



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV  
Curso de Medicina Veterinária

**COLHEITA DE EPIDÍDIMO E AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA *POST-MORTEM* DE *Didelphis albiventris* (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE): Relato de Caso**

Thaís Cardoso Lettieri  
Orientadora: Profa. Dra. Líria Queiroz Luz Hirano

BRASÍLIA – DF  
JUNHO/2019



THAÍS CARDOSO LETTIERI

**COLHEITA DE EPIDÍDIMO E AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA POST-MORTEM DE *Didelphis albiventris* (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE): Relato de Caso**

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

**Orientadora:** Profa. Dra. Líria Queiroz Luz Hirano

BRASÍLIA – DF  
JUNHO/2019

Lettieri, Thaís Cardoso

Colheita de epidídimo e avaliação espermática *post-mortem* de *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae): Relato de caso/Thaís Cardoso Lettieri. Orientação de Profa. Dra. Líria Queiroz Luz Hirano. – Brasília, 2019.

48 p. : il.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

## Cessão de Direitos

Nome do Autor: Thaís Cardoso Lettieri

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Colheita de epidídimo e avaliação espermática *post-mortem* de *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae): Relato de caso.

Ano: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Thaís Cardoso Lettieri

Thaís Cardoso Lettieri

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Nome do autor: LETTIERI, Thaís Cardoso

Título: Colheita de epidídimo e avaliação espermática *post-mortem* de *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae): Relato de caso.

Trabalho de conclusão de curso apresentada para a conclusão do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

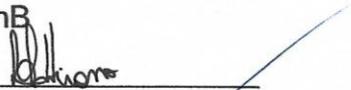
Aprovado em: 24 / 06 / 19

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Líria Queiroz Luz Hirano

Julgamento: APROVADA

Instituição: UnB

Assinatura: 

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Julgamento: APROVADA

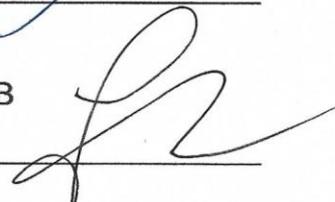
Instituição: UnB

Assinatura: 

Prof. Dr. Ivo Pivato

Julgamento: APROVADA

Instituição: UnB

Assinatura: 

## AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à minha família, pois sem o apoio deles eu jamais teria conseguido chegar onde cheguei.

Agradeço aos meus pais, Scheilla e Deverson, por terem me dado condições de batalhar por esse sonho e pelo imenso apoio. Aos meus irmãos Júnior e Henrique, pelas ajudas, risadas e chatices. Ao meu avô Osmar por sempre acreditar em mim, mais do que eu mesma. Aos meus primos, em especial Stéphanie e Luísa pelo incentivo.

Aos meus filhos de pelos e penas, Alaga, Laica, Cookie, Irina, Poeira, Julião, Noturno, Minerva, Frajola, Mingau, Nina, Devito, Narizinho, Sara, Jerônimo, Bufinha, Paulinho e Fred. Agradeço por me mostrarem um amor incondicional e verdadeiro. Em especial ao Cookie, que me incentivou a seguir esse sonho e que hoje é o meu anjinho, e ao Mingau, meu felveto preferido que tanto me ensina.

Ao meu namorado Bruno, por aguentar meu estresse e desespero, me presenteando com chocolates sempre que foi preciso.

Aos meus amigos da vida, Bárbara Lopes, Thaís Netto, Fernanda Lira, pela amizade.

Aos meus amigos da veterinária, Gabriella Munitor, Guilherme Marques, Mayan Matos, Monique Ribeiro, Débora Martins e Gabriela Dantas, um enorme obrigada pelos melhores anos da minha vida, por muitas risadas, dias de estudos, resumos e apoio.

Agradeço aos professores Líria Hirano, Rodrigo Arruda e Ivo Pivato pela ajuda, paciência, inspiração e supervisão.

Agradeço também ao Drinker, por me mostrar e ensinar que cavalos não são animais malucos, são apenas gatos gigantes.

*“Nós, seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto, quem maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar.”*

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Conservação da fauna.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Superordem Marsupialia .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 <i>Didelphis albiventris</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Biotécnicas da reprodução aplicadas a marsupiais.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Colheita de espermatozoides epididimários .....</b>	<b>12</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>21</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Introdução .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Relato de caso.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Discussão .....</b>	<b>31</b>
<b>2.4 Conclusão.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>38</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA – Área de proteção ambiental

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CETAS – Centro de triagem de animais silvestres

CM – Centímetros

FIV – Fertilização *in vitro*

HVET UnB – Hospital Veterinário da Universidade de Brasília

IA – Inseminação artificial

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da biodiversidade

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza

MMA – Ministério do Meio Ambiente

ONU – Organização das Nações Unidas

TE – Transferência de embrião

TRA – Técnica de reprodução assistida

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Esquema comparativo da disposição do sistema urogenital de mamíferos eutérios e metatérios.....	<b>5</b>
<b>Figura 2</b> - Exemplar de <i>Didelphis albiventris</i> . .....	<b>7</b>
<b>Figura 3</b> - Anatomia do sistema reprodutor masculino de <i>D. albiventris</i> .....	<b>8</b>
<b>Figura 4</b> - Fotografia da vista dorsal do sistema reprodutor de uma fêmea de <i>D. albiventris</i> :.....	<b>8</b>
<b>Figura 5</b> - Imagem de uma fêmea de <i>Didelphis albiventris</i> adulta, com presença de filhotes no marsúpio.....	<b>9</b>
<b>Figura 6</b> - Exame radiográfico de cabeça de <i>Didelphis albiventris</i> adulto, projeção látero-lateral.....	<b>25</b>
<b>Figura 7</b> - Pesagem (A) e biometria de altura (B), comprimento (C) e largura (D) de escroto, testículos e epidídimos de <i>Didelphis albiventris</i> adulto.....	<b>26</b>
<b>Figura 8</b> - Epidídimos e testículo de <i>Didelphis albiventris</i> adulto após dissecação .....	<b>27</b>
<b>Figura 9</b> - Microscopia das lâminas de líquido espermático colhido post-mortem do epidídimo de <i>Didelphis albiventris</i> adulto. ....	<b>28</b>
<b>Figura 10</b> - Análise da integridade de membrana de espermatozoide de <i>Didelphis albiventris</i> adulto, colhido post-mortem do epidídimo. ....	<b>28</b>

<b>Figura 11</b> - Espermatozoide com a cauda enrolada, colhido post-mortem do epidídimo de <i>Didelphis albiventris</i> adulto .....	<b>29</b>
<b>FIGURA 12</b> - Defeitos maiores encontrados em espermatozoides colhidos post-mortem do epidídimo de <i>Didelphis albiventris</i> adulto .....	<b>30</b>
<b>Figura 13</b> - Imagem demonstrando a formação de pares dos espermatozoides e os longos flagelos colhidos post-mortem do epidídimo de <i>Didelphis albiventris</i> adulto. ....	<b>30</b>

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO DE LITERATURA

#### BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO, SUPERORDEM MARSUPIALIA E PRESERVAÇÃO

Thaís Cardoso Lettieri; Líria Queiroz Luz Hirano

#### RESUMO

A preocupação com a preservação e manutenção da biodiversidade mundial está cada vez maior. Atualmente, se sabe da dificuldade de manter um ecossistema livre de ações antrópicas, de maneira que permita a conservação *in situ* de espécies. Assim, as biotécnicas da reprodução estão sendo cada vez mais requisitadas para auxiliar na manutenção do equilíbrio ecológico de espécies animais, como os marsupiais, por exemplo. Instituições ambientais e pesquisadores se mostram interessados no desenvolvimento de técnicas e protocolos padrões que busquem auxiliar na conservação, aumentar a taxa reprodutiva e manter, na medida do possível, a variabilidade genética de exemplares marsupiais, tanto de espécimes sob cuidados humanos como animais de vida livre.

**PALAVRAS-CHAVES:** Biodiversidade, conservação, reprodução animal, marsupiais

*BIOTECHNICS OF ANIMAL REPRODUCTION, MARSUPIALS AND  
PRESERVATION*

**ABSTRACT**

The concern with the preservation and maintenance of biodiversity have been increasing in the last decades. At present, it known the difficult to maintain a habitat free of anthropic actions, to promote the *in situ* conservation of species. So, the biotechnologies of animal reproduction can help to maintain the ecological balance of animal species such as marsupials. Environmental institutes and researchers are interested in developing techniques and breeding protocols to help in conservation, increase the reproductive rate and maintain, as far as possible, the genetic variability of marsupial specimens, for both animals of under human care as exemplars of wild living.

**KEYWORDS:** Biodiversity, conservation, animal reproduction, marsupiais

## 1.1 Conservação da fauna

O processo de extinção se caracteriza pelo desaparecimento de espécies, seja animal ou vegetal, e é considerado como um evento natural no planeta (HOLT & PICKARD, 1999; PAULA, 2011). Porém, ações antrópicas no aceleram e intensificam esse acontecimento (CORLEY-SMITH & BRANDHORST, 1999; PAULA, 2011; ONU, 2019). O Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2019) lista as três principais razões da preocupação com a conservação, que são o desequilíbrio dos ecossistemas, a grande perda de potencial econômico e a grande deterioração da biodiversidade.

Portanto, a ideologia da conservação é promover a manutenção da biodiversidade mundial, visto que a remoção de espécies pode acarretar em drásticas mudanças, como o desequilíbrio ecológico de todo um ecossistema, podendo apresentar reflexos no planeta como um todo (COMIZZOLI et al., 2000; MARGULES & PRESSEY, 2000). Para auxiliar o processo de preservação ambiental, pode-se contar com as medidas *in situ*, *ex situ*, ou com a associação das duas condições (HENSON, 1992; WOELDERS, et al., 2006).

A conservação classificada como *in situ* consiste em manter a fauna e a flora em um habitat ideal. Esse é considerado como o meio original e natural da espécie, ou mesmo um outro ambiente que foi adaptado de maneira semelhante a fim de permitir a continuação de todos os processos específicos de evolução (HENSON, 1992; EMBRAPA, 2019).

Criação de locais como áreas de proteção ambiental (APA) e parques ecológicos são exemplos de projetos com método *in situ* (MMA, 2019). Nesses casos, não é necessário o uso de tecnologias, no entanto, apesar de ideais (LOI et al., 2001), eles podem não ser eficientes para a propagação de pequenas populações, diante da dificuldade de manter a variabilidade genética (HENSON, 1992; ANDRABI & MAXWELL, 2007).

