UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANA PAULA GRABNER

Análise comparativa dos aspectos da ultraestrutura do espermatozoide
de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*)
e Bugio (*Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*)

São Paulo
2016

ANA PAULA GRABNER

Análise comparativa dos aspectos da ultraestrutura do espermatozoide
de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*)
e Bugio (*Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*)

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Reprodução Animal
da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcílio Nichi

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3325
FMVZ

Grabner, Ana Paula

Análise comparativa dos aspectos da ultraestrutura do espermatozoide de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) e Bugio (*Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*) / Ana Paula Grabner. -- 2016.
125 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcílio Nichi

1. Primatas neotropicais. 2. Reprodução. 3. Microscopia eletrônica de transmissão.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise comparativa dos aspectos da ultraestrutura do espermatozoide de Mico-Leão-e-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) e Bugio (*Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*).", protocolado sob o CEUA nº 5543040214, sob a responsabilidade de **Marcílio Nichi e equipe; Ana Paula Grabner; Fernanda Maria de Carvalho; Paloma Rocha Arakaki; Rodrigo Del Rio do Valle** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) na reunião de 05/05/2016.

We certify that the proposal "Ultrastructure characteristics comparative analysis of spermatozoa from Golden-headed Lion Tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) an Howler Monkey (*Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans*).", utilizing 8 Non-human primates (8 males), protocol number CEUA 5543040214, under the responsibility of **Marcílio Nichi and team; Ana Paula Grabner; Fernanda Maria de Carvalho; Paloma Rocha Arakaki; Rodrigo Del Rio do Valle** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 05/05/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2016** a **06/2016**

Área: **Reprodução Animal**

Procedência: **Animais de proprietários**

Espécie: **Primatas não-humanos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 20 anos**

N: **2**

Linhagem: **Alouatta caraya**

Peso: **5 a 15 kg**

Procedência: **Animais de proprietários**

Espécie: **Primatas não-humanos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 20 anos**

N: **2**

Linhagem: **Brachyteles arachnoides**

Peso: **8 a 20 kg**

Procedência: **Animais de proprietários**

Espécie: **Primatas não-humanos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 20 anos**

N: **2**

Linhagem: **Leontopithecus chrysomelas**

Peso: **300 a 1500 g**

Procedência: **Animais de proprietários**

Espécie: **Primatas não-humanos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 20 anos**

N: **2**

Linhagem: **Alouatta guariba clamitans**

Peso: **5 a 15 kg**

Resumo: O presente projeto visa a colheita, processamento e análise dos espermatozoides de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*), Muriqui-do-Sul (*Brachyteles arachnoides*) e Bugio (*Alouatta caraya*) (três primatas) descrevendo-os e comparando-os quanto à ultraestrutura, utilizando-se para isso de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, bem como, descrever e comparar a ultraestrutura do espermatozoide de *L. chrysomelas*, *B. arachnoides* e *A. caraya*; Desenvolver um método para o preparo de sêmen para microscopia eletrônica, contribuindo para os estudos da morfologia celular e reprodução assistida em prol da preservação das espécies.

Local do experimento: As colheitas de sêmen serão realizadas nas instituições mantenedoras das devidas espécies animais: CEMPAS da UNESP Botucatu (*Alouatta caraya*), Zoológico de Sorocaba (*Brachyteles arachnoides*) e Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (*Leontopithecus chrysomelas* e *Alouatta guariba clamitans*). As análises iniciais do sêmen serão processadas no próprio ambiente de colheita, e continuadas no Departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo, campus Cidade Universitária. A microscopia eletrônica será processada nos laboratórios do ICB I da USP SP e no Departamento de Anatomia da USP SP.

São Paulo, 13 de maio de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 13 de maio de 2016
CEUA N 5543040214

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Marcílio Nichi

Área: Reprodução Animal

Marcílio Nichi (orientador)

Título do projeto: "Análise comparativa dos aspectos da ultraestrutura do espermatozoide de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) e Bugio (*Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*).".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 09/maio/2016) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O orientador foi alterado em função do falecimento do Prof. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães. O título foi alterado em função da retirada de uma espécie (*Brachyteles arachnoides*) e inclusão de outra (*Alouatta guariba clamitans*), já previamente aprovada por esta Comissão.".

Comentário da CEUA: "Solicitações aprovadas".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GRABNER, Ana Paula

Título: Análise comparativa dos aspectos da ultraestrutura do espermatozoide de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) e Bugio (*Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico esta dissertação à memória do Prof. Marcelo Guimarães,
que durante o curto período em que trabalhou comigo como orientador
mostrou-me que profissionalismo, cultura, ética e valorização do próximo
ainda podem ser tônica nos dias de hoje. Meu muito obrigada.*

AGRADECIMENTOS

Às Instituições

Ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP, pela realização do Mestrado.

Ao Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens – CEMPAS da Universidade do Estado de São Paulo – UNESP Botucatu, pela oferta de utilização de seus bugios.

Ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ/INEA), por disponibilizar mico-leões-de-cara-dourada e um bugio ruivo. Ao Ministério Público Federal e Estadual, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (Proc. E-26/171.271/2006), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), ao Greater Los Angeles Zoo Association (GLAZA), The Zoological Society of Philadelphia, American Society of Primatologist (ASP), Parc Zoologique et Botanique Ville de Mulhouse, France and Jean Marc Lernoùd, Zoological Society for the Conservation of Species and Populations – München Germany and Dr. Roland Wirth e a Conservation International (CI), pela constante cooperação no programa de reprodução de primatas do neotrópico e conservação da biodiversidade brasileira.

Ao Laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP, pela estrutura, material e apoio técnico.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB da Universidade de São Paulo, *campus* Cidade Universitária, pelo processamento do sêmen para microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres FMVZ-USP e ao Setor de Microscopia eletrônica do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB, pela leitura do material de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos familiares, profissionais e amigos

Ao meu marido Guilherme, principal incentivador do ingresso e continuidade no Mestrado. Sem seu companheirismo, sua insistência, sua paciência e seu amor, eu não teria chegado ao final.

Aos meus pais, Livia e Eduardo, e à minha madrinha Mona, pelo legado do gosto pelo estudo e amor aos livros.

Ao meu co-orientador informal, Prof. Dr. Rodrigo del Rio do Valle, por me apresentar o maravilhoso mundo dos primatas neotropicais, e por me guiar na experiência envolvendo a reprodução destes animais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcílio Nichi, que me acolheu de braços abertos após a dolorosa perda do Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, por me apresentar às biotecnologias aplicadas à Andrologia, pelo apoio técnico sempre que precisei, e pela realização das estatísticas deste e de outros trabalhos realizados durante estes anos de Mestrado.

Ao querido Prof. Carlinhos, do CEMPAS de Botucatu, que me acolheu com tanta prontidão, oferecendo espontaneamente seus bugios para utilização neste estudo, e prestando sempre todo o apoio necessário durante as colheitas ali realizadas.

Ao Dr. Alcides Pissinatti, pela recepção maravilhosa no CPRJ e pela oferta generosa de animais para participação nesta pesquisa. Sua ajuda e seu dinamismo, bem como a solicitude de sua equipe, fizeram da estada no CPRJ dias de produtividade científica sem par.

Às amigas Paloma e Fernanda, que me ensinaram tudo que sei sobre colheita e análise de sêmen fresco: sem vocês, nada teria saído do papel! Obrigada pelo apoio técnico, e também pela deliciosa companhia nas viagens de colheita a Botucatu e ao CPRJ.

Ao Gaspar, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do ICB, por ter encarado o desafio de extrair telas de qualidade impecável a partir de amostras de sêmen tão diminutas. Sem sua experiência e prontidão, não teríamos imagens a divulgar.

Aos residentes do CEMPAS de Botucatu, Nathalia e Gustavo, que proporcionaram todo o apoio técnico necessário às colheitas de sêmen ali realizadas.

Às minhas alunas Beatriz, Heloísa e Ianca, que me acompanharam a Botucatu e prestaram ajuda inestimável nas últimas colheitas de sêmen.

À Profa. Dra. Fernanda Landim, da UNESP Botucatu, que ofereceu os primeiros delineamentos do projeto envolvendo microscopia eletrônica.

À Dra. Cristiane Pizzutto, por todo o apoio à redação deste trabalho, e por se mostrar uma pessoa tão acessível e tão comprometida em tornar menos horripilantes os problemas que assombram o pós-graduando em fase final de mestrado.

Aos doutorandos Diego e Andressa, pelos ensinamentos quando eu pouco sabia da manipulação de sêmen e material de laboratório.

À Harumi, pela eficiência e paciência no tocante à burocracia, e pelas deliciosas conversas sempre que o tempo permitia.

