa Cristina Peripato	CPF: 142.596.068-59
Título do Projeto: Epigenoma do gameta masculino de mico-leão-da-cara-dourada ( <i>Leontopithecus chrisomelas</i> )	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS	CNPJ: 45.358.058/0001-40

1	Amostras biológicas (Primatas)	Sêmen
2	Método de captura/coleta (Primatas)	Captura manual

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS	

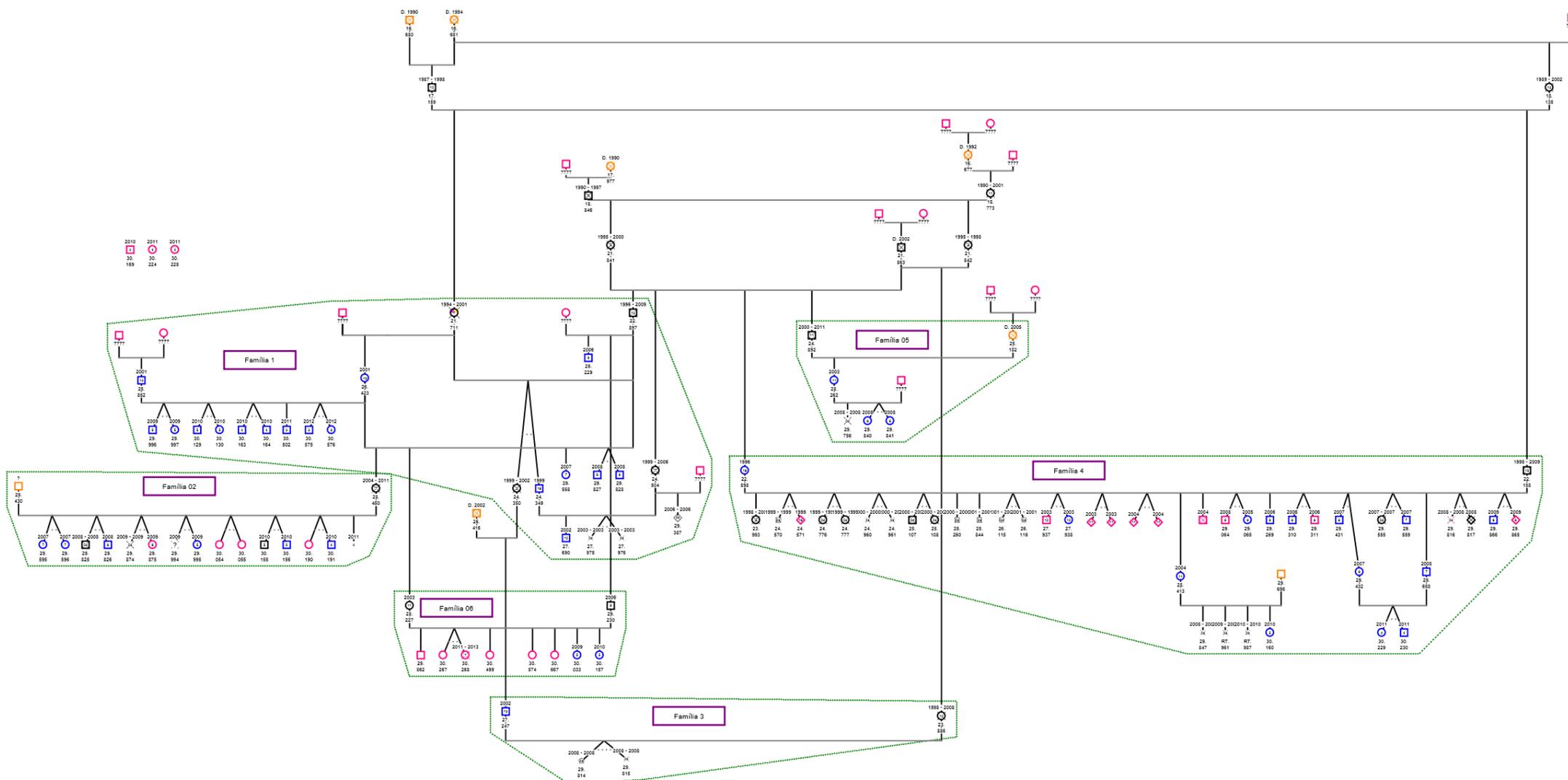
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 26581428**