Em relação à conservação *ex situ*, essa consiste nas medidas aplicadas fora do habitat padrão do animal, com o intuito de manter e promover a variabilidade genética dentro das espécies (PAIVA, 1994). Como exemplo, a aplicação das biotecnologias voltadas para a reprodução natural ou assistida, como a inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), fertilização *in vitro* (FIV), bancos de preservação de gametas e coleções de animais em

cativeiro, como os zoológicos (PRIMACK & RODRIGUES, 2002; ANDRABI & MAXWELL, 2007).

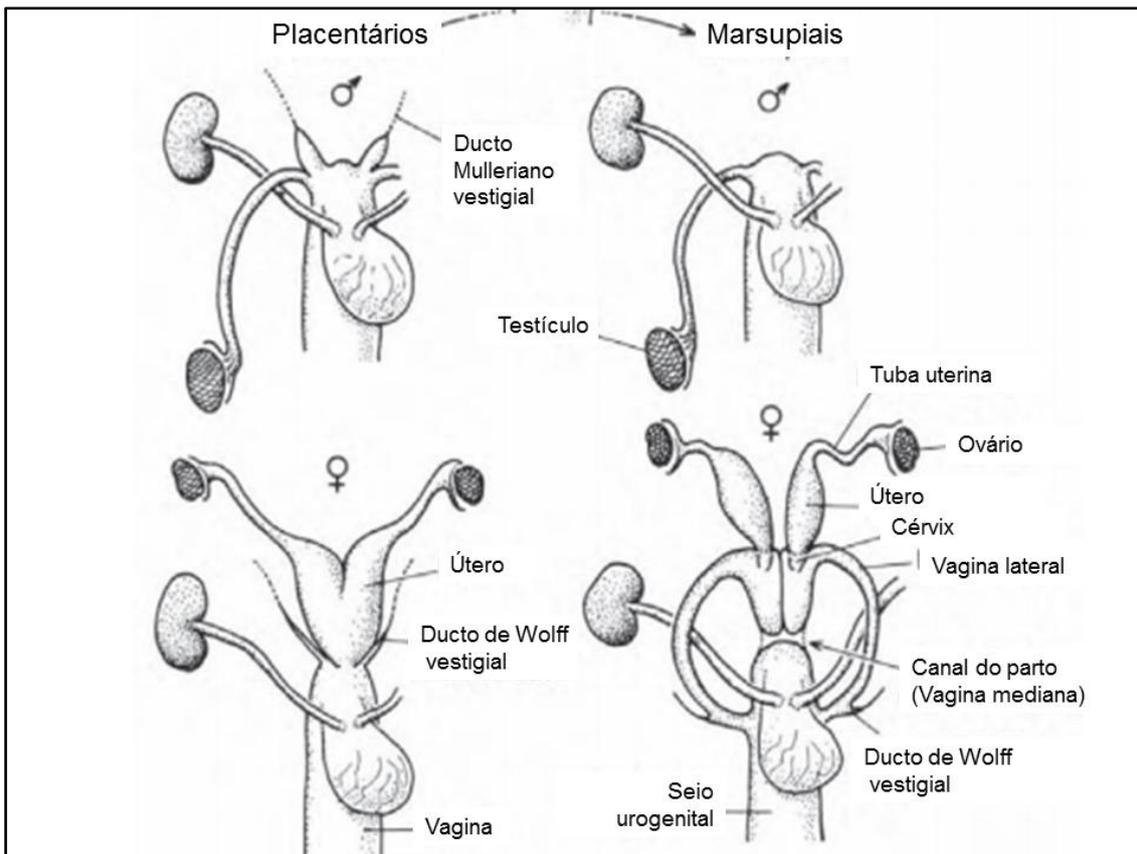
Atualmente, as medidas *ex situ* possuem um maior destaque e são mais utilizadas, devido à dificuldade de manutenção de um habitat natural livre de interferências humanas. Porém, a conservação *in situ* e *ex situ* são consideradas técnicas complementares, e o ideal seria realizar as duas simultaneamente, para atingir uma maior escala de conservação e preservação da biodiversidade (COSTA & MARTINS, 2008).

## 1.2 Superordem Marsupialia

Animais da superordem Marsupialia pertencem ao filo Chordata e classe Mammalia. Esse grupo apresenta o metabolismo lento, devido à temperatura corporal inferior, quando comparada a dos mamíferos placentários (JANSEN, 2002). Os marsupiais ocorrem no continente americano e na Oceania, em diversos habitats, como cerrados, florestas e desertos (POUGH, 2008). Além disso, ocupam diferentes posições na cadeia alimentar, com exemplares herbívoros, onívoros e carnívoros, como o coala (*Phascolarctos cinereus*), o saruê (*Didelphis* sp.) e o diabo-da-Tasmânia (*Sarcophilus harrisi*), respectivamente (TYNDALE-BISCOE, 2005).

Uma particularidade dos marsupiais é que as fêmeas possuem uma bolsa localizada na região inguinal, denominada de marsúpio, que aloja em seu interior os mamilos (CABRAL, 2015). Esses animais apresentam um curto período de desenvolvimento embrionário intrauterino, de forma que os filhotes terminam sua formação protegidos no interior da bolsa marsupial (REIS et al., 2006; CABRAL, 2015), sendo essa a característica que difere os marsupiais dos mamíferos placentários (JANSEN, 2002).

Apesar do marsúpio ser uma característica marcante da superordem Marsupialia, o sistema urogenital apresenta a particularidade da presença de um ducto urinário com localização entre os ductos genitais, e não lateral, como nos mamíferos eutérios (JANSEN, 2002; TYNDALE-BISCOE, 2005). As fêmeas marsupiais possuem duas vaginas, dois úteros, dois cornos uterinos e dois ovários (Figura 1) (TYNDALE-BISCOE, 2005).



**Figura 1** – Esquema comparativo da disposição do sistema urogenital feminino e masculino de mamíferos placentários e marsupiais. (Fonte: Traduzido de TYNDALE-BISCOE, 2005).

Os marsupiais possuem um cérebro relativamente pequeno quando comparado aos mamíferos placentários (CARVALHO, 2004). Além disso, considera-se que esses animais possuem uma pseudocloaca, formada por uma cavidade bem desenvolvida, na qual desembocam os sistemas digestivo e urogenital e, ao lado da fenda cloacal, se encontram as glândulas paracloacais (NOGUEIRA, 2012).

Algumas espécies de marsupiais, como o coala e o diabo da Tasmânia, estão classificadas como ameaçadas de extinção na lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN). Esses animais possuem muitos representantes *ex situ* espalhados pelo mundo (IUCN, 2019), assim, diversos zoológicos desenvolvem projetos voltados para a reprodução dos exemplares em cativeiro, com o objetivo de promover a conservação e possibilitar opções de revigoramento populacional (TORONGA ZOO, 2008 & 2014).

### 1.3 *Didelphis albiventris*

No Brasil existem três grupos da superordem Marsupialia, os saruês (*Didelphis*), as cuícas (*Philander*, *Caluromys*, *Glironia*, *Chironectes*, *Gracilinanus*, *Lutreolina*, *Marmosa*, *Marmosops*, *Metachirus* e *Micoureus*) e as catitas (*Monodelphis* e *Thylamys*). Esses animais pertencem à família Didelphidae e à ordem Didelphimorphia (JANSEN, 2002; ROSSI, et al., 2006).

Os marsupiais brasileiros são animais pequenos, de alimentação variada e hábito noturno (LESSA & GEISE, 2010). São considerados importantes para a manutenção do equilíbrio do ecossistema, pois ocupam diferentes nichos ecológicos, ajudam no controle populacional de pequenos vertebrados e invertebrados, são presas de animais carnívoros e fazem dispersão de sementes (CÁCERES, 2002; GATTI et al., 2006; ÁVILA, 2012).

Dos gêneros de marsupiais nativos, o *Didelphis* é o que se faz mais presente nos centros urbanos, com uma grande capacidade de adaptação a ambientes antropizados, fenômeno denominado de sinurbização (ABREU, 2013). Dentre as espécies de saruês, encontra-se a *Didelphis albiventris*, conhecida popularmente como saruê ou gambá-de-orelha-branca (Figura 2).

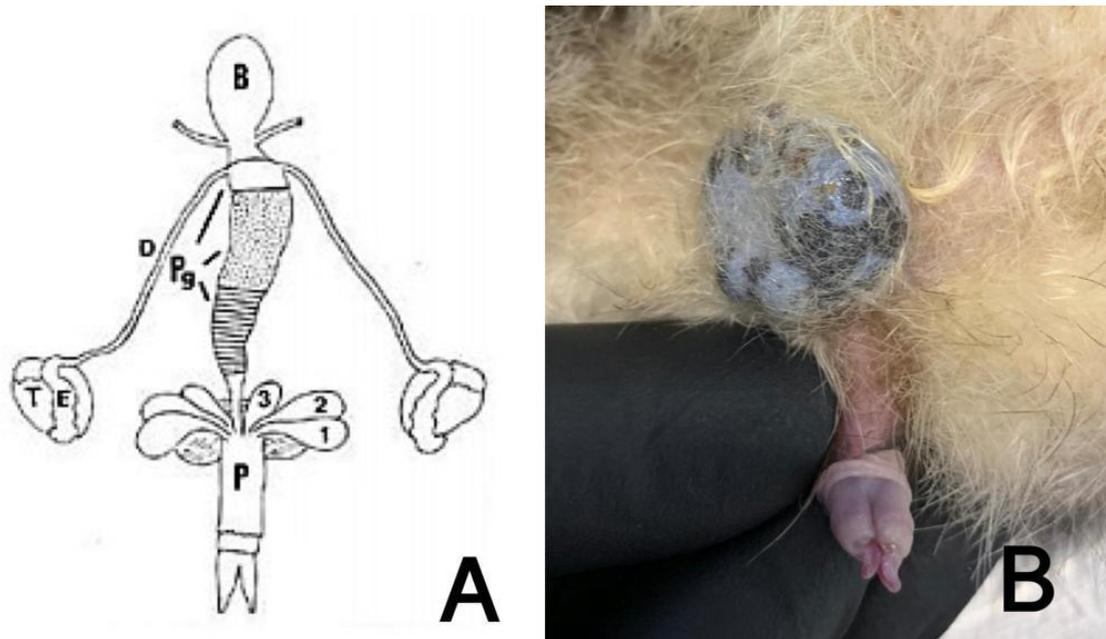
Os exemplares da *Didelphis albiventris* possuem a cauda semi-preênsil, mãos e pés com cinco dígitos, de forma que o primeiro dedo do membro pélvico é desprovido de unha (ROSSI et al., 2006). Atualmente seu estado de conservação está classificado como pouco preocupante, tanto pela IUCN (COSTA, et al., 2015) como pelo ICMBio (2018). São animais solitários, salvo durante o período de acasalamento, e geralmente apresentam dimorfismo sexual, com machos de crânio e mandíbulas maiores que as fêmeas (SILVA, 2012).