À querida Carminha, colega de profissão e de voo, por me mostrar que o mundo é mesmo muito pequeno. Você me fez ver com clareza o quanto eu tive pessoas maravilhosas amparando meu trabalho dentro do VRA, e você foi uma destas pessoas fora de lá.

Aos animais

Aos mico-leões-de-cara-dourada e aos bugios pretos e ruivos, pelo sêmen e pela oportunidade de me apaixonar por primatas do novo mundo.

E, por fim, às minhas cachorrinhas Cruela e Aila, pela companhia incansável durante os longos dias de redação deste trabalho, e por me emprestarem durante tantos meses aos mico-leões e bugios, mesmo lhes custando tanto tempo de solidão dentro de casa.

“Olhe no fundo dos olhos de um animal e, por um momento, troque de lugar com ele. A vida dele se tornará tão preciosa quanto a sua, e você se tornará tão vulnerável quanto ele.”

(Phillip Ochoa)

RESUMO

GRABNER, A. P. **Análise comparativa dos aspectos da ultraestrutura do espermatozoide de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) e Bugio (*Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*)**. [Ultrastructure characteristics comparative analysis of spermatozoa from Golden-headed Lion Tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) and Howler Monkey (*Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans*)]. 2016. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os primatas neotropicais, ou primatas do novo mundo, são pertencentes a um grupo diverso e variado de animais, com características anatômicas, comportamentais e taxonômicas próprias, que os diferem dos primatas do velho mundo. Estima-se que representem 31% dos primatas não-humanos do planeta. Têm sofrido com as altas taxas de crescimento populacional e perturbação antrópica resultante do desflorestamento, agricultura e criação de gado. Com o intuito de reverter esta situação e maximizar o potencial reprodutivo das espécies, o desenvolvimento de biotecnologias associadas à reprodução tem sido amplamente justificado nos dias de hoje, por representarem importantes ferramentas reprodutivas, contribuindo para a preservação da biodiversidade e manutenção da diversidade genética. Assim, o objetivo do presente estudo foi padronizar a colheita de sêmen de *Alouatta guariba clamitans* por eletroejaculação por via retal com posterior análise do sêmen fresco, procedimentos nunca descritos para a espécie, e adaptar o método de preparo de sêmen de *Leontopithecus chrysomelas*, *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* para microscopia eletrônica de transmissão, permitindo a comparação da ultraestrutura dos espermatozoides das três espécies e apresentando resultados também inéditos na literatura científica. Para este estudo, foram utilizados quatro exemplares de *L. chrysomelas*, dois exemplares de *A. caraya* e dois exemplares de *A.g. clamitans*, machos adultos mantidos em cativeiro. *L. chrysomelas* tiveram o sêmen colhido por vibroestimulação peniana, e *A. caraya* e *A.g. clamitans* foram submetidos à eletroejaculação por via retal. Após a obtenção dos ejaculados, o sêmen foi avaliado quanto ao volume, pH, concentração, motilidade, integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e morfologia, e posteriormente preparado para microscopia eletrônica de transmissão. A análise dos

espermatozoides das três espécies estudadas revelou que todos apresentam os componentes básicos descritos para o espermatozoide humano – cabeça, colo e cauda, formada pelas peças intermediária, principal e terminal – com variações na forma e tamanho de cada componente. As diferenças mais significativas encontradas entre os espermatozoides comparados foram extensão de acrossomo, comprimento, largura e organização de peça intermediária. O presente estudo atingiu os objetivos propostos, apresentando resultados inéditos na literatura científica.

Palavras-chave: Primatas neotropicais. Reprodução. Microscopia eletrônica de transmissão.

ABSTRACT

GRABNER, A. P. **Ultrastructure characteristics comparative analysis of spermatozoa from Golden-headed Lion Tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) and Howler Monkey (*Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans*)**. [Análise comparativa dos aspectos da ultraestrutura do espermatozoide de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) e Bugio (*Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*)]. 2016. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The neotropical primates, also known as primates of the new world, are a diverse and varied group of animals, with unique anatomical and taxonomic characteristics, as well a unique behaviour, that distinguish those from the old world primates. It is estimated that these present 31% of the non-human primate population of the planet. High taxes of populational growth and anthropological disturbance have been undergoing due to deforestation, agriculture and cattle farms. In order to revert this situation and maximize the reproductive potential of the species, the development of biotechnologies associated to the reproduction are widely justified nowadays, for representing important reproductive tools, contributing to the preservation of the biodiversity and maintenance of genetic diversity. Hence, the purpose of this study was to collect *Alouatta guariba clamitans* semen by rectal electroejaculation then analyze the fresh semen, procedures never before described for the species, and adapt the preparation method of *Leontopithecus chrysomelas*, *Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans* semen for electron transmission microscope, allowing the comparison of the spermatozoa ultrastructure from the three species and also presenting new results to the scientific literature. For this study, it was used four specimens of *L. chrysomelas*, two specimens of *A. caraya* and two specimens of *A.g. clamitans*, adult males kept in captivity. *L. chrysomelas* had the semen taken by penine vibratory stimulation, and *A. caraya* and *A.g. clamitans* were submitted to rectal electroejaculation. After the semen was obtained, it was evaluated regarding the volume, pH, concentration, motility, sperm membrane integrity, acrosome integrity and morphology, and then prepared for electron transmission microscopy. The analysis of the spermatozoa of the three studied species revealed that all present the basic components described for the human spermatozoa - head, neck region and tail, formed by middle, principal and terminal pieces - with variations in

shape and size of each component. The most significant differences found between the compared spermatozoa were the acrosome extension and middle piece length, thickness and organization. The present study attained the proposed goals, presenting unprecedented results for the scientific literature.

Key-words: Neotropical primates. Reproduction. Transmission Electron Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	27
Figura 2 –	Distribuição geográfica de <i>Leontopithecus chrysomelas</i>	29
Figura 3 –	<i>Alouatta caraya</i> macho (A) e fêmea com filhote (B). <i>Alouatta guariba clamitans</i> macho (C) e fêmea (D)	33
Figura 4 –	Distribuição geográfica de <i>Alouatta caraya</i> (A) e <i>Alouatta guariba clamitans</i> (B)	35
Figura 5 –	Diagrama da ultraestrutura de um espermatozoide	41
Figura 6 –	Medição do comprimento testicular com paquímetro em <i>A. caraya</i> (A) e medição da circunferência escrotal com fita métrica em <i>A.g. clamitans</i> (B)	53
Figura 7 –	Aparelho de vibroestimulação peniana adaptado para colheita de sêmen de primatas de pequeno porte, com tubo de vidro acoplado para a colheita de sêmen (A) e colheita de sêmen por vibroestimulação penina em <i>L. chrysomelas</i> (B).....	54
Figura 8 –	Aparelho eletroejaculador adaptado para a utilização em grandes primatas neotropicais (A) e colheita de sêmen por eletroejaculação por via retal em <i>A. caraya</i> (B).....	55
Figura 9 –	Leitura do pH do sêmen de <i>A. caraya</i>	57
Figura 10 –	Fotomicrografia de espermatozoides de <i>A.g. clamitans</i> corados com eosina-nigrosina, objetiva de 100 X sob óleo de imersão. Espermatozoide não corado apresenta membrana plasmática íntegra (A) e espermatozoide corado apresenta membrana plasmática não íntegra (B)	59

Figura 11 – Fotomicrografia de espermatozoides de <i>A.g. clamitans</i> corados com corante simples para acrossomo, objetiva de 100 X sob óleo de imersão. Espermatozoide com acrossomo corado apresenta membrana acrossomal íntegra (A) e espermatozoide com acrossomo não corado apresenta membrana acrossomal não íntegra (B)	60
Figura 12 – Visão geral do espermatozoide de <i>L. chrysomelas</i> , corte longitudinal	70
Figura 13 – Cabeça do espermatozoide de <i>L. chrysomelas</i> , corte longitudinal	71
Figura 14 – Comparação entre acrossomos do espermatozoide de <i>L. chrysomelas</i> , corte longitudinal	72
Figura 15 – Colo do espermatozoide de <i>L. chrysomelas</i> , corte longitudinal	73
Figura 16 – Peça intermediária do espermatozoide de <i>L. chrysomelas</i> , cortes longitudinal (A) e transversal (B)	74
Figura 17 – Peça principal do espermatozoide de <i>L. chrysomelas</i> , cortes transversal (A) e longitudinal (B)	75
Figura 18 – Visão geral dos espermatozoides de <i>L. chrysomelas</i> provenientes da fração líquida do sêmen	76
Figura 19 – Visão geral dos espermatozoides de <i>L. chrysomelas</i> provenientes do coágulo do sêmen	76
Figura 20 – Visão geral do espermatozoide de <i>A. caraya</i> , corte longitudinal	77
Figura 21 – Cabeça do espermatozoide de <i>A. caraya</i> , corte longitudinal	78
Figura 22 – Colo e peça intermediária do espermatozoide de <i>A. caraya</i> , corte longitudinal	79
Figura 23 – Peças intermediárias de espermatozoides de <i>A. caraya</i> , cortes transversais	80
Figura 24 – Peça principal do espermatozoide de <i>A. caraya</i> , cortes longitudinal (A) e transversais (B e C)	81
Figura 25 – Visão geral dos espermatozoides de <i>A. caraya</i>	82