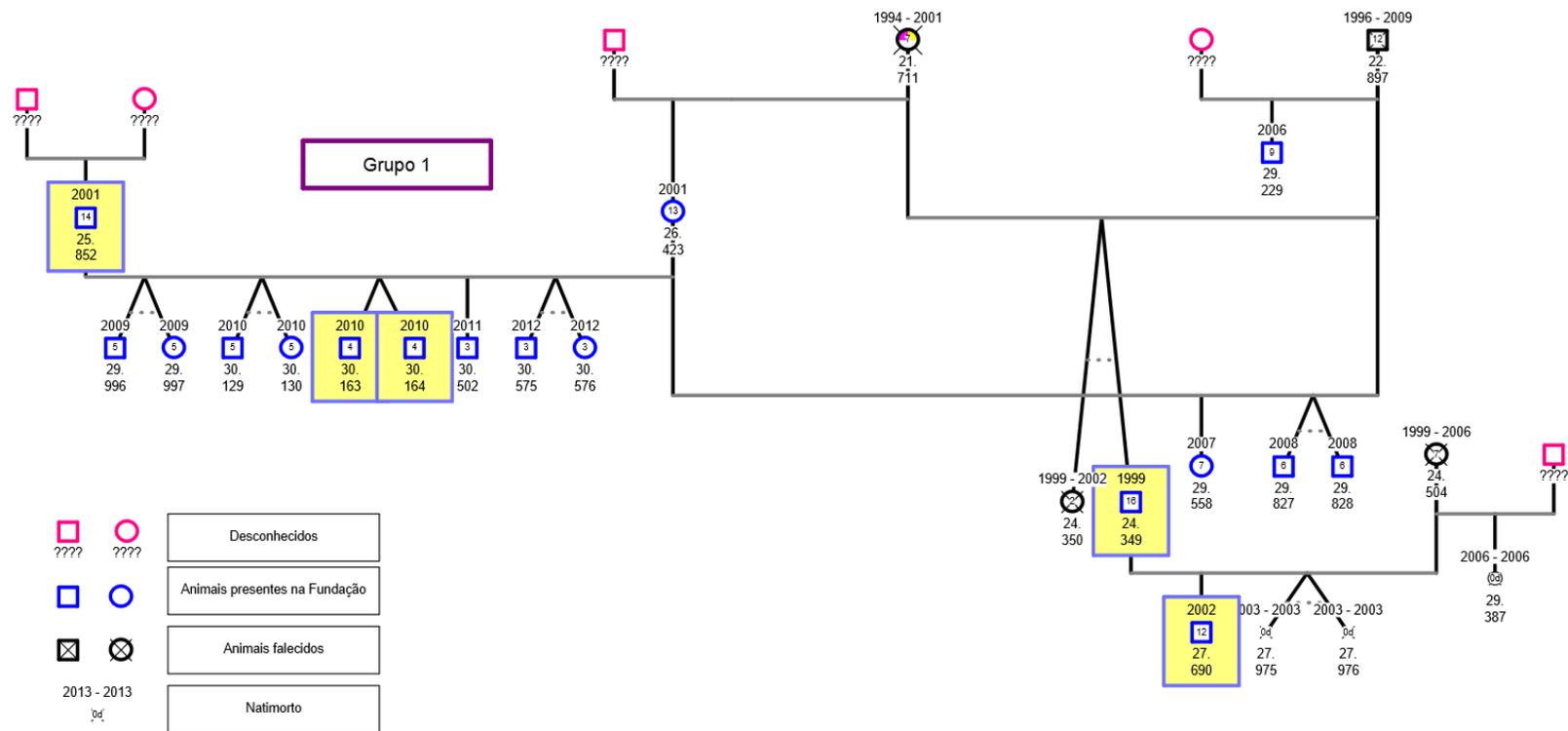




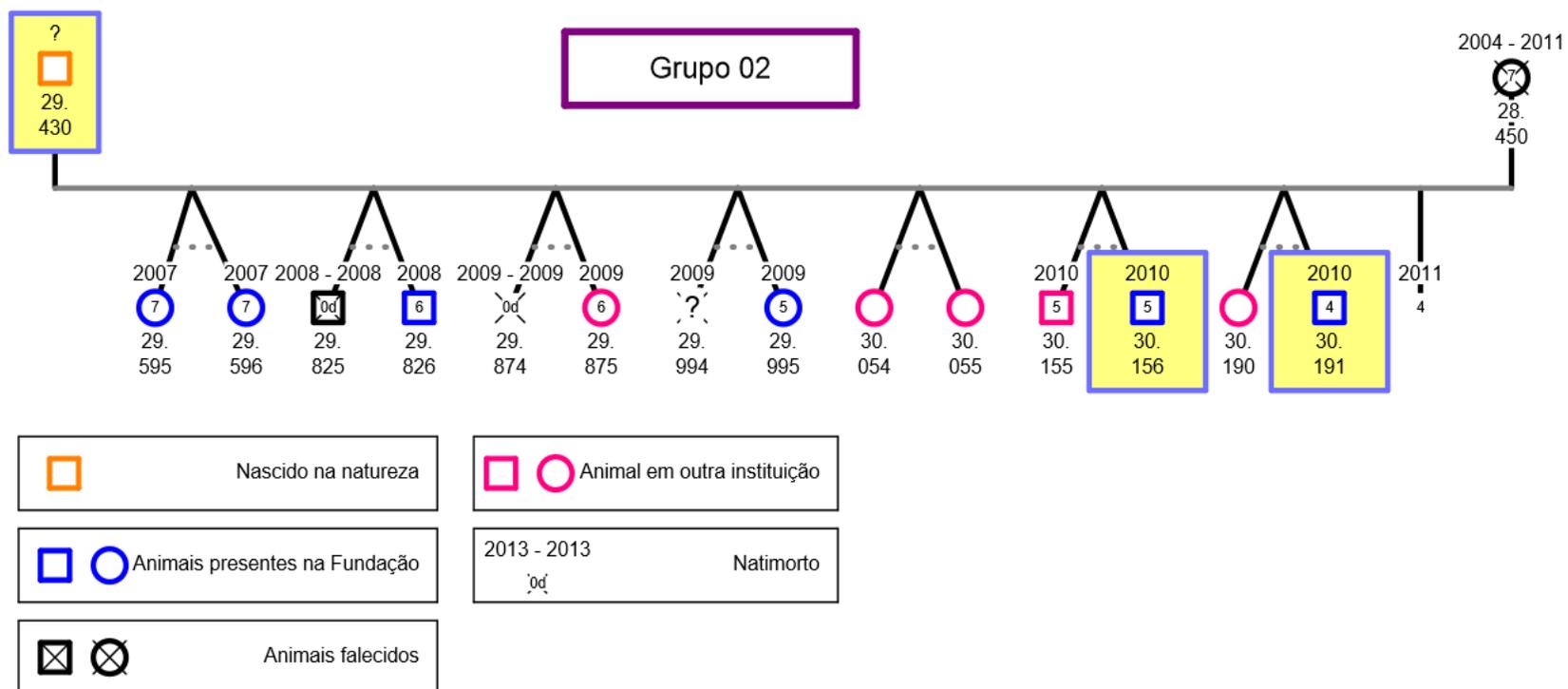
## Anexo C - Heredograma da população de mico-leão-de-cara-dourada mantida na Fundação Parque Zoológico de São Paulo



## Anexo C.1 – Representação do Grupo 1



## Anexo C.2 - Representação do Grupo 2



## Anexo C.3 - Representação do Grupo 3