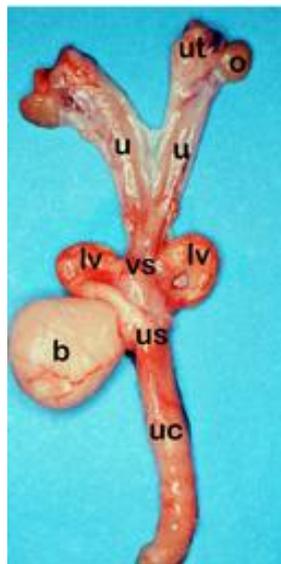
**Figura 2** - Exemplar jovem de *Didelphis albiventris* (Fonte: Arquivo pessoal).

O sistema reprodutor dos machos de *D. albiventris* é composto por dois testículos, dois epidídimos, dois ductos deferentes, uretra, pênis, próstata e três pares de glândulas bulbouretrais. Possuem a flexura sigmoide e o pênis se localiza após o escroto, com uma glande bipartida (Figura 3) (NOGUEIRA, 2012). Os machos atingem a puberdade com cerca de 110 dias após a saída do marsúpio e maturidade sexual em torno dos seis a oito meses (MOTTA, 1988; NOGUEIRA & REDINS, 1989; CUBAS, et al., 2014).

As fêmeas de *D. albiventris* possuem o sistema reprodutor característico da superordem Marsupialia (TYNDALE-BISCOE, 2005). Autores classificam o trato reprodutor como bífido (LANGE & JABLONSKI, 1998; SCHIMMING et al., 2009), por possuir dois ovários, duas tubas uterinas, dois úteros, duas vaginas laterais, uma vagina mediana ou pseudovagina, o seio urogenital e um canal urogenital (Figura 4) (GOLÇALVES, et al., 2009). As fêmeas atingem a puberdade em média aos 150 dias pós marsúpio e a maturidade sexual em média com seis a oito meses (MOTTA, 1988; CUBAS, et al., 2014).



**Figura 3** - Anatomia do sistema reprodutor masculino de *Didelphis albiventris*. A: Esquema ilustrativo dos órgãos genitais (Fonte: NOGUEIRA, 2012). B: Fotografia da região inguinal, com ênfase na posição pré-peniana dos testículos e a bipartição da glândula (Fonte: Arquivo pessoal). Legenda: B – bexiga urinária; D – ducto deferente; E – epidídimo; PG – próstata; T – testículo; 1,2 e 3 – glândulas bulbouretrais; P – pênis.



**Figura 4** - Fotografia da vista dorsal do sistema reprodutor de uma fêmea de *Didelphis albiventris*. (Fonte: SCHIMMING et al., 2009). Legenda: O – ovário; UT – tuba uterina; U – útero; LV – vagina lateral; VS – pseudovagina ou vagina mediaana; US – seio urogenital; UC – canal urogenital; B – bexiga urinária.

As fêmeas de marsupiais neotropicais são poliétricas estacionais, com período de acasalamento geralmente no mês de julho e janeiro (DAVIS, 1947). No caso da espécie *Didelphis albiventris*, o estro dura entre 25 e 33 dias, com ovulação espontânea e suprimida pelo período de amamentação da ninhada (MONTEIRO-FILHO & CÁCERES, 2006; CUBAS et al., 2014). Esses animais possuem um curto período de gestação, que varia entre 12 e 14 dias.

As espécies de *Didelphis* sp. são consideradas “marsupiais verdadeiros”, pois apresentam o marsúpio (Figura 5), diferentemente das fêmeas de outros gêneros, como *Monodelphis* e *Metachirus*, por exemplo (CÁCERES & GRAIPEL, 2012). Após o nascimento precoce, os filhotes migram para o interior do marsúpio, no qual se aderem à glândula mamária e lá permanecem até o seu completo desenvolvimento, com duração média de 60 dias, e ninhada de sete a 11 filhotes (OLIVEIRA et al., 2010; SÁ et al., 2013).



**Figura 5** - Imagem de uma fêmea de *Didelphis albiventris* adulta, com presença de filhotes no marsúpio (Fonte: Arquivo pessoal).

Além disso, as fêmeas de *Didelphis* sp. possuem 11 papilas mamárias, com ausência do músculo esfíncter do teto (SAMOTO et al., 2006). Após o período de amamentação, as papilas diminuem de tamanho, mas não voltam 100% ao estágio inicial. O retorno ao estro ocorre rapidamente e por

volta dos 97 dias pós-lactação essas fêmeas aceitam o macho novamente (CUBAS, et al., 2014).

#### **1.4 Biotécnicas da reprodução aplicadas a marsupiais**

As biotécnicas da reprodução podem ser fortes aliadas no combate à perda de biodiversidade da fauna pelo mundo, visto a viabilidade da conservação *ex situ* em relação a estratégias *in situ* (COSTA & MARTINS, 2008). Programas de reprodução assistida são utilizados com o intuito de promover o aumento de exemplares e a variabilidade genética de populações de cativeiro (FILHO, 2004; FOOSE & WIESE, 2006).

Com o aumento do número de espécies ameaçadas de extinção, esforços têm sido direcionados também para o estudo da viabilidade do emprego de técnicas de reprodução assistida (TRAs) em espécies silvestres (TORONGA ZOO, 2014; SMITHSONIAN ZOO, 2015; ZOO BRASÍLIA, 2019). Para auxiliar na conservação de marsupiais ameaçados, estudos sobre a anatomia e fisiologia reprodutiva desses animais foram desenvolvidos, com o objetivo de alcançar um maior entendimento das particularidades desses animais, e posterior desenvolvimento de TRAs específicas (TYNDALE-BISCOE, 2005; BARROS et al., 2013).

Entretanto, ainda são necessários maiores estudos acerca do potencial do uso de técnicas de reprodução assistida em marsupiais (JOHNSTON & HOLT, 2014). Dentre as descrições encontradas de TRAs nesse grupo estão a superovulação (JUNGNICKEL, 2000), inseminação artificial (RODGER, et al., 2009), monitorização hormonal feminina, sincronização de estro (WITT & RODGER, 2018), colheita de gametas masculinos e criopreservação (RODGER, et al., 2009; KEELEY, et al., 2012; JOHNSTON & HOLT, 2014).

JUNGNICKEL (2000) descreveu a técnica de superovulação para cusu-de-orelhas-grandes (*Trichosurus vulpecula*), uma espécie classificada como pouco preocupante em relação ao risco de extinção. O autor utilizou gonadotrofina de éguas prenhas e o hormônio luteinizante para estimular a superovulação e relatou que 80% das fêmeas utilizadas no estudo ovularam de

nove a 12 horas após a aplicação hormonal. RODGER et al. (2009) creem que a inseminação artificial é um excelente aliado na conservação animal, inclusive de marsupiais, e o emprego dessa TRA foi realizado em coalas, cangurus, wombats e cuíca-de-rabo-curto.

Para realizar a monitorização hormonal de fêmeas de marsupiais, WITT & RODGER (2018) citam os métodos de acompanhamento pelo plasma e pelas fezes. A avaliação plasmática foi usada em cusu-de-orelhas-grandes, coalas e wombats para monitorar a ovulação, o ciclo estral e a eficiência de protocolos de superovulação. O método de análise hormonal pelas fezes é considerado menos invasivo e estressante para o animal. Essa prática foi relatada em fêmeas de *Tarsipes rostratus*, pois é um animal pequeno, o que dificulta a realização de outros métodos. Os autores ainda descrevem a sincronização de estro com o análogo de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em coalas, cangurus walabi e dunnart-de-cauda-grossa.

Para a colheita de sêmen em marsupiais, RODGER, et al. (2009), KEELEY et al. (2012) e JOHNSTON & HOLT (2014) descrevem a técnica de colheita por eletroejaculação em coalas, diabos-da-Tasmânia e cangurus. Os autores relatam que a metodologia utilizada apresenta sucesso, porém é considerado um método bastante invasivo, além de necessitar de anestesia e poder causar traumas retais devido a probe. Em coalas também foi avaliado uso de vagina artificial para realizar a colheita de sêmen, com relato da necessidade de treinamento do médico veterinário para ser realizada (JOHNSTON & HOLT, 2014).

Outra técnica promissora para a obtenção de gametas masculinos é a colheita de espermatozoides epididimários, que apresenta como grande vantagem o fato de poder ser realizada em animais mortos, o que promove uma oportunidade do emprego do material genético desses animais no futuro. Desconhece-se a avaliação dessa técnica em marsupiais nativos, mas ela foi realizada com êxito em cangurus e diabos-da-Tasmânia (McCLEAN et al., 2006; KEELEYA et al., 2012).

### 1.5 Colheita de espermatozoides epididimários

O epidídimo é um ducto longo dividido em três partes, a cabeça, o corpo e a cauda. Esse órgão tem como função a reabsorção de líquidos dos túbulos seminíferos, descarte de espermatozoides defeituosos e a maturação e armazenamento dos espermatozoides saudáveis. Ele se encontra aderido ao testículo e conecta os ductos eferentes com os ductos deferentes (OLIVA et al., 2009).

MARATA et al. (2017) e MOTA FILHO & DA SILVA (2012) descrevem a colheita de espermatozoides epididimários como interessante alternativa em casos de óbitos de machos de espécies ameaçadas de extinção. Teoricamente, os espermatozoides obtidos diretamente do epidídimo, em até um determinado tempo após a morte do animal, possui a mesma qualidade do material adquirido por outros métodos (TIPLADY et al., 2002; CBRA, 2013).

Para realizar a colheita de espermatozoides epididimários, primeiramente é necessário saber o horário do óbito, pois os processos de degradação celular alteram a viabilidade dos gametas. O testículo deve ser coletado o mais rápido possível e acondicionado em um recipiente à temperatura de 5°C, para retardar a degradação celular. Ele pode permanecer nessa condição por até 24 horas, enquanto em temperatura ambiente, os espermatozoides ficam viáveis por apenas cinco horas (MOTA FILHO & DA SILVA, 2012). Porém, não se tem estudos que demonstrem essa relação de tempo, temperatura e degradação celular para todas as espécies, por isso tais referências foram determinadas a partir de relatos com animais de produção.

Existem diversas maneiras de se realizar a colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo. Essa pode ser realizada por meio das técnicas de *slicing*, de fluxo retrógrado, de flutuação ou de perfuração (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006; MOTA FILHO & DA SILVA, 2012). A primeira, também conhecida como técnica de fatiamento, consiste em fazer vários cortes na cauda do epidídimo, com a intenção de se extravasar o líquido contendo os espermatozoides para a colheita (KAABI et al., 2003). Normalmente essa técnica é usada para animais com epidídimo pequeno e pouco calibroso, o que dificultaria o emprego de outras metodologias (CHUCHO et al., 2016).