Figura 26 –	Visão geral do espermatozoide de <i>A.g. clamitans</i> , corte longitudinal ..	83
Figura 27 –	Cabeça do espermatozoide de <i>A.g. clamitans</i> , corte longitudinal	84
Figura 28 –	Colo e peça intermediária do espermatozoide de <i>A.g. clamitans</i> , cortes longitudinal (A) e transversal (B)	85
Figura 29 –	Ânulo do espermatozoide de <i>A.g. clamitans</i> em corte transversal, combinando elementos característicos das peças intermediária e principal.....	86
Figura 30 –	Peça principal do espermatozoide de <i>A.g. clamitans</i> , cortes longitudinal (A) e transversais (B e C).....	87
Figura 31 –	Visão geral dos espermatozoides de <i>A.g.clamitans</i>	88

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Animais participantes do experimento. A sigla para identificação traz as iniciais da espécie seguidas de um número para identificação de cada indivíduo. A composição do grupo retrata os animais residentes no mesmo recinto do indivíduo experimental.51
- Quadro 2 – Animais participantes do experimento e sua contribuição com amostras de qualidade para análise da microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores absolutos da morfometria testicular de <i>L. chrysomelas</i> , <i>A. caraya</i> e <i>A.g. clamitans</i>	67
Tabela 2 –	Valores absolutos da análise do sêmen fresco: pH, volume, concentração, motilidade total, motilidade progressiva, integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal, aspecto e presença de coágulo.	68
Tabela 3 –	Avaliação da morfologia espermática sob microscopia de luz (percentual de espermatozoides).....	69
Tabela 4 –	Valores (média $\pm$ desvio padrão) da mensuração dos espermatozoides de <i>L. chrysomelas</i> , <i>A. caraya</i> e <i>A.g. clamitans</i> comparados pelo teste de Tukey.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BWW	Biggers, Whitten e Whittingham's
°C	Graus Celsius
CEMPAS	Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens
cm	Centrímetro
CPRJ	Centro de Primatologia do Rio de Janeiro
DAB	3,3' – diaminobenzidina
EE	Eletroejaculação por via retal
FITC-PNA	Isotiocinato de fluoresceína conjugado à aglutinina do amendoim
FITC-PSA	Isotiocinato de fluoresceína conjugado à aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
g	Grama
Hz	Hertz
ha	Hectare
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	Organização Internacional para Conservação da Natureza (<i>International Union for Conservation of Nature</i>)
Kg	Quilo
Km	Quilômetro
Km ²	Quilômetro quadrado
m	Metro
mg/Kg	Miligrama por quilo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMA	Ministério do Meio Ambiente
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
n	Número de animais utilizados no experimento
nm	Nanômetro
PVS	Vibroestimulação peniana (<i>Penile vibratory stimulation</i>)
pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Rotação por minuto
SCSA	Ensaio de Estrutura da Cromatina Espermática
SISBIO	Sistema de Autorização de Informação em Biodiversidade
Sptz/mL	Espermatozoides por mililitro
TALP	Meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato
UNESP	Universidade do Estado de São Paulo
V	Volt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	PRIMATAS NEOTROPICAIS	25
2.1.1	Mico-Leão-de-Cara-Dourada (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>)	27
2.1.1.1	Reprodução	30
2.1.2	Bugios (<i>Alouatta caraya</i> e <i>Alouatta guariba clamitans</i>)	32
2.1.2.1	Reprodução	36
2.2	O SÊMEN E O ESPERMATOZOIDE COMO CÉLULA	37
2.2.1	O Sêmen de <i>L. chrysomelas</i>, <i>A.caraya</i> e <i>A.g. clamitans</i>	38
2.2.2	O espermatozoide	39
2.3	BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO	42
3	OBJETIVOS	48
4	MATERIAL E MÉTODO	49
4.1	ANIMAIS	49
4.2	CONTENÇÃO	51
4.2.1	<i>L. chrysomelas</i>	51
4.2.2	<i>A. caraya</i> e <i>A.g. clamitans</i>	52
4.3	MORFOMETRIA TESTICULAR	52
4.4	COLHEITA DO SÊMEN	53
4.4.1	<i>L. chrysomelas</i>	53
4.4.2	<i>A. caraya</i> e <i>A.g. clamitans</i>	55
4.5	ANÁLISE PRIMÁRIA DO SÊMEN	56
4.5.1	Processamento do sêmen	56
4.5.2	Motilidade total e motilidade progressiva	57
4.5.3	Concentração espermática	58
4.5.4	Integridade de membrana plasmática	58
4.5.5	Integridade de membrana acrossomal	59
4.5.6	Morfologia espermática	60
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	61
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5	RESULTADOS	64
5.1	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA	64
5.2	AMOSTRAS	64

5.2.1	<i>L. chrysomelas</i>	64
5.2.2	<i>A. caraya</i>	65
5.2.3	<i>A.g. clamitans</i>	66
5.3	MORFOMOTRIA TESTICULAR	67
5.4	AVALIAÇÃO DO SÊMEN FRESCO DE <i>L. CHRYSOMELAS</i> , <i>A. CARAYA</i> E <i>A.G. CLAMITANS</i>	67
5.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	69
5.5.1	<i>L. chrysomelas</i>	70
5.5.2	<i>A. caraya</i>	77
5.5.3	<i>A.g. clamitans</i>	82
5.6	COMPARAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES DE <i>L. CHRYSOMELAS</i> , <i>A. CARAYA</i> E <i>A.G. CLAMITANS</i>	88
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICES	122

1 INTRODUÇÃO

Os primatas neotropicais, ou primatas do novo mundo, pertencem a um grupo diverso e variado de animais, com características anatômicas, comportamentais e taxonômicas próprias, que os diferem dos primatas do velho mundo. Atualmente, estima-se que representem 31% dos primatas não-humanos do planeta (RYLANDS; MITTERMEIER; 2009), vivendo praticamente todo o tempo em ambiente arbóreo, com raras descidas ao chão.

Ainda que muito diversificados, os primatas neotropicais da América do Sul têm sofrido com as altas taxas de crescimento populacional associadas à perturbação antrópica resultante do desflorestamento, agricultura, criação de gado e aumento da suscetibilidade a novos vetores de doenças nas paisagens modificadas (ESTRADA, 2009). Uma espécie afetada por esta situação, e que consta na lista vermelha da IUCN (2008) como ameaçada de extinção, foi utilizada nesta pesquisa: *Leontopithecus chrysomelas*.

Com o intuito de reverter esta situação e maximizar o potencial reprodutivo das espécies, seja em cativeiro ou em vida livre, o desenvolvimento de biotecnologias associadas à reprodução tem sido amplamente justificado nos dias de hoje. Segundo Valle (2007), estas biotecnologias têm representado importantes ferramentas reprodutivas, contribuindo para a preservação da biodiversidade e manutenção da diversidade genética dos primatas neotropicais.

Infelizmente, a utilização de biotecnologias, por si só, não representa uma solução para problema tão complexo quanto a preservação dos primatas do novo mundo. É necessária, também, a geração de conhecimento básico acerca da biologia reprodutiva destas espécies, incluindo-se aqui o conhecimento de suas características seminais e da estrutura e fisiologia de seus espermatozoides, para que tais biotecnologias possam ser empregadas de maneira otimizada em função do comportamento reprodutivo característico (e muitas vezes único) de cada espécie animal. Ainda é realidade nos dias atuais a existência de espécies altamente ameaçadas de extinção e conhecimento mínimo ou ausente acerca das características reprodutivas das mesmas.