No método do fluxo retrógrado, a retirada dos espermatozoides ocorre a partir de um pequeno corte feito na cauda do epidídimo. Posteriormente, é adicionada pressão com a injeção de diluente ou ar nos ductos deferentes (GARDE et al., 1994 citado por MOTA FILHO & DA SILVA, 2012). MARTINEZ-PASTOR et al. (2006) consideram essa técnica como a mais apropriada, visto que se tem uma menor contaminação da amostra, porém sua execução é limitada a animais de grande porte, por causa do tamanho e calibre do epidídimo.

Para a técnica de flutuação, são feitos cortes na cauda do epidídimo e as fatias são repousadas em um fluido não espermicida. Dessa maneira, os espermatozoides acabam migrando para o diluente e, por filtração, consegue-se obter a amostra. Esse método pode ser usado tanto para epidídimos grandes como para pequenos (EMERENCIANO et al., 2013). Por último, na técnica de perfuração, vários furos são feitos com uma agulha nos túbulos epididimários, o que permite o extravasamento de líquido com espermatozoides. Essa técnica foi descrita na literatura para realizar a colheita de espermatozoides epididimários de leões (MOTA FILHO & DA SILVA, 2012).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. C. **Evidência de sinurbização do sariguê (*Didelphis*) no ecossistema urbano de Feira de Santana (BA): Ocorrência e interação com os seres humanos**. 2013. 114f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

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

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belho Horizonte, v.39, n.1, p.47-60, 2015.

ÁVILA, M. C. N. **Distribuição da família Didelphidae (Mammalia, Didelphomorpha) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2012. 62f. Trabalho (Especialização em Diversidade e Conservação da Fauna) – Instituto de Bociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BARROS, M. A.; MARTINS, J. F. P.; SAMOTO, V. Y.; OLIVEIRA, V. C.; GONÇALVES, N.; FURLANETO.MANÇANARES, C. A.; VIDANE, A.; CARVALHO, A. F.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Marsupial Morphology of Reproduction: South America Opossum Male Model. **Microscopy research and technique**, Nova York, v.76, n.4, p.388-397, 2013.

CABRAL, M. V. B. Síntese evolutiva dos marsupiais (Mammalia: Metatheria). **Revista Científica da Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS**, Araras, v.3, n.2, p.73-84, 2015.

CÁCERES, N. C.; GRAIPEL, M. E. Estação reprodutiva e tamanho de prole de marsupiais brasileiros. In: CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. **Os marsupiais do Brasil – biologia, ecologia e evolução**. 2.ed. Campo Grande: UFMS, 2012. cap.11, p.245-258.

CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. **Os marsupiais do Brasil – biologia, ecologia e evolução**. 2.ed. Campo Grande: UFMS, 2012. 500p.

CÁCERES, N.C. Food habits and seed dispersal by the white-eared opossum, *Didelphis albiventris*, in southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Abingdon, v.37, n.2, p.97-104, 2002.

CARVALHO, I. S. **Paleontologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. 734p.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 91p.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v.40, n.5, p.493-504, 2000.

CORLEY-SMITH, G. E.; BRANDHORST, B. P. Preservation of Endangered Species and Populations: A Role for Genome Banking, Somatic Cell Cloning, and Androgenesis?. **Molecular reproduction and development**, Nova York, v.53, p.363-367, 1999.

COSTA, L. P.; ASTUA DE MORAES, D.; BRITO, D.; SORIANO, P.; LEW, D. 2015. *Didelphis albiventris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T40489A22176404.en>. Acesso em: 15 junho de 2019.

COSTA, P. M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. **Universitas Ciências da Saúde UNICEUB**, Brasília, v.6, n.1, p.39-55, 2008.

DAVIS, D. E. Notes on the life histories of some Brazilian mammals. **Boletim do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v.76, p.1-8, 1947.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Conservação in situ e manejo de Recursos Genéticos**. Sem data. Apresenta a classificação de conservação *in situ*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia/gp/in-situ>. Acesso em: 03 de maio de 2019.

FILHO, E. S. **Biotecnologias da reprodução na conservação de espécies animais selvagens: São realmente importantes?**. 2004. 94f. Monografia (Especialização em Manejo de Animais Silvestres) – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.

FOOSE, T. J.; WIESE, R. J. Population management of rhinoceros in captivity. **International Zoo Yearbook**, Londres, v.40, p.174-196, 2006.

GATTI, A.; BIANCHI, R.; ROSA, C. R. X.; MENDES, S. L. Diet of two sympatric carnivores, *Cerdocyon thous* and *Procyon cancrivorus*, in a restinga area of Espírito Santo State, Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v.22, n. 2, p.227-230, 2006.

GONÇALVES, N. N.; MAÇANARES, C. A. F.; MIGLINO, M. A.; SAMOTO, V. Y.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; FERRAZ, R. H. S.; CARVALHO, A. F. Aspectos morfológicos dos órgãos genitais femininos do gambá (*Didelphis* sp.). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.46, n.4, p.332-338, 2009.

HENSON, E. L. In situ conservation of livestock and poultry. **Food and Agriculture Organization of The United Nations, Animal Production & Health Paper**, Roma, v.99, 112p., 1992.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies in genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of reproduction**, Colchester, v.4, n.3, p.143–150, 1999.

ICMBIO. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira ameaçada de extinção**. 1.ed. Brasília, 2018. 495p.

IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. **The Red List of Threatened Species**, 2019. Apresenta a relação de espécies de marsupiais e sua classificação sobre extinção. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/search?query=marsupials&searchType=species>. Acesso em: 12 de maio de 2019.

JANSEN, A. M. Marsupiais Didelfídeos: gambás e cuícas. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. 1.ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. cap.22, p.167-173.

JOHNSTON, S. D., HOLT, W. V. The Koala (*Phascolarctos cinereus*): A Case Study in the Development of Reproductive Technology in a Marsupial. **Reproductive Sciences in Animal Conservation, Advances in Experimental Medicine and Biology**, Nova York, v.753, p.171-203, 2014.

JUNGNICKEL, M. K.; MOLINIA, F.C.; HARMAN, A. J.; RODGER, J. C. Sperm transport in the female reproductive tract of the brushtail possum, *Trichosurus Öulpecula*, following superovulation and artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.59, n.3-4, p.213–228, 2000.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL E.; BOIXO, J. C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered postmortem. **Theriogenology**, Los Altos, v.49, n.1, p.1249-1259, 2003.

KEELEY, T.; HARRIS, M.; MCGREEVY, P. D.; HUDSON, D.; O'BRIEN, J. K. Development and evaluation of electroejaculation techniques in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisi*). **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v.24, n.7, p.1008–1018, 2012.

KEELEYA, B.; MCGREEVYA, J. K.; O'BRIENA, C. Cryopreservation of epididymal sperm collected postmortem in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisi*). **Theriogenology**, Los Altos, v.78, n.2, p.315–325, 2012.

LANGE, R.B. & E.F. JABLONSKI. 1998. Mammalia do Estado do Paraná: Marsupialia. **Estudos de Biologia**, Curitiba, v.43, p.15-224.

LESSA, L. G.; GEISE, L. Hábitos alimentares de marsupiais didelfídeos brasileiros: análise do estado de conhecimento atual. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v.14, n.4, p.901-910, 2010.

LOI, P.; PTAK, G.; BARBONI, B.; FULK JUNIOR, J.; CAPPAL, P.; CLINTON, M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. **Nature Biotechnology**, Nova York, v.19, n.10, p. 962-964, 2001.

MARATA, S. M. A.; CASTRO, D. F. P.; OCAMPO, L. C.; OCAMPO, M. B.; GAJETON, M. B. Evaluation of Epididymal Sperm from Post-Mortem Derived Cauda Epididymides of Ram (*Ovis aries*). **International Journal of Agricultural Technology**, Zhejiang, v.13, n.7, p.1645-1657, 2017.

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

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MARCIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, Los Altos, v.65, n.3, p.471–485, 2006.

MCCLEAN, R.; MACCALLUM, C.; BLYDE, D.; HOLT, W. V.; JOHNSTON, S. Ultrastructure, osmotic tolerance, glycerol toxicity and cryopreservation of caput and cauda epididymidal kangaroo spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v.18, n.4, p.469–476, 2006.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Conservação *in situ*, *ex situ* e *on farm***. Sem data. Apresenta os métodos de conservação *in situ* e *ex situ*. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-e-on-farm>. Acesso em: 03 de maio de 2019.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Impactos sobre a Biodiversidade**. Sem data. Apresenta os processos que causam impactos sobre a biodiversidade do país. Disponível em <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-global/impactos>. Acesso em 30 de abril de 2019.

MOTA FILHO, A. C., DA SILVA, L. D. M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.6, n.1, p.1-8, 2012.

MOTTA, M. F. D. **Estudo do desenvolvimento extra-uterino de *Didelphis aurita* (WIED, 1826) em cativeiro – investigação de critérios para**

**estimativa de idade.** 1988. 120f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

NASCIMENTO, C. C.; HORTA, M. C. Didelphimorphia (Gambá e Cuica). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animias Selvagens** – Medicina Veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Roca, 2014. cap.32, p.682-706.

NOGUEIRA, C. J. Morfologia do sistema genital masculino de marsupiais brasileiros. In: CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. **Os marsupiais do Brasil** – biologia, ecologia e evolução. 2.ed. Campo Grande: UFMS, 2012. cap.11, p.245-258.

NOGUEIRA, J. C.; REDINS, C. A. Modificações sazonais na ultra-estrutura das glândulas bulbouretrais do gambá *Didelphis albiventris* (Marsupialia). **XII Colóquio Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica**, Caxambu, v.1, n.9, p.163-164, 1989.

OLIVA S. U.; RINALDO P. A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: Maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v.33, n.4, p.419-425, 2009.

OLIVEIRA, A. K. M.; LEME, F. T. F. *Didelphis albiventris* como indutor de germinação de *Rapanea ferruginea* (Myrcinaceae) em área de Cerrado, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia** - Série Zoologia, Porto Alegre, v.103, n.4, p.361-366, 2013.

OLIVEIRA, M. L.; FERREIRA, R. M.; GOMES, M. P.; ILHA, D. S.; LORENZON, C. S.; DUARTE, J. B. M. Estudo populacional de gambás, *Didelphis albiventris* (Mammalia, Didelphidae), em um pequeno fragmento florestal. **Mastozoologia Neotropical**, Buenos Aires, v.17, n.01, p.161-165, 2010.

ONU. Organização das Nações Unidas. Biodiversidade desaparece a velocidade mil vezes mais rápida por causa do homem alerta ONU, 2018. Apresenta o impacto das ações do homem sob a natureza. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/biodiversidade-desaparece-a-velocidade-mil-vezes-mais-rapida-por-causa-do-homem-alerta-onu/>. Acesso em: 06 de maio de 2019.

PAIVA, J. R. Conservação *ex situ* de recursos genéticos de plantas na região tropical úmida. **Acta Amazonica**, Manaus, v.24, n.1/2, p.63-80, 1994.

PAULA, T. A. R. Reprodução de carnívoros silvestres. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.130-132, 2011.

POUGH, F. H; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 699p.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. 1.ed. Londrina: Planta, 2011. 327p.

- REIS, N. R.; SHIBATA, O. A.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Sobre os mamíferos do Brasil. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 1.ed. Brasil, Londrina: Eduel, 2006. cap.05, p.126-133.
- RODGER, J. C.; PARIS, D. B. B. P.; CZARNY, N. A.; HARRIS, M. S.; MOLINIA, F. C.; TAGGART, D. A.; ALLEN, C. D.; JONHSTON, S. D. Artificial insemination in marsupials. **Theriogenology**, Los Altos, v.71, n.1, p.176–189, 2009.
- ROSSI, R. V.; BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. Ordem Didelphimorphia. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 1.ed. Londrina: Eduel, 2006, cap.05, p.126-133.
- ROY, P. S.; TOMAR, S. Landscape cover dynamics pattern in Meghalaya. **International Journal of Remote Sensing**, v.22, n.18, p.3813-3825, 2001.
- SÁ, E. F. G. G.; MENDES, D. A. S.; CHEUNG, K. C. Levantamento e caracterização de *Didelphis albiventris* (Lund 1840) em fragmentos de Cerrado na Fazenda Cervinho, Bandeirantes, MS, Brasil. **Multitemas**, Campo Grande, n.45, p.83-102, 2014.
- SAMOTO, V. Y.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; PEREIRA, F. T. V.; LIMA, M. C.; CARAVLHO, A. F. Morfologia da glândula mamária de gambás da espécie *Didelphis* sp. associada ao modelo marsupial. **Biota Neotropica**, Campinas, v.6, n.2, 12p., 2006.
- SCHIMMING, B. C.; CESARIO, M. D.; MATHEUS, S. M. M. Morphology of the vaginal complex in the white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): Gross anatomy and light microscopy. **Journal of Veterinary Medicine Series C – Anatomy Histology Embryology**, Berlim, v.47, n.6, p.566-572, 2018.
- SILVA, A. C. B. **Evolução do dimorfismo sexual e das estratégias bionômicas em marsupiais neotropicais (Didelphimorphia, Didelphidae)**. 2012. 178f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SMITHSONIAN ZOO. Smithsonian National Zoological Park. Cheetah Sperm Quality, 2015. Apresenta dados sobre a qualidade espermática dos exemplares do zoológico. Disponível em: <https://nationalzoo.si.edu/center-for-species-survival/news/cheetah-sperm-quality>. Acesso em: 05 de junho de 2019.
- TIPLADY C. A.; MORRIS L. H. A.; ALLEN, W. R. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. **Theriogenology**, Los Altos, v.58, n.2, p.225-228, 2002.
- TORONGA ZOO. Toronga Conservation Society Australia. **Aussie Baby Boom, 2014**. Anuncia os filhotes de coala que saíram do marsúpio da mãe. Disponível em: <https://taronga.org.au/news/2018-07-11/aussie-baby-boom>. Acesso em :12 de maio de 2019.

TORONGA ZOO. Toronga Conservation Society Australia. **Zoos Join Battle to Save Tasmanian Devils, 2008**. Demonstra o trabalho em equipe de zoológicos para promover a preservação do diabo da Tasmânia. Disponível em: <https://taronga.org.au/media/media-release/2018-07-11/zoos-join-battle-save-tasmanian-devils>. Acesso em: 12 de maio de 2019.

TYNDALE-BISCOE, H. **The life of marsupials**. 1.ed. Austrália: CSIRO Publishing, 2005. 465p.

WITT, R. R.; RODGER, J. C. Recent advances in tools and technologies for monitoring and controlling ovarian activity in marsupials. **Theriogenology**, Los Altos, v.15, n.109, p.58–69, 2018.

WOELDERS, H.; ZUIDBERG, C. A.; HIEMSTRA, S. J. Animal Genetic Resources Conservation in The Netherlands and Europe: Poultry Perspective. **Poultry Science**, Champaign, v.85, n.2, p.216–222, 2006.

ZOOLÓGICO DE BRASÍLIA. Fundação Jardim Zoológico de Brasília. **Programa de Reprodução para Conservação, 2019**. Descreve o trabalho de conservação por meio da reprodução e outras áreas no zoológico de Brasília. Disponível em: <http://www.zoo.df.gov.br/programa-de-reproducao-para-conservacao/>. Acesso em: 06 de junho de 2019.

## CAPÍTULO 2

### COLHEITA DE EPIDÍDIMO E AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA *POST-MORTEM* DE *Didelphis albiventris* (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE): Relato de Caso

Thaís Cardoso Lettieri; Líria Queiroz Luz Hirano

#### RESUMO

A biodiversidade mundial está sob ameaça, principalmente devido às ações antrópicas que resultam na degradação do meio ambiente. O presente trabalho teve como objetivo relatar o emprego da técnica de colheita de espermatozoides epididimários *post-mortem* e a avaliação espermática de um exemplar adulto de *Didelphis albiventris*. Um saruê adulto, macho, foi encaminhado para atendimento médico veterinário com suspeita de fratura em crânio. Diante da severidade das lesões e para abreviar o sofrimento do animal, foi indicada a eutanásia. O escroto contendo testículos e epidídimos foi retirado após o óbito do animal e acondicionado em um refrigerador à 4°C. No dia seguinte, os órgãos foram individualizados para realização da colheita de espermatozoides por meio da técnica de fatiamento (*slicing*) da cauda dos epidídimos. Para avaliação espermática, foram confeccionadas uma lâmina sem corante, para análise de motilidade e vigor, uma lâmina corada com rosa bengala, para avaliação morfológica, e uma última corada com eosina nigrosina, para avaliação da membrana. O ejaculado apresentou 1 de vigor e 20% de motilidade. Foram analisados 101 gametas e desses, 72 (71,29%) possuíam a membrana íntegra e 29 (28,71%) apresentaram o envoltório alterado; 64 (63,36%) espermatozoides possuíam a morfologia ideal e 37 (36,371%) apresentaram defeito. Considera-se o trabalho relevante, uma vez que é o primeiro relato de avaliação de colheita de gametas via epidídimo em marsupiais brasileiros, e o conhecimento gerado pode auxiliar na criação de protocolos para espécies de marsupiais ameaçadas de extinção.

**PALAVRAS-CHAVES:** Conservação, marsupiais, saruê, reprodução animal.

*COLLECTION OF Didelphis albiventris EPIDIDYMAL SPERMATOZOA AND  
POSTMORTEM EVALUATION: Case report*

## **ABSTRACT**

Global biodiversity is under threat, mainly because of anthropogenic actions that result in environment degradation. Thinking about it, the case report aimed to report the use of the technique of collection *post-mortem* epididymal spermatozoa and the sperm evaluation by an adult specimen *Didelphis albiventris*. An adult, male, white-eared-opossum was referred to veterinary care with facial fracture suspected. Viewing the severity of the lesions and for abbreviate the animal suffering, euthanasia was indicated. The scrotum containing testis and epididymis was removed after death and placed in a refrigerator at 4°C. On the next day, the organs were individualized to the collection of spermatozoa by the slicing technique from the tail of the epididymis. For sperm evaluation, a slide was prepared for motility and vigor analysis, a staining with rose bengal for morphological analysis, and one stained with eosin nigrosin, for membrane evaluation. The ejaculate presented 1 of vigor and 20% of motility. One hundred and one gametes were analyzed and 72 (71.29%) had the whole membrane and 29 (28.71%) presented a damaged envelope; 64 (63.36%) spermatozoa had the ideal morphology and 37 (36.371%) presented defects. The work is considered relevant, since it is the first report of collection of gametes in Brazilian marsupials *post-mortem*, and the generated knowledge can help in the elaboration of standard protocols for threatened marsupial species.

**KEY-WORDS:** Conservation, marsupials, white-eared-opossum, animal reproduction.

## 2.1 Introdução

De acordo com a IUCN, a biodiversidade do planeta diminuiu drasticamente nas últimas décadas. Mais de 27 mil espécies da fauna e da flora mundial estão classificadas em uma das categorias ameaçadas de extinção (IUCN, 2019). A IUCN funciona como um “barômetro da vida silvestre” que analisa, sobretudo, a ação antropológica sobre os outros seres vivos e guia as informações sobre o estado de ameaça e as ações de conservação necessárias e existentes para a manutenção de cada espécie.

O Brasil é o país com a maior biodiversidade mundial e possui mais de 128 mil espécies de animais, entre vertebrados e invertebrados. Segundo o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), 1173 espécies brasileiras estão presentes na lista oficial das ameaçadas de extinção, elaborada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), o que ressalta a necessidade de desenvolver metodologias para auxiliar na conservação da fauna nativa (ICMBIO, 2018). Nesse vasto campo de atuação, a biotecnologia da reprodução é uma área de conhecimento com grande potencial (LOI et al., 2001).

Dentre as várias vertentes alcançadas com o emprego de biotécnicas da reprodução na medicina veterinária, está o desenvolvimento de ferramentas para a preservação de animais silvestres ameaçados (DOMINGUES et al., 2011). Segundo ANDRABI & MAXWELL (2007), essas auxiliam principalmente na preservação *ex situ* e são empregadas com o intuito de promover a variabilidade genética e demográfica, a partir do desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida (TRA), como a inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), fertilização *in vitro* (FIV), manipulação e criopreservação dos gametas.

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) descreve alguns métodos de colheita de sêmen, como o uso de vagina artificial, manipulação manual do pênis, eletroejaculação, colheita farmacológica e a colheita de espermatozoides a partir dos epidídimos. No caso de animais domésticos, MOTA FILHO & DA SILVA (2012) e ASSUMPÇÃO et al. (2016)

relatam que a colheita de espermatozoides epididimários em animais mortos é uma interessante alternativa em casos de machos que possuem um alto valor genético, como touros e garanhões.

No Brasil há a ocorrência natural de três gêneros da superordem Marsupialia, sendo que a espécie *Monodelphis unistriata* se encontra classificada como criticamente em perigo de extinção. Esse fato ressalta a necessidade de criação de projetos que auxiliem na preservação dos marsupiais nativos, porém, não se pode ignorar a preocupação com espécies que, apesar de não estarem presentes na lista vermelha da IUCN, sabidamente sofrem declínio populacional (REZENDE, 2013).