Tendo em vista este cenário, o objetivo do presente estudo foi padronizar a colheita de sêmen de *Alouatta guariba clamitans* por eletroejaculação por via retal com posterior análise do sêmen fresco, procedimentos inéditos para a espécie na literatura científica, e adaptar o método de preparo do sêmen de *Leontopithecus chrysomelas*, *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* para microscopia eletrônica de transmissão, de modo a permitir a comparação da ultraestrutura dos espermatozoides das três espécies para, desta forma, gerar resultados ainda inéditos na literatura e contribuir para os estudos da morfologia celular e reprodução assistida em prol da preservação das espécies.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A caracterização dos primatas não é tarefa óbvia, devido à ausência de um caráter único ou marcante que se possa dizer comum a todos os animais desta Ordem. É necessária a avaliação de certo número de características para defini-los, dada sua plasticidade evolutiva e adaptabilidade a diferentes oportunidades ecológicas, embora sem o desenvolvimento de adaptações muito específicas aos ambientes onde vivem (SIMPSON, 1980; AURICCHIO, 1995).

Segundo Auricchio (1995), primatas são mamíferos placentários adaptados ao ambiente arborícola. Devido às características de seu habitat, têm a visão bem desenvolvida em detrimento do olfato, de menor utilidade no ambiente arbóreo. A percepção das cores facilita a procura de alimentos. A anatomia esferóide da articulação do ombro, associada à presença de clavículas articuladas, permite grande movimentação dos membros torácicos, conferindo a estes animais sua grande e característica mobilidade. Seus pés e mãos são hábeis, e o polegar (*halux*) oposto aos demais dígitos, para as espécies que o possuem, permite maior habilidade e precisão na preensão de alimentos.

A ordem Primates engloba as infra-ordens Catarrhini (Catarrinos ou Primatas do Velho Mundo) e Platyrrhini (Platirrininos, Primatas do Novo Mundo ou Primatas Neotropicais). Os Primatas do Velho Mundo possuem as narinas voltadas para baixo no nariz longo e vivem em íntima relação com o solo, enquanto os Neotropicais apresentam as narinas voltadas para os lados em um nariz achatado e vivem praticamente todo o tempo sobre as árvores, raramente descendo ao chão (AURICCHIO, 1995).

2.1 PRIMATAS NEOTROPICAIS

Devido à separação do continente Americano dos demais continentes há mais de 100 milhões de anos, a América do Sul tem testemunhado a evolução de diversas comunidades animais e vegetais próprias e distintas, incluindo os Primatas Neotropicais (FLEAGLE; TEJEDOR, 2000; ROSENBERGER et al., 2009). São

reconhecidos, hoje, 21 gêneros e 204 espécies e subespécies, fazendo com que os Platyrrhinos figurem entre os primatas com maior diversidade taxonômica, comportamental e anatômica (ROSENBERGER, 2011; RYLANDS; MITTERMEIER; SILVA JR., 2012; SAMPAIO et al., 2015).

A taxonomia moderna da infra-ordem Platyrrhini tem estado extraordinariamente estável nas duas últimas décadas. Com base nas mais modernas publicações, afirma-se que hoje os Primatas Neotropicais compõem 31% dos primatas não-humanos do planeta (RYLANDS; MITTERMEIER; 2009).

A adaptabilidade ao meio arbóreo em que vivem fez com que os Primatas Neotropicais desenvolvessem uma série de modificações físicas características. Nos gêneros de maior porte, como *Alouatta*, a prensibilidade da cauda permite que o animal se mantenha suspenso apenas por ela enquanto utiliza os membros para outros fins, além de utilizá-la, em outras situações, como um quinto membro que aumenta muito sua mobilidade e velocidade. A maioria dos primatas tem suas unhas planas sobre os dedos, mas certos gêneros, como *Leontopithecus*, as possuem em forma de garras, que lhes permitem apanhar insetos em vãos de cascas de árvores (AURICCHIO, 1995).

Em geral, Primatas Neotropicais são caracterizados por variadas estratégias de forrageamento e modos de utilização do habitat, e modificações anatômicas de seus dentes, aparelho mastigatório, trato digestivo, aparelho locomotor e sensorial lhes permitem explorar de forma eficiente diferentes tipos de alimento como insetos, pequenos vertebrados, folhas e brotos, frutas maduras ou não, nozes, sementes, fungos e néctar (GARBER; ESTRADA, 2009; NORCONK et al., 2009).

De acordo com Auricchio (1995), poucas espécies apresentam dimorfismo sexual acentuado. As variações se devem, em geral, à genitália externa, variação de volume corpóreo, variações sutis de comportamento e secreção de feromônios.

Na América do Sul, como em outras partes do mundo, as altas taxas de crescimento populacional associadas à perturbação antrópica resultante do desflorestamento, agricultura, criação de gado e aumento da suscetibilidade a novos vetores de doenças nas paisagens modificadas, exercem um forte impacto negativo na sustentabilidade das populações dos Primatas Neotropicais (ESTRADA, 2009).

2.1.1 Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*)

Assim como os demais primatas, *L. chrysomelas* pertence ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia e ordem Primates. Integra a família Callitrichidae, compartilhando com mais três espécies o gênero *Leontopithecus*: Mico-Leão-Dourado (*L. rosalia*), Mico-Leão-Preto (*L. chrysopygus*) e Mico-Leão-de-Cara-Preta (*L. caissara*). Nas publicações em língua inglesa, é conhecido por *Golden-headed Lion Tamarin* e, devido a divergências de taxonomia, cada espécie de Mico-Leão pode ser listada independentemente em alguns trabalhos, como os de Della Serra (1951); Rosenberger e Coimbra-Filho (1984); Mittermeier, Rylands e Coimbra-Filho (1988); Natori (1989) e Rylands, Coimbra-Filho e Mittermeier (1993), ao passo que *L. chrysomelas* é listado como subespécie de Mico-Leão-Dourado em outros trabalhos, como os de Coimbra-Filho e Mittermeier (1972 e 1973); Hershkovitz (1977); Forman et al. (1986) e Seuánez, Forman e Alves (1988), nestes dois últimos casos com base na morfologia cromossômica idêntica apresentada pelos animais (KIERULFF et al., 2008).

Figura 1 – *Leontopithecus chrysomelas*

(WIKIPEDIA, 2014)

Os calitriquídeos, representados pelos micos e saguis, diferem dos demais primatas neotropicais por seu pequeno tamanho; por possuírem garras modificadas no lugar das unhas dos dedos, exceto do polegar; pela ocorrência de nascimentos gemelares; e pela presença de apenas dois pré-molares de cada lado, tanto superiores quanto inferiores. É característica típica dos Mico-Leões, e diferente dos demais calitriquídeos, a presença de mãos e dedos mais longos (RYLANDS, 1993; KIERULFF et al., 2002). *L. chrysomelas* machos adultos pesam em torno de 620g, enquanto as fêmeas, menores, possuem por volta de 535g, conforme descrito por Rosenberger e Coimbra-Filho (1984) (Figura 1).

Mico-Leões costumam viver em grupos familiares de quatro a oito indivíduos, defendendo um território de 40 a mais de 100 ha, extensão esta dependente da disponibilidade e distribuição dos alimentos. Comem frutas, flores, néctar e pequenas presas animais, incluindo sapos, lagartos, caracois, aranhas e insetos (RYLANDS, 1989; RYLANDS, 1993; KIERULFF et al., 2002).

L. chrysomelas é uma espécie nativa da Mata Atlântica do estado da Bahia, no Brasil; vive em fragmentos de mata desde o estado da Bahia até o extremo nordeste de Minas Gerais, em uma área de aproximadamente 19.000 Km² (COIMBRA-FILHO; MITTERMEIER, 1977; KIERULFF et al., 2008) (Figura 2). Tem capacidade de adaptação em ambientes degradados e florestas secundárias, assim como em plantações de borracha abandonadas ou plantações de cacau, desde que haja disponibilidade de ocos de árvores para dormir e alimentação suficiente, bem como abundância de bromélias, que lhe fornecem importante apoio na obtenção do alimento (COIMBRA-FILHO, 1969; COIMBRA-FILHO; MITTERMEIER, 1973; COIMBRA-FILHO, 1976b).

Em 1997, Pinto e Rylands estimaram a população total de *L. chrysomelas* em 6.000 a 15.000 indivíduos, com a densidade variando entre cinco a dezessete animais por quilômetro quadrado, de acordo com os estudos de Rylands (1982; 1989). Esta população vem decrescendo com o passar dos anos, numa estimativa superior a 50% no decorrer de três gerações (21 anos), fazendo com que a espécie figure entre aquelas ameaçadas de extinção, conforme lista da IUCN (2008). Esta ameaça se deve principalmente à destruição da Mata Atlântica, com posterior fragmentação das populações remanescentes (KIERULFF et al., 2008).