O gênero *Didelphis* apresenta grande semelhança, em relação à anatomia do sistema reprodutor e aos processos embrionários, com a maior parte das espécies da superordem Marsupialia, inclusive as que habitam outros continentes (BARROS et al., 2013). O fato de estarem classificados como pouco preocupantes em relação ao estado de conservação faz com que esses animais sejam excelentes modelos para bases de estudos e pesquisas sobre a reprodução de espécies ameaçadas.

Em vista à necessidade de pesquisas sobre métodos para auxiliar na reprodução e conservação de marsupiais brasileiros, o presente trabalho tem

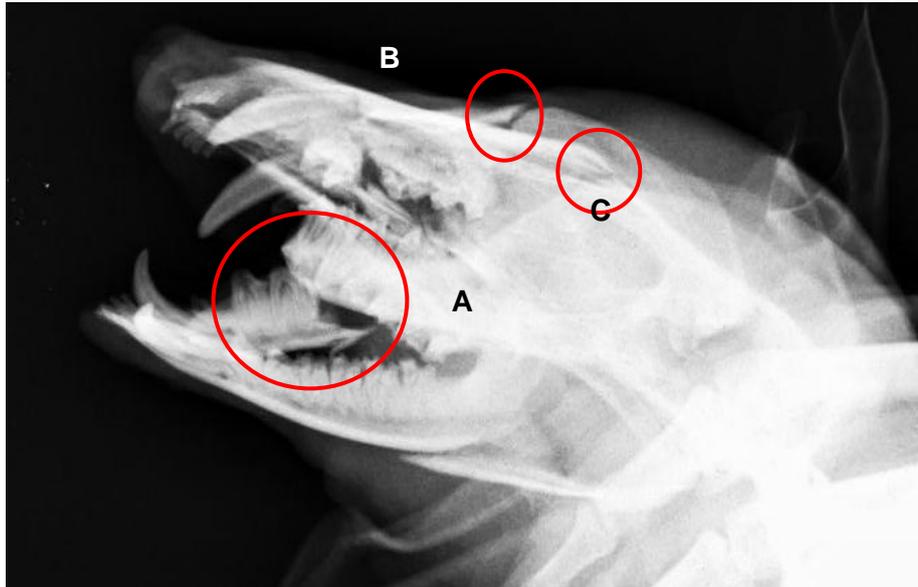
como objetivo relatar a colheita *post-mortem* de epidídimo e a avaliação espermática de um exemplar de *Didelphis albiventris*.

## 2.2 Relato de caso

No dia 8 de maio de 2019, um espécime adulto de *Didelphis albiventris*, macho, foi encaminhado pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres do Distrito Federal (CETAS-DF) para atendimento médico veterinário no Setor de Animais Silvestres do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (HVET-UnB), sem histórico prévio.

Durante a avaliação física do animal, foi observada presença de fratura exposta na mandíbula e lesões na cabeça. Para investigação da extensão das lesões, solicitou-se o exame de radiografia de crânio, face e

membros, no qual observou-se fratura no ramo direito da mandíbula, no osso frontal e no osso zigomático (Figura 6).



**Figura 6** - Exame radiográfico de cabeça de *Didelphis albiventris* adulto, projeção látero-lateral. Nota-se a presença de fraturas nos ossos da mandíbula (A), zigomático (B) e frontal (C). (Fonte: Imagem cedida pelo Serviço de Diagnóstico por Imagem do HVet-UnB).

Diante da extensão das fraturas e gravidade do caso, em que o animal apresentava dispneia e angústia respiratória, optou-se por realizar a eutanásia, com o intuito de abreviar o sofrimento do paciente. O protocolo utilizado foi a associação de xilazina<sup>1</sup> 1 mg/kg + cetamina<sup>2</sup> 30 mg/kg + diazepam<sup>3</sup> 2 mg/kg, em uma mesma seringa, por via intramuscular. Após constatação de sedação profunda, foi realizada a administração intravenosa (IV) de propofol<sup>4</sup> 30 mg/kg seguida pela injeção de cloreto de potássio<sup>5</sup> 100 mg/kg, pela mesma via.

Assim que se confirmou o óbito a partir da presença de assistolia, foi feita a retirada dos testículos, juntamente com a bolsa escrotal, com lâmina de bisturi tamanho 21. Os órgãos foram armazenados em um pequeno recipiente plástico com tampa, guardado sob refrigeração à 4° C, durante 20 horas.

Anteriormente à dissecação do epidídimo, os testículos foram pesados, juntamente com a bolsa escrotal, com um total de 4,31 g (Figura 7A). Além disso, realizou-se a biometria da estrutura que mediu 1,0 x 2,5 x 1,8 cm (altura x comprimento x largura) (Figuras 7B, C, D).

Após feitas as anotações, iniciou-se o procedimento de dissecação do testículo e separação dos epidídimos para a colheita (Figura 8). Devido ao tamanho reduzido do material, foi escolhida a técnica de fatiamento da cauda do epidídimo, conhecida também como *slicing*. Para tanto, o órgão foi cortado várias vezes em pequenos pedaços, sem diluidor, e foi realizada a extração do líquido espermático composto pelos espermatozoides do saruê.



**Figura 7** - Pesagem (A) e biometria de altura (B), comprimento (C) e largura (D) de escroto, contendo testículos e epidídimos, de *Didelphis albiventris* adulto. (Fonte: Arquivo pessoal).

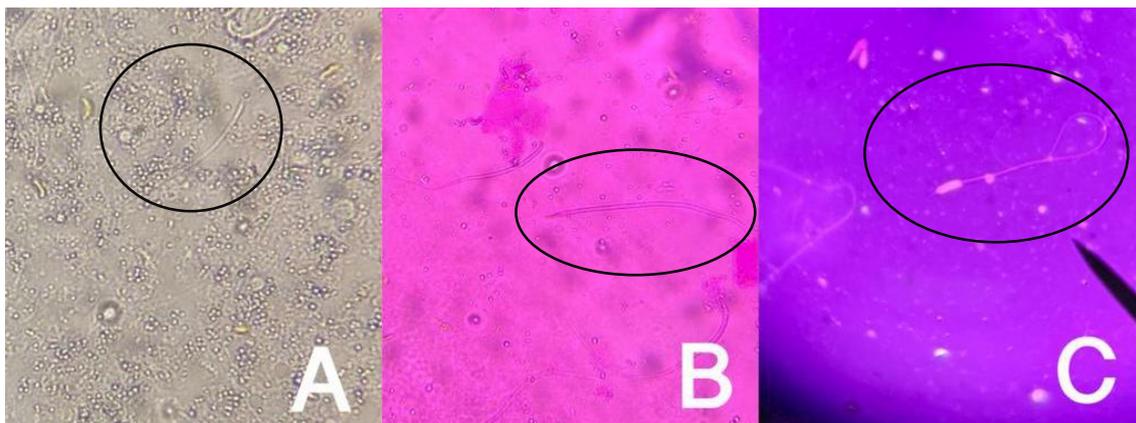


**Figura 8** - Epidídimos e testículos de *Didelphis albiventris* adulto. (Fonte: arquivo pessoal).

O volume extraído dos epidídimos foi extremamente pequeno, o que impossibilitou realizar a análise de concentração. Foram confeccionadas três lâminas por meio da técnica de *imprinting*, sendo a primeira lâmina sem corante (Figura 9A), para avaliação do vigor e motilidade. As outras duas foram coradas com corante rosa bengala (Figura 9B), para avaliação morfológica dos espermatozoides, ou com corante eosina nigrosina (Figura 9C), para análise da integridade da membrana e avaliação morfológica. As amostras foram analisadas com o auxílio de um microscópio óptico<sup>6</sup>.

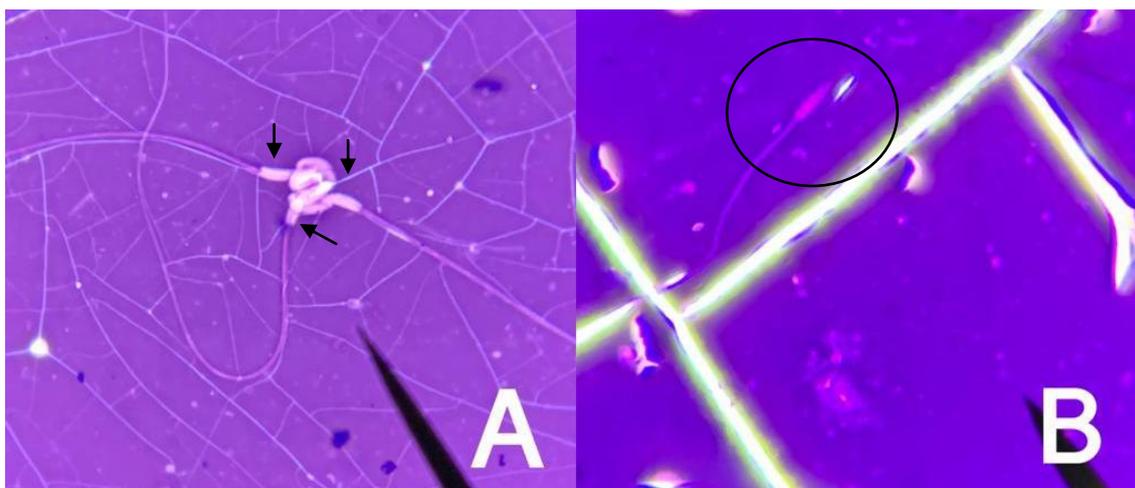
Na análise de vigor e motilidade, a classificação foi 1 (0/5) e 20% (0/100%), respectivamente. As lâminas com corantes foram analisadas no dia seguinte do preparo, por motivos de logística de horário do uso do laboratório da instituição. Assim, a lâmina feita com o corante rosa bengala secou e a sua leitura se tornou inviável, portanto, para análise de membrana e de morfologia foi utilizada apenas a lâmina com o corante de eosina nigrosina.

6. Aparelho de microscopia ótica da marca Olympus<sup>®</sup>, modelo BX 41, fabricado pela Olympus Corporation, Tóquio, Japão.



**Figura 9** - Microscopia de lâminas de líquido espermático colhido *post-mortem* da cauda de epidídimo de *Didelphis albiventris* adulto. A: Lâmina sem corante. B: Lâmina com corante rosa bengala. C: Lâmina corada com eosina nigrosina. Aumento de 400x, 400x e 1000x, respectivamente. Os círculos apontam espermatozoides visualizados nas três lâminas preparadas. (Fonte: arquivo pessoal).