Figura 2 – Distribuição geográfica de *Leontopithecus chrysomelas*

(IUCN, 2008)

Ainda assim, de acordo com Kierulff et al. (2008), na área padrão de distribuição de *L. chrysomelas*, restam mais indivíduos desta espécie do que Mico-Leões das outras três espécies juntas. No entanto, as florestas remanescentes estão sendo destruídas em níveis sem precedentes, e as populações que restam estão diminuídas e fragmentadas. A indústria do cacau e as extensas plantações da fruta contribuíram para este cenário. Atualmente, porém, a grande difusão do sistema “cabruca”, que preserva parte do dossel original de árvores nativas junto aos cacauzeiros, tem contribuído para uma situação mais favorável aos Mico-Leões-de-Cara-Dourada, ao criar conectividade entre as manchas de floresta preservada.

As principais ameaças a *L. chrysomelas* nos últimos 15 anos se devem às dificuldades sofridas pela indústria do cacau, culminando com o surgimento de plantações alternativas ou mesmo criações de gado. Sabe-se que a extrema fragmentação das florestas impacta muito negativamente sobre as populações isoladas de *L. chrysomelas* devido à depressão endogâmica (ALGER; CALDAS, 1994; PINTO, 1994; PINTO; RYLANDS, 1997).

As principais ações para conservação da espécie são representadas pela inclusão de *L. chrysomelas* na Lista Oficial de Espécies Brasileiras Ameaçadas de Extinção, bem como na lista de espécies ameaçadas do estado de Minas Gerais;

criação da Reserva Biológica Una na Bahia, com 18.500 ha destinados à proteção da espécie, contendo 400 a 450 animais em vida livre e promovendo a preservação das florestas adjacentes à reserva; e um bem manejado programa de reprodução em cativeiro de indivíduos oriundos do tráfico na década de 1980, representando uma importante reserva genética diante do quadro de redução dos indivíduos em vida livre em função do desmatamento (KIERULFF et al., 2008).

2.1.1.1 Reprodução

Segundo Eisenberg (1977), as fêmeas de calitriquídeos (entre eles *L. chrysomelas*) atingem a maturidade sexual aos 18 meses e os machos aos 24 meses. A partir desta idade a reprodução é possível, e sofre influência sazonal.

Os calitriquídeos compartilham de muitas de suas características reprodutivas, como ausência de dimorfismo sexual, presença de apenas uma fêmea a se reproduzir no grupo, indicações de formação de casal, cuidado parental e agressividade com outros membros da mesma espécie, principalmente entre fêmeas (KLEIMAN, 1977; KLEIMAN, 1978; EPPLE; KATZ, 1983; ABBOT, 1984). Tais comportamentos levaram os autores dos primeiros estudos a considerarem os calitriquídeos como monogâmicos, embora atualmente se saiba da possibilidade de ocorrência de uma estrutura poliândrica, em que mais de um macho têm acesso à fêmea dominante à época do acasalamento, conforme descrito por Santos (1994) após estudos de campo. Após a observação de *L. chrysomelas* em cativeiro, Santos (1994) descreve ainda que a permanência de uma fêmea velha no grupo familiar, mesmo fora de seu período de fertilidade, pode impedir a reprodução de uma outra fêmea do grupo.

Diferentemente da maioria dos primatas, a ciclicidade ovariana das fêmeas de calitriquídeos não apresenta sinais que permitam seu pronto reconhecimento: não há edema perineal, sangramento menstrual ou alterações na citologia vaginal. Adicionalmente, o ciclo sexual não é marcado por alterações nítidas de comportamento ou por ser o único período de aceitação de cópula por parte da fêmea de *Leontopithecus*, que aceita o macho mesmo durante a gestação (KLEIMAN,

1977; EPPLE; KATZ, 1983; OERKE; EINSPANIER; HODGES, 1996; MORAES et al., 2004).

Durante a cópula, a fêmea permanece em posição quadrupedal com os membros pélvicos flexionados, recebendo sobre ela o macho, que introduz o pênis durante um período inferior a 30 segundos. Várias penetrações podem preceder a ejaculação (EISENBERG, 1977; KLEIMAN, 1977).

Kleiman (1977) e Santos (1994) relatam que *Leontopithecus* possui o menor período de gestação dentre os calitriquídeos, algo entre 128 e 134 dias. Contudo, em um trabalho mais recente baseado em análises hormonais indiretas, French et al. (2003) fixaram em 125 dias o período médio de gestação para este gênero. O intervalo entre partos costuma ser de 12 meses tanto em vida livre quanto em cativeiro, embora também sejam observadas fêmeas que apresentem intervalo de apenas seis meses em cativeiro (EISENBERG, 1977; SANTOS, 1994). A influência sazonal para os acasalamentos é responsável pela coincidência dos nascimentos nas estações do ano mais favoráveis à criação da prole, sendo o mês de maio o de maior fertilidade em *L. chrysomelas*, com consequentes nascimentos entre setembro e outubro, quando as condições ecológicas da primavera favorecem a amamentação e desenvolvimento dos filhotes devido à fartura alimentar (COIMBRA-FILHO, 1976a; COIMBRA-FILHO; MAIA, 1979).

Entre *Leontopithecus*, o nascimento de gêmeos fraternos é mais comum que a produção de único filhote. Três filhotes também não são comuns e, quando a situação ocorre, o terceiro filhote geralmente não se cria (COIMBRA-FILHO, 1976a; EISENBERG, 1977; KLEIMAN, 1977).

Os calitriquídeos têm como característica marcante em sua biologia social o cuidado do filhote por outros membros do grupo que não a mãe, e por este motivo o convívio grupal é de extrema importância para o desenvolvimento psico-reprodutivo destes animais, preparando-os para um cuidado afetuoso com a prole (COIMBRA-FILHO, 1976a; FERRARI; LOPES-FERRARI, 1989). Utilizando-se deste argumento, Coimbra-Filho (1976a) recomenda que *L. chrysomelas* criados em cativeiro tenham assegurada a oportunidade de permanência durante certo tempo junto a indivíduos adultos, podendo presenciar nascimentos e participar da criação dos filhotes mais novos.

Ainda citando Coimbra-Filho (1976a), é comum entre calitriquídeos o macho se responsabilizar pela criação dos filhotes, carregando-os e protegendo-os. O autor relata que, após a queda de um filhote ao solo, este é imediatamente recolhido por um dos pais, embora a iniciativa mais frequente seja do macho. Para *Leontopithecus*, contudo, a fêmea reprodutiva tem sido descrita como a mais cuidadosa, ao menos nas três primeiras semanas de vida do filhote (HOAGE, 1977).

2.1.2 Bugios (*Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*)

Os bugios, assim como os demais primatas, pertencem ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia e ordem Primates. São popularmente conhecidos como bugios, guaribas, barbados ou macacos roncadores, devido às frequentes vocalizações entre membros de territórios vizinhos para marcação de território, servindo-se para este fim da ressonância de sua ampla laringe e osso hioide. O ruído característico produzido pelos primatas deste gênero, que chega a ser ouvido num raio de 5 Km de distância, inspira também seu nome popular em língua inglesa, *black howler monkey* (macaco vociferador preto) e as variações *Black-and-Gold Howler Monkey* (macaco vociferador preto-e-dourado) e *Black Howling Monkey* (macaco vociferante preto), para *A. caraya*, e *Southern Brown Howler Monkey* (macaco vociferador marrom do sul) ou *Southern Brown Howling Monkey* (macaco vociferante marrom do sul) para *A.g. clamitans*. (AURICCHIO, 1995; FERNANDEZ-DUQUE; WALLACE; RYLANDS, 2008; MENDES et al., 2008b).

A taxonomia de *A.g. clamitans* não é muito simples, e não se pode dizer que se encontre completamente definida. Rylands e Brandon-Jones (1998) defendem a utilização do nome *guariba*, enquanto Gregorin (2006) afirma que o nome alternativo, *fusca*, é mais apropriado. Gregorin (2006) defende ainda, baseado em seus estudos da morfologia do crânio e do aparelho hioide, que as duas subespécies de bugio marrom reconhecidas atualmente, *A.g. clamitans* e *A.g. guariba*, deveriam ser reconhecidas como espécies independentes. Harris et al. (2005) afirmam, com base nas diferenças genéticas encontradas entre os bugios marrons de seus estudos, que a evolução das pesquisas genéticas levará ao reconhecimento de três espécies independentes destes animais. Enquanto este

impasse taxonômico não é solucionado, permanece reconhecida a utilização do termo *Alouatta guariba clamitans* (RYLANDS et al., 2000; GROVES, 2001) para o bugio marrom do sul (ou ruivo), tendo como sinonímia o termo *Alouatta fusca clamitans* (MENDES et al., 2008b).

Figura 3 – *Alouatta caraya* macho (A) e fêmea com filhote (B). *Alouatta guariba clamitans* macho (C) e fêmea (D)

(WIKIPEDIA, 2016)

O gênero *Alouatta* é caracterizado por primatas robustos, que pesam em média 6,5Kg (machos) e 4,3Kg (fêmeas). Possui vasta barba sob a face nua de pele

negra e pelagem escassa no ventre e no peito, sendo um dos poucos gêneros de primatas do novo mundo a apresentar dimorfismo sexual: os machos de *A. caraya* são negros, com poucos reflexos pardos nos pés, mãos e cauda, enquanto as fêmeas e jovens apresentam-se castanhos-claros, tendendo à coloração palha com alguns reflexos mais escuros; machos de *A.g. clamitans* são avermelhados e brilhantes com reflexos dourados, ao passo que as fêmeas são castanhas muito escuras, quase negras. Bugios possuem a cauda preênsil, com palma nua em sua extremidade ventral (RUMIZ, 1990; AURICCHIO, 1995) (Figura 3).

Os bugios são os maiores primatas da América do Sul que se alimentam de folhas, e seus dentes molares são perfeitamente adaptados para cortá-las durante a mastigação. Preferem folhas jovens menos fibrosas e brotos, e passam mais de 70% de seu dia sentados ou deitados, fermentando as folhas ingeridas em seu grande ceco. Podem ainda ingerir insetos, frutas e folhas maduras, flores, galhos, sementes e musgo. Seu hábito alimentar diferenciado, incluindo folhas já maduras, se deve à sua característica de conseguir detoxificar as defesas químicas de muitas plantas, o que lhe amplia muito o leque de tipos de vegetação em que pode habitar, fazendo ainda com que sua área de uso possa ser bastante restrita (1 a 20 ha) em comparação a outros gêneros. Embora passem a maior parte do tempo nos galhos das árvores, descem ao chão para comer terra (reposição mineral) e beber água (AURICCHIO, 1995; FERNANDEZ-DUQUE; WALLACE; RYLANDS, 2008).

A. caraya vivem em grupos de quatro a 15 indivíduos, alcançando uma densidade média de 80 animais por Km². Os grupos são formados por machos e fêmeas (adultos e filhotes) sob o comando de um macho adulto denominado “capelão”. O grupo locomove-se lentamente, parando durante horas nas árvores de alimentação. Habitam estratos arbóreos de 10 a 20m em florestas montanhosas úmidas ou vegetação mais aberta como caatinga, cerrado ou mata de araucárias, em altitudes que variam de zero a 1200m, sem preferência por tipo de vegetação. Devido à sua grande adaptabilidade a diferentes habitats, distribui-se por vários países da América do Sul (Argentina, Bolívia, Paraguai), além de muitos estados brasileiros (Piauí, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul) (ARDITI; PLACCI, 1990; BROWN; ZUNINO, 1994; AURICCHIO, 1995; FERNANDEZ-DUQUE; WALLACE; RYLANDS, 2008) (Figura 4).

A.g. clamitans podem ser vistos em grupos de quatro a 11 indivíduos, onde há usualmente um macho dominante, eventualmente dois. Os demais machos subordinados são sub-adultos ou juvenis, além de duas a cinco fêmeas por grupo. Devido à grande proporção que as folhas ocupam em sua dieta, bugios podem necessitar de áreas bastante restritas para viver, havendo frequentemente sobreposição das áreas ocupadas por diferentes bandos (MENDES et al., 2008b).

A.g. clamitans habita florestas da Argentina e de vários estados brasileiros, como Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Figura 4), em altitudes que variam de 750m a 1200m. Na Argentina, são relatadas áreas de simpatria com *A. caraya*, com possível hibridação entre as espécies (AURICCHIO, 1995; AGUIAR et al., 2007; MENDES et al., 2008b).

Figura 4 – Distribuição geográfica de *Alouatta caraya* (A) e *Alouatta guariba clamitans* (B)

(IUCN, 2008)

Diferentemente de *L. chrysomelas*, os bugios aqui descritos constam na lista de mínima preocupação da IUCN (2008). *A. caraya* tem a seu favor sua ampla distribuição geográfica, habilidade de adaptação a ambientes modificados pelo homem e presença em muitos parques nacionais protegidos (Araguaia, Chapada dos Veadeiros, Chapada Diamantina, Pantanal, Ilha Grande, entre outros). Embora a

população esteja em declínio, não é provável que figure na listagem de espécies ameaçadas num futuro próximo pois, mesmo que seu habitat esteja fragmentado, suas populações podem viver bem em áreas relativamente pequenas e florestas perturbadas (FERNANDEZ-DUQUE; WALLACE; RYLANDS, 2008).

Não obstante a classificação da IUCN, Fernandez-Duque, Wallace e Rylands (2008) ressaltam que *A. caraya* vem sendo ameaçada pela perda de habitat devido ao desenvolvimento de culturas de soja e da pecuária no cerrado brasileiro, culturas de soja na Bolívia e, em menor escala, devido às fazendas e à pecuária na Argentina. Somado a isso, alguma caça de subsistência também vitima estes bugios em seu habitat.

A.g. clamitans, que habita a mata atlântica brasileira, é capaz de se distribuir amplamente mesmo em áreas de grande perda florestal, e grande parte de sua população habita, hoje em dia, áreas protegidas. Em seu histórico de monitoramento pela IUCN, os bugios marrons deixaram a categoria de vulneráveis em 2000, sendo em 2003 considerados quase ameaçados, mas figurando nos dias atuais na lista de mínima preocupação da IUCN (2008), apesar das populações ainda se encontrarem em declínio (MENDES et al., 2008b).

As maiores ameaças sofridas por *A.g. clamitans* são as perdas florestais que geram grande fragmentação de sua área de ocupação, caça e doenças epidêmicas como febre amarela. Frequentemente são reportados casos de indivíduos eletrocutados em linhas de alta tensão, especialmente nas pequenas populações que vivem em parques localizados em áreas urbanas (LOKSCHIN et al., 2007).

2.1.2.1 Reprodução

Segundo Auricchio (1995), a reprodução de todos os bugios é muito semelhante. O gênero *Alouatta* é caracterizado por animais poligínicos e poligâmicos, o que significa que há muitas fêmeas para cada macho, e que a mesma fêmea também pode acasalar com diferentes machos, sejam eles do seu grupo social ou não (NEVILLE et al., 1988; STEELE, 1989; AGORAMOORTHY; HSU, 2000). Em geral, não se observa sazonalidade ou estação reprodutiva entre

bugios (AURICCHIO, 1995; DI BITETTI; JANSON, 2000; STRIER; MENDES; SANTOS, 2001).

A maturidade sexual dos *Alouatta* acontece em torno de 24 a 37 meses de idade para as fêmeas e 35 a 42 meses de idade para os machos, segundo Crockett e Eisenberg (1987). Aurichio (1995), contudo, descreve uma maturidade sexual mais tardia para o gênero, entre quatro e cinco anos para as fêmeas e seis e oito anos para os machos.

Após a maturidade sexual, as fêmeas de *A. caraya* apresentam um escurecimento da pelagem, mudanças na estrutura vulvar e interrupção das brincadeiras infantis (SHOEMARKER, 1982). No caso dos machos, a mudança de coloração de dourado-palha dos filhotes para o preto do animal adulto ocorre em torno dos quatro a cinco anos de idade (THORINGTON JR; RUIZ; EISENBERG, 1984).

A gestação dos bugios varia entre 185 e 195 dias, nascendo apenas um filhote, que é carregado pela fêmea até o desmame (AURICCHIO, 1995; KOWALEWSKI; ZUNINO, 2004). Segundo Di Bitetti e Janson (2000), o desmame ocorre aos seis meses de idade, embora sejam encontrados na literatura registros mais longos, como nove a 12 meses (GREGORIN et al., 2008) ou mesmo 20 meses (AURICCHIO, 1995). Próximo à maturidade sexual, ou após atingi-la, machos e fêmeas emigram de seus grupos natais (PUSEY; PACKER, 1987).

Em vida livre, o intervalo entre partos de *A. caraya* é de 18 meses (KOWALEWSKI; ZUNINO, 2004), ao passo que em cativeiro já foi descrito um período menor, entre 12 a 15 meses (SHOEMARKER, 1982) ou apenas nove meses (CARMINATTI; SETZ, 2004). Não foram encontrados na literatura dados específicos para *A.g. clamitans*.