Devido o ressecamento da amostra, foram analisados apenas 101 espermatozoides, e não 200 como preconizado pelo CBRA. Dos 101 espermatozoides avaliados, 72 (71,29%) possuíam a membrana íntegra (Figura 10A) e 29 (28,71%) apresentaram a membrana corada (Figura 10B).



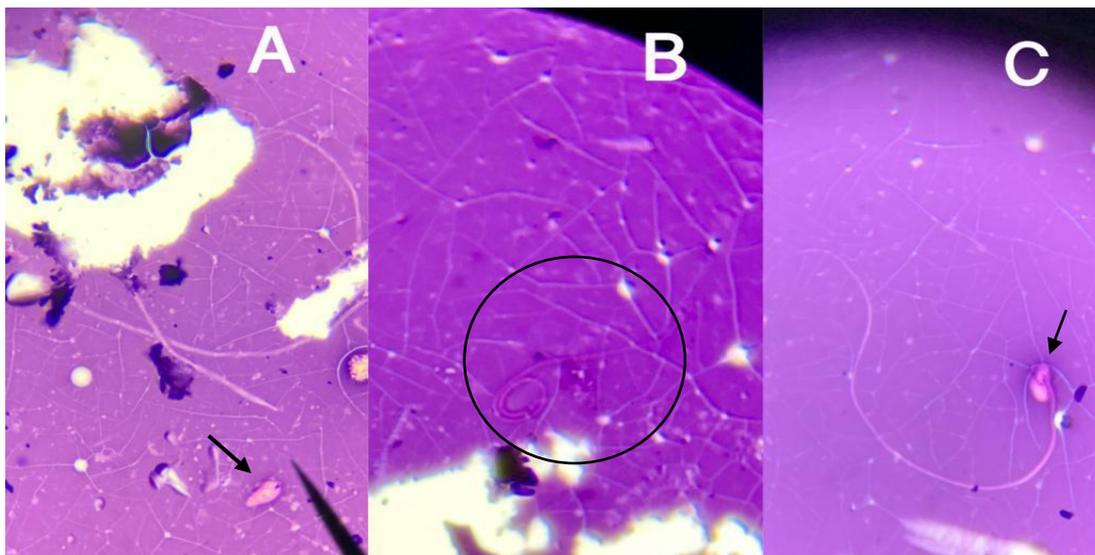
**Figura 10** - Análise microscópica da integridade de membrana de espermatozoides de *Didelphis albiventris* adulto, com colheita *post-mortem* da cauda do epidídimo. A: Membrana íntegra (seta). B: Membrana corada (círculo). Aumento de 1000x. (Fonte: arquivo pessoal).

Os defeitos foram classificados como menores ou maiores, de acordo com o manual do CBRA (2013). Os menores são defeitos considerados de pouca importância, pois não afetam diretamente na fertilidade e podem ser compensados na inseminação. Os defeitos maiores se relacionam à produção do espermatozoide, e indicam patologias no testículo ou epidídimo, de forma que não há método de compensação, o que reduz a taxa de fertilidade do reprodutor (ARRUDA et al., 2015). Dos 101 gametas analisados, 64 (63,36%) espermatozoides possuíam a morfologia ideal e 37 (36,37%) apresentaram defeito.

O defeito menor detectado foi a cauda enrolada, que foi observado em nove (8,91%) espermatozoides (Figura 11). Os defeitos maiores constatados foram 16 (15,84%) gametas com cabeça decapitada (Figura 12A), dez (9,9%) com a cauda fortemente enrolada (Figura 12B), e dois (1,98%) com fratura de peça intermediária (Figura 12C), em um total de 28 (27,72%) espermatozoides com essa classificação.

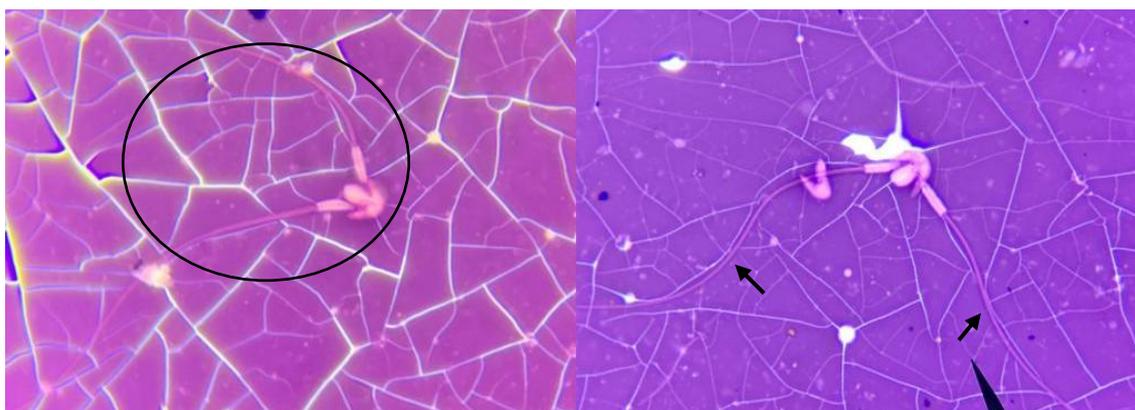


**Figura 11** - Avaliação microscópica de espermatozoide com a cauda enrolada, colhido *post-mortem* do epidídimo de *Didelphis albiventris* adulto. Aumento de 1000x. (Fonte: Arquivo pessoal).



**FIGURA 12** - Avaliação microscópica de defeitos maiores encontrados em espermatozoides colhidos *post-mortem* do epidídimo de *Didelphis albiventris* adulto. A: Cabeça decapitada (seta). B: Cauda fortemente enrolada (círculo). C: Fratura de peça intermediária (seta). Aumento de 1000x. (Fonte: Arquivo pessoal).

Pôde-se notar também que os espermatozoides, em sua grande maioria, formavam pares e possuíam um longo flagelo (Figura 13). Cerca de 67% dos espermatozoides se encontravam pareados.



**Figura 13** - Imagem de microscopia com presença da formação de pares de espermatozoides (círculo) e o longo flagelo (setas) dos gametas colhidos *post-mortem* da cauda de epidídimo de *Didelphis albiventris* adulto. Aumento de 1000x. (Fonte: Arquivo pessoal).

## 2.3 Discussão

TYNDALE-BISCOE (2005) considera interessante a análise dos espermatozoides de marsupiais, visto que existem particularidades ligadas à diferentes famílias dessa superordem, como por exemplo, o formato da cabeça. O autor afirma que esses animais possuem os gametas masculinos mais longos que se tem relato, de forma que os de *Tarsipes* sp. são os maiores já descritos, com 4,5x o tamanho do espermatozoide humano. PHILLIPS & DRYDEN (1991) explicam que o tamanho do flagelo está relacionado ao índice de motilidade do espermatozoide, logo, gametas com maior flagelo possuem maior motilidade e vigor. No presente trabalho, a mensuração do flagelo não foi realizada, porém percebeu-se que esses são mais longos do que dos animais domésticos, indo ao encontro das informações obtidas em estudos com representantes australianos.

TEMPLE-SMITH (1994) relata que acrossoma dos gametas de marsupiais Didelphidea, Dasyuridae e *Tarsipes rostratus*, também é diferente quando comparado aos dos espermatozoides de mamíferos eutérios. No caso do primeiro grupo, a estrutura se apresenta de maneira assimétrica ao longo da parte dorsal do núcleo do espermatozoide, facilitando a penetração do espermatozoide no oócito. Entretanto, a simetria do acrossomo não foi analisada neste estudo.

A ocorrência de pareamento de espermatozoides em *D. albiventris* é considerada uma característica comum em marsupiais neotropicais, mas não é relatado em espécies australianas. BIGGERS & CREED (1962) associam o pareamento de gametas à maturação espermática que ocorre nos epidídimos. Mas TAGGART et al. (1993) e MOORE & TAGGART (1995) também correlacionam esse achado a uma estratégia para aumentar o índice de motilidade. Em representantes do gênero *Monodelphis*, esse fenômeno se inicia no segmento proximal do corpo do epidídimo, de forma que na cauda, 80% dos gametas se encontram pareados. Neste relato, foi observado que, aproximadamente, 67% dos espermatozoides estavam pareados, índice próximo do encontrado em estudos com representantes do gênero *Monodelphis*.

O vigor é classificado de 0 a 5, no qual em 0 as células encontram-se paradas e, em 5, apresentam movimentação do flagelo (BERGSTEIN et al., 2014). O CBRA aconselha que para ser considerado viável, o sêmen tenha no mínimo 3 de vigor (PAPA et al., 2014). No presente estudo, a amostra foi classificada como 1 para esse parâmetro, o que pode ser justificado pelo fato da refrigeração ter ocorrido em temperatura inferior aos 5 °C recomendados, aliado à falta de aquecimento da lâmina previamente à análise.

Em relação à motilidade, essa é classificada de 0% a 100%, na qual em 0%, todas as células estão mortas e em 100%, há movimento celular em todo o campo de análise. Ela é uma avaliação importante pois reflete a capacidade de fertilização do sêmen (BERGSTEIN et al., 2014). O CBRA exige que o ejaculado possua, no mínimo, 60% de motilidade no pré-congelamento (CBRA, 2013). No presente estudo foi encontrada uma motilidade de 20%, valor muito inferior ao preconizado pelo CBRA, entretanto, além da demora no processamento, deve-se salientar que o tipo de colheita também influencia na qualidade do material.

Semelhantemente a este estudo, KEELEY et al. (2011) utilizaram a técnica de *slicing* de cauda de epidídimos para a colheita de espermatozoide em diabos-da-Tasmânia. Após retirarem o testículo junto ao escroto, os autores acondicionaram a amostra em um plástico bolha, com refrigeração à -2°C durante 8 horas. Os autores encontraram 30% de motilidade, valores aproximados ao do *D. albiventris* deste estudo, o que reforça que a classificação de baixa motilidade pode estar correlacionada a características dos marsupiais. Adicionalmente, estudos apontam que a obtenção de espermatozoides pela colheita de epidídimo nesses animais resulta em uma motilidade inferior à pelo método de eletroejaculação (RODGER et al., 2009).

JOHNSTON et al. (2012) relatam que os espermatozoides da maioria dos marsupiais são mais sensíveis à alguns meios diluidores, crioprotetores, detergentes e à exposição ao ar ambiente. Isso porque seus gametas não possuem cisteínas no acrossoma, o que torna o núcleo mais instável. CZARNY et al. (2009) demonstraram que os espermatozoides na família Dasyuridae são resistentes à uma alta concentração de glicerol após o congelamento, em relação a danos morfológicos, mas por algum outro motivo, se tornam inviáveis. Esses fatos também podem justificar os valores reduzidos

de vigor e motilidade encontrados na amostra colhida de *D. albiventris* do presente estudo, além das falhas pré-analíticas discutidas anteriormente.