2.2 O SÊMEN E O ESPERMATOZOIDE COMO CÉLULA

O conhecimento das características seminais e da estrutura e fisiologia do espermatozoide nas diferentes espécies de primatas neotropicais é de fundamental importância para o aumento da qualidade das pesquisas envolvendo a reprodução

destas espécies. Este conhecimento, decorrente da pesquisa básica, não deve ser ignorado e substituído pela utilização única de biotecnologias da reprodução, devendo sim ser empregado de maneira sinérgica ou complementar a estas (THOMPSON, 1993). O extremo deste quadro é percebido quando se observa uma espécie altamente ameaçada de extinção e pouco, ou nada, há de conhecimento acerca da mesma (WILDT et al., 1995).

2.2.1 O Sêmen de *L. chrysomelas*, *A. caraya* e *A.g. clamitans*

Embora o número de publicações detalhando as características seminais de primatas neotropicais seja bastante restrito, sabe-se que a coagulação do sêmen durante ou após a ejaculação representa um grande entrave ao estudo e processamento das amostras, por reduzir drasticamente a qualidade seminal e volume disponível para utilização (VALLE et al., 2004). Geralmente, os ejaculados obtidos exibem a mistura de um líquido opaco amarronzado e uma parte clara e viscosa dificilmente separáveis, que se unem em um coágulo de cor marfim (VALÉRIO et al., 1969; VAN PELT; KEYSER, 1970; GOULD; WARNER; MARTIN, 1978; GOULD; MANN, 1988). Valle (2002) descreve alta concentração de espermatozoides na parte escura.

Em algumas espécies, o coágulo se liquefaz com maior facilidade que em outras. Segundo Valle (2002), o coágulo observado no sêmen do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) se desfaz naturalmente após a permanência por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Para as espécies em que o coágulo se apresenta insolúvel, tem-se desenvolvido estudos com adição de diferentes meios diluidores ao sêmen (ROUDEBUSH; MATHUR, 1998; YEOMAN et al., 1998; VALLE et al., 2004; VIDAL et al., 2007; MASSAROTTO et al., 2010; ARAKAKI et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

Essa característica de presença de coágulo de difícil dissolução se apresenta nos calitriquídeos, entre eles *L. chrysomelas*, espécie na qual Vidal et al. (2007) relataram volume médio de 11,9 µL de ejaculado após o descarte da fração coagulada. A análise da morfologia espermática de *L. chrysomelas*, pelo mesmo autor, demonstrou 32,71% de defeitos totais, predominando os dobramentos de

peça intermediária, caudas fortemente dobradas e patologias de cabeça dos espermatozoides.

Em contraste com o coágulo seminal exibido pela maioria dos primatas neotropicais, o sêmen de *A. caraya* não coagula (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004). Ainda assim, segundo Valle et al. (2004), não está esclarecido se esta característica se deve ao equipamento e protocolo utilizados na EE por via retal, ou se é realmente uma característica da espécie, ou mesmo do Gênero *Alouatta*. Independentemente, a análise do sêmen é facilitada pela ausência do coágulo, bem como a máxima recuperação de espermatozoides viáveis.

Nos dois estudos realizados com a espécie, foi relatado volume de ejaculado com média aproximada de 90 μL . A concentração média de espermatozoides é alta, tendo sido relatado por Valle et al. (2004) o valor de $649,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL, enquanto Moreland et al. (2001) encontraram valores menores, entre 7×10^6 e 583×10^6 espermatozoides/mL. A motilidade, em ambos os estudos, ficou em torno de 74%, e o alto valor possivelmente se deve à ausência do coágulo. O pH seminal foi reportado com médias de 8,1 (VALLE et al., 2004) e 8,9 (MORELAND et al., 2001). Após análise da morfologia espermática, Valle et al. (2004) relataram 21,3% de defeitos totais, contra 37,5% observados por Moreland et al. (2001).

Não foi encontrada na pesquisa bibliográfica realizada qualquer referência à realização de colheita ou estudo do sêmen de *A.g. clamitans*.

2.2.2 O espermatozoide

Os primeiros estudos acerca da estrutura e aparência dos espermatozoides datam de 1677, embora nessa época fossem considerados uma espécie de parasita habitante do sêmen idoso. Já nessa época, contudo, se dividia a morfologia espermática em cabeça e cauda, sendo a cauda reconhecida como responsável pela motilidade da célula. Os estudos contemporâneos acerca dos espermatozoides de primatas iniciaram-se nos primeiros anos do século passado utilizando microscopia de luz, conduzidos especialmente por Ballowitz (1909), Retzius (1909, 1912 e 1914) e Friedenthal (1910), e não tiveram prosseguimento por muitos anos,

até que a descrição da morfologia interna da célula se tornou possível por meio de microscopia eletrônica de transmissão, em estudos conduzidos por Fawcett (1970), Pedersen (1972) e Bedford (1974), conforme referido por Gould (1980).

A forma dos espermatozoides é extremamente semelhante na maioria das espécies de mamíferos, salvo os roedores que possuem um acrossomo curvado característico. O tamanho, embora sofra pequena variação entre os animais domésticos, fica entre 50 e 75 μm . São formados no interior dos túbulos seminíferos dos testículos, onde se localizam as células germinativas precursoras. Um espermatozoide completamente desenvolvido é uma célula alongada, formada por uma cabeça achatada contendo o núcleo e o acrossomo, e uma cauda que contém o aparelho necessário para a motilidade celular, subdividida nas peças intermediária, principal e terminal. Cabeça e cauda são conectadas pelo colo, e a membrana plasmática que recobre todo o espermatozoide é denominada plasmalema (GARNER; HAFEZ, 2004; SAMUELSON, 2007; WROBEL; BERGMANN, 2012; BRACKETT, 2014).

A cabeça é caracterizada por conter o núcleo achatado e de forma oval, onde se encontra a cromatina altamente condensada. O número cromossômico é haploide, representando apenas a metade do número encontrado nas células somáticas de cada espécie. A extremidade anterior do núcleo é coberta pelo acrossomo, uma vesícula com dupla camada de membranas que abriga enzimas proteolíticas e hidrolíticas como a acrosina e a hialuronidase, fundamentais à penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito (GARNER; HAFEZ, 2004; SAMUELSON, 2007; WROBEL; BERGMANN, 2012).

O colo, ou peça de conexão, faz a ligação da cabeça à cauda do espermatozoide, sendo constituído por um centríolo e nove fibras eletrodensas que se projetam ao longo da maior parte da cauda. Está ligado diretamente à peça intermediária, sendo esta constituída, em seu interior, por um axonema formado por nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois microtúbulos simples centrais. Envolvendo e acompanhando a extensão deste axonema, são observadas as nove fibras eletrodensas de conexão com o colo, dispostas em sentido longitudinal e circundadas por mitocôndrias em arranjo helicoidal. Estas mitocôndrias são responsáveis pela geração da energia necessária para a motilidade espermática. A transição da peça intermediária para a peça principal é

marcada por um estreitamento denominado ânulo (GARNER; HAFEZ, 2004; SAMUELSON, 2007; WROBEL; BERGMANN, 2012) (Figura 5).

Figura 5 – Diagrama da ultraestrutura de um espermatozoide

(BRACKETT, 2014)

- A – Principais regiões estruturais conforme revelado pela microscopia de luz.
 B – Características ultra-estruturais generalizadas da cabeça e de um fragmento da peça de conexão.
 C – Ultra-estrutura da porção principal proximal da cauda.
 D – Detalhe generalizado da ultra-estrutura do axonema da cauda.

A peça principal, de constituição mais simples, é composta pelo axonema circundado por suas fibras eletrodensas, que aqui encontram seu número reduzido a sete, após o término de duas delas na região do ânulo. Externamente, observa-se uma bainha fibrosa característica desta porção da cauda. O diâmetro da peça principal vai se afinando gradativamente em direção à peça terminal. A peça terminal, por fim, é marcada pelo término da bainha fibrosa e contém, portanto, apenas o axonema recoberto pela membrana plasmática. Os nove pares de microtúbulos característicos do axonema vão se tornando gradativamente estruturas unitárias, conforme se aproximam do final da peça terminal, e têm seu fim em níveis variados (GARNER; HAFEZ, 2004; SAMUELSON, 2007; WROBEL; BERGMANN, 2012).

Após extensa pesquisa envolvendo análises ultraestruturais de espermatozoides de primatas, Gould (1980) conclui que há grande uniformidade entre estes espermatozoides, sendo eles pequenos e móveis e demonstrando uma estrutura interna e externa básica similar entre as espécies e correspondente à descrita acima: material genético contido na cabeça do espermatozoide, cabeça dotada de citoplasma muito pobre, uma peça intermediária contendo mitocôndrias, responsáveis pela geração de energia, e uma cauda móvel. Pequenas variações na espessura da membrana celular e no tamanho do núcleo podem ser observadas. As maiores variações morfológicas encontradas envolvem tamanho e forma da membrana acrossomal, além do número, tamanho e organização das mitocôndrias na peça intermediária.