A avaliação morfológica é importante para classificar o potencial reprodutivo do macho. O CBRA (2013) aconselha que o ejaculado apresente no máximo 30% de defeitos no ejaculado, com 10% de defeitos maiores e 20% de defeitos menores. No caso da amostra de *D. albiventris*, observou-se porcentagem aproximada de defeitos (36,37%), entretanto, a proporção dos defeitos menores e maiores foi discrepante, com 8,91% e 27,72%, respectivamente. A integridade da membrana favorece a viabilidade seminal por garantir a homeostase (BERGSTEIN et al., 2014), por isso, a alta proporção de defeitos maiores também pode justificar a baixa classificação de motilidade e vigor.

Em diabos-da-Tasmânia, KEELEY et al. (2011) observaram defeitos de espermatozoides semelhantes aos relatados no presente estudo. Os autores citaram a ocorrência de separação de peça intermediária, cauda enrolada e cauda dobrada, mas não detalharam a porcentagem de observações dessas alterações, e também não classificaram em maiores e menores.

O sêmen de coalas colhido por meio da vagina artificial ou eletroejaculação, teve um índice de motilidade de 70% a 80% (JOHNSTON & HOLT, 2014). Esse resultado confirma o relato de que a colheita por esses métodos apresenta maiores índices de motilidade (RODGER et al., 2009). MACCALLUM & JOHNSTON (2005) relatam a colheita de espermatozoides epididimários em *Vombatus ursinus*. Os autores apresentaram a motilidade dos gametas em três momentos diferentes: refrigerados durante três a quatro horas (30%), congelados por 72 horas (20%), o epidídimo inteiro congelado por 72 horas (30%). Índices semelhantes ao encontrado para a taxa de motilidade (20%) do espermatozoide do espécime utilizado nesse estudo.

Apesar de alguns parâmetros das análises deste trabalho não se encontrarem dentro do padrão recomendado pelo CBRA, considera-se o mesmo relevante, uma vez que é o primeiro relato de avaliação de colheita e análise de gametas via epidídimo em marsupiais *Didelphis*, associado ao relato de maior sensibilidade dos gametas desses animais. Apesar da demora na

avaliação das amostras, os resultados foram próximos aos relatados para espécies de marsupiais australianos.

## 2.4 Conclusão

A amostra epididimária *post-mortem* do exemplar de *Didelphis albiventris* apresentou 1 de vigor e 20% de motilidade. Em relação aos defeitos morfológicos encontrados, observaram-se a presença de cauda enrolada, como defeito menor, além de cabeça decapitada, cauda fortemente enrolada e fratura de peça intermediária, como defeitos maiores.

Houve constatação de que os espermatozoides, em sua grande maioria, formavam pares, diferentemente do que ocorre em marsupiais de outros continentes. Por isso, ressalta-se o incentivo para o desenvolvimento de mais estudos acerca da aplicação de técnicas de reprodução assistida com o gênero *Didelphimorphia*, uma vez que o conhecimento pode subsidiar a criação de protocolos padrões para espécies de marsupiais neotropicais ameaçados de extinção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W. M. C. A review of reproductive biotechnologies for conservation of endangered species. **Animal Reproduction Science**, Nova York, v.99, n.1-2, p.223-243, 2007.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.47-60, 2015.

ASSUMPÇÃO, T. I.; SANTOS, A. L. Q.; MACEDO, G. G.; PEIXOTO, L. R.; ZAMPINI, A. C. A. Coleta e avaliação morfológica dos espermatozoides epididimários de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814. **VIII ENANSE – Encontro sobre animais selvagens**, Uberlândia, v.15, n.5, p.49-54, 2016.

BARROS, M. A.; MARTINS, J. F. P.; SAMOTO, V. Y.; OLIVEIRA, V. C.; GONÇALVES, N.; FURLANETO.MANÇANARES, C. A.; VIDANE, A.; CARVALHO, A. F.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Marsupial Morphology of Reproduction: South America Opossum Male Model. **Microscopy research and technique**, Nova York, v.76, n.4, p.388-397, 2013.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análises de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.38, n.4, p.189-194, 2014.

BIGGERS, J. D.; CREED, R. F. S. Conjugate Spermatozoa of the North American Opossum. **Nature**, Londres, v.196, n.4859, p.1112-1113, 1962.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 91p.

CZARNY, N. A.; HARRIS, M. S.; DE LULIIS, G. N.; RODGER, Acrosomal integrity, viability, and DNA damage of sperm from dasyurid marsupials after freezing or freeze drying. **Theriogenology**, Los Altos, v.72, n.6, p.817–825, 2009.

DOMINGUES, S.F.S.; LIMA, J.S.; OLIVEIRA K.G.; SANTO, R.R. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação in situ de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.124-129, abr./jun. 2011.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Fauna Brasileira**. Sem data. Apresenta a biodiversidade do país. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira>. Acesso em: 31 de março de 2019.

IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources - **The Red List of Threatened Species**. Background & History, 2019. Descreve o papel da IUCN. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/about/background-history>. Acesso em: 09 de abril de 2019.

JOHNSTON, S. D., HOLT, W. V. The Koala (*Phascolarctos cinereus*): A Case Study in the Development of Reproductive Technology in a Marsupial. **Reproductive Sciences in Animal Conservation, Advances in Experimental Medicine and Biology**, Nova York, v.753, p.171-203, 2014.

JOHNSTON, S. D.; SATAKE, N.; ZEE, Y.; LÓPEZ-FERNANDEZ, C.; HOLT, W. V.; GOSÁLVEZ, J. Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. **Reproduction**, Cambridge, v.143, n.6, p.787-797, 2012.

KEELEY, T.; MCGREEVY, P. D.; O'BRIEN, J. K. Characterization and short-term storage of Tasmanian devil sperm collected post-mortem. **Theriogenology**, Los Altos, v.76, n.4, p.705-714, 2011.

LOI, P.; PTAK, G.; BARBONI, B.; FULK JUNIOR, J.; CAPPAL, P.; CLINTON, M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. **Nature Biotechnology**, Nova York, v.19, p. 962-964, 2001.

MACCALLUM, C.; JOHNSTON, S. D. Studies on the cryopreservation of common wombat (*Vombatus ursinus*) spermatozoa. **Reproduction, fertility, and development**, East Melbourne, v.17, n.7, p.727-732, 2005.

MOORE, H. D. M.; TAGGART, D. A. Sperm Pairing in the Opossum Increases the Efficiency of Sperm Movement in a Viscous Environment. **Biology of reproduction**, Champaign, v.52, p.947-953, 1995.

MOTA FILHO, A. C., DA SILVA, L. D. M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.6, n.1, p.1-8, 2012.

PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA JR, J. A.; MONTEIRO, G. A.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; NETO, C. R. **Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino**. 1.ed. Botucatu: Botupharma, 2014. 60p.

PHILLIPS, D. M.; DRYDEN, G. L. Comparative Morphology of Mammalian Gametes. In: DUNBAR, B. S.; O'RAND, M. G. **A Comparative Overview of Mammalian Fertilization**. 1.ed. Boston: Springer US, 1991, cap.2, p.37-50.

QUEIROZ, G. F.; NOGUEIRA, J. C. Espermatogênese no gambá *Didelphis albiventris*. In: CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. **Os marsupiais do Brasil – biologia, ecologia e evolução**. 2.ed. Campo Grande: UFMS, 2012. cap.9, p.199-216.

REZENDE, D. T. **Modelos aplicados ao estudo de mamíferos deficientes em dados no Brasil**: identificação de áreas para amostragem e estimativa de custos para obtenção de informações. 2013. 92f. Dissertação (Mestrado em

Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RODGER, J. C.; PARIS, D. B. B. P.; CZARNY, N. A.; HARRIS, M. S.; MOLINIA, F. C.; TAGGART, D. A.; ALLEN, C. D.; JONHSTON, S. D. Artificial insemination in marsupials. **Theriogenology**, Los Altos, v.71, n.1, p.176–189, 2009.

TAGGART, D. A.; JOHNSON, J. L.; O'BRIEN, H. P.; MOORE, H. D. M. Why Do Spermatozoa of American Marsupials Form Pairs? A Clue From the Analysis of Sperm-Pairing in the Epididymis of the Grey Short-Tailed Opossum, *Monodelphis domestica*. **The Anatomical Record**, Nova York, v.263, n.3, p.465-478, 1993.

TEMPLE-SMITH, P. D. Comparative Structure and Function of Marsupial Spermatozoa. **Reproduction, fertility, and development**, East Melbourne, v.6, n.4, p.421-435, 1994.

TYNDALE-BISCOE, H. **The life of marsupials**. 1.ed. Austrália: CSIRO Publishing, 2005. 465p.

## CAPÍTULO 3

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preocupação com a conservação da biodiversidade mundial é um tema importante e presente nas pautas de reuniões para acordos mundiais, visto a grande influência que cada espécie tem sobre o equilíbrio do meio ambiente. Nesse contexto, os marsupiais são considerados animais de relevante importância para o equilíbrio dos ecossistemas, por ocuparem diferentes posições nos nichos ecológicos, promoverem o controle populacional de pequenos vertebrados e invertebrados, e participarem do processo de dispersão de sementes.

O Brasil possui diversas espécies da superordem Marsupialia, das quais uma se encontra em crítico perigo de extinção e, para outras, ainda há pouco conhecimento da dinâmica das populações. A espécie *Didelphis albiventris* demonstra grande potencial para uso como modelo biológico na realização de estudos acerca da fisiologia e reprodução dos marsupiais neotropicais. Isso porque é uma espécie abundante que habita locais antropizados, e frequentemente é encaminhada aos órgãos ambientais, além do fato de sua manutenção e reprodução em cativeiro já serem realizadas em biotérios de pesquisa.

Há estudos acerca do emprego de biotécnicas de reprodução em marsupiais do continente Oceania, como o canguru e o coala, porém, há necessidade de ampliação de pesquisas com marsupiais neotropicais. A técnica de *slicing* demonstrada no presente estudo, mostrou-se promissora para realizar a colheita e análise morfológica de espermatozoides epididimários de *Didelphis albiventris*, entretanto, sugere-se a realização de estudos com maior número de amostras, padronização das fases pré e analíticas, e redução do intervalo de tempo entre a colheita, o processamento e a avaliação das amostras.

A realização de mais estudos na área de reprodução de marsupiais neotropicais, análise morfológica de gametas e fisiologia reprodutiva, mostra-se importante para criar um banco de dados e protocolos para as técnicas de reprodução assistida para esses animais.