2.3 BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO

O crescente desenvolvimento de biotecnologias associadas à reprodução de primatas tem encontrado como principal justificativa, nos dias atuais, o aumento na destruição do meio ambiente devido à urbanização desordenada das cidades, caça e comércio clandestino de fauna e flora (VALLE, 2002). Estas biotecnologias têm sido, portanto, importantes ferramentas para a reprodução, seja em vida livre ou em cativeiro, contribuindo para a preservação da biodiversidade e manutenção da diversidade genética (VALLE, 2007).

Existem diversos métodos descritos para a colheita de sêmen em primatas, incluindo a ejaculação natural, punção direta do epidídimo, masturbação, lavagem vaginal após a cópula, vagina artificial, eletroejaculação por via retal e vibroestimulação peniana (KRAEMER; CRUZ, 1969; BADER, 1983; LANZENDORF et al., 1992; GOULD; YOUNG, 1996; MORRELL; KÜDERLING; HODGES, 1996; POPE et al., 1997; YEOMAN et al., 1997). Para primatas neotropicais, a eletroejaculação por via retal (EE) tem sido a técnica de eleição para boa parte das espécies, embora a vibroestimulação peniana (PVS) venha sendo adotada com frequência e sucesso nos estudos mais recentes envolvendo espécies de pequeno porte, como sagui e macaco-de-cheiro (DURRANT, 1990; YEOMAN et al., 1997; YEOMAN et al., 1998; KÜDERLING et al., 2000; VALLE; GUIMARÃES; NAYUDU, 2006).

A EE tem sido um método de colheita de sêmen considerado seguro e apropriado à aplicação em primatas neotropicais, sendo necessária adequação do protocolo à espécie animal utilizada, ou mesmo a cada indivíduo. O principal fator de risco associado à técnica é a necessidade de anestesia geral durante todo o procedimento (DURRANT, 1990). A colheita de sêmen de primatas neotropicais por EE já foi descrita em diversas espécies, como Bugio – *Alouatta caraya* (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO, 2012), Macacos-de-Cheiro – *Saimiri sciureus* (BENNETT, 1967; LANG, 1967; ACKERMAN; ROUSSEL, 1968) e *Saimiri boliviensis* (ROUDEBUSH; MATHUR, 1998; YEOMAN et al., 1998), Saguis – *Callithrix jacchus* (CUI et al., 1991; CUI, 1996; MORRELL; KÜDERLING; HODGES, 1996; VERONA et al., 2009) e *Saguinus mystax* (HARRISON; WOLF, 1985), Macaco-Prego – *Cebus apella* (ACKERMAN; ROUSSEL, 1968; BUSH et al., 1975; GUIMARÃES, 1994; BARNABE et al., 2002; PAZ et al., 2006a, b; ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010, 2011), Macacos-Aranha – *Ateles geoffroyi* (HERNÁNDEZ-LOPEZ et al., 2002a, b; 2008a), *Ateles paniscus* e *Ateles marginatus* (SILVA, 2005), Mico-Leão – *Leontopithecus chrysomelas* (VIDAL et al., 2007) e Mico-de-Goeldi – *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011).

Apesar da frequente utilização, e de ser a técnica preconizada para muitas espécies de primatas neotropicais, a EE tem resultado em sêmen de menor qualidade quando comparada com outras técnicas de colheita (GOULD; YOUNG,

1996; MORRELL; KÜDERLING; RODGES, 1996; YEOMAN et al., 1997; YEOMAN et al., 1998; SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004).

A PVS tem sido descrita como uma boa alternativa à EE para as menores espécies de primatas neotropicais, como *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997; YEOMAN et al., 1998), *Callithrix jacchus* (SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004) e *Leontopithecus chrysomelas* (SANTOS et al., 2014). O sêmen colhido por PVS apresentou melhor qualidade e menor quantidade de coágulo em *Saimiri boliviensis*, além de concentração espermática, motilidade, número total de espermatozoides por ejaculado e percentual de espermatozoides vivos significativamente maior em *Callithrix jacchus*. Outra grande vantagem da técnica é a possibilidade de realização sem a necessidade de anestesia do animal, aumentando a segurança do procedimento (YEOMAN et al., 1997; YEOMAN et al., 1998; SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004).

Um entrave significativo ao processamento e utilização de sêmen de primatas é a coagulação, que para muitas espécies acontece durante ou logo após a ejaculação (MORRELL; HODGES, 2001; VALLE, 2002). Esta característica é comumente observada entre os primatas com sistemas de acasalamento multi-machos e multi-fêmeas, sugerindo, segundo Hernández-López et al. (2008b), que esteja relacionada com o processo de competição espermática, favorecendo a passagem dos espermatozoides mais velozes em direção ao útero.

Atualmente, são encontrados na literatura protocolos para dissolução do coágulo de sêmen apenas para primatas do velho mundo (GOULD; WARNER; MARTIN, 1978; GOULD; STYPEREK, 1989; TOLLNER et al., 1990; THOMSON et al., 1992; SANKAI et al., 1994). Os resultados apresentados nos estudos com primatas neotropicais não exibem o mesmo sucesso: a utilização das enzimas hialuronidase e tripsina não foi eficiente na dissolução completa do coágulo seminal de *Cebus apella* (PAZ et al., 2006b) e de *Saimiri sciureus* (KUGELMEIER, 2011). Melhores resultados foram obtidos com a fragmentação mecânica do coágulo de *C. apella* dissolvido em diluidor à base de água de coco ou TES-Tris (ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Em outro estudo com sêmen de *Atelles geoffroyi*, contudo, a comparação da agitação manual do sêmen com a adição de tripsina exibiu melhores resultados para o sêmen diluído em tripsina (HERNÁNDEZ-LOPEZ et al., 2002b).

Segundo Morrell e Hodges (2001), os meios diluidores utilizados para sêmen de primatas costumam ser produzidos à base de gema de ovo e tampões como TES, Tris e citrato de sódio. Para protocolos que não exigem a posterior congelação do sêmen, já foi descrita a utilização de diluidores como Biggers, Whitten e Whittingham's – BWW para *Saimiri boliviensis* (ROUDEBUSH; MATHUR, 1998; YEOMAN et al., 1998) e *Leontopithecus chrysomelas* (SANTOS et al., 2014), Ringer-Lactato para *Alouatta caraya* (VALLE et al., 2004; CARVALHO, 2012), Ham's F-10 para *Leontopithecus chrysomelas* (VIDAL et al., 2007), TALP-Hepes para *Callithrix penicillata* (MASSAROTTO et al., 2010) e diluidor à base de água de coco para *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2012).

A avaliação espermática tem grande importância, pois a qualidade do espermatozoide é essencial para a ocorrência da fecundação, tanto natural quanto artificial (VALLE, 2007). De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), esta avaliação compreende características físicas (volume, aspecto, movimento de massa, motilidade, vigor e concentração) e morfológicas (diferenciação de espermatozoides normais e anormais). As análises iniciais de sêmen, feitas logo após a colheita, costumam incluir a avaliação do pH seminal, concentração espermática e motilidade (espermatozoides móveis e espermatozoides com motilidade progressiva rápida e retilínea) (JANINI; PEREIRA, 2001; HAFEZ; HAFEZ, 2004; WHO, 2010).

A avaliação da integridade de membrana plasmática é importante por fornecer informação quanto à permeabilidade de membrana e, portanto, viabilidade da célula (GRAHAM, 2001), e pode ser feita por meio de corantes ou teste hiposmótico (WHO, 2010). Para primatas neotropicais, os métodos descritos fazem a avaliação por meio de corantes, como eosina-nigrosina para *Saimiri boliviensis* (BENNETT, 1967), *Callithrix jacchus* (KÜDERLING; MORRELL; NAYUDU, 1996; MORRELL; KÜDERLING; HODGES, 1996; VALLE, 2007; VALLE et al., 2008), *Cebus apella* (ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010, 2011), *Callithrix penicillata* (MASSAROTO et al., 2010), *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011) e *Alouatta caraya* (CARVALHO, 2012), eosina Y para *Cebus apella* (BUSH et al., 1975), *Callithrix jacchus* (KÜDERLING et al., 2000), e *Alouatta caraya* (VALLE et al., 2004), e eosina B para *Ateles geoffroyi* (HERNÁNDEZ-LOPEZ et al., 2002a). A coloração com eosina-nigrosina já foi validada para duas espécies de primatas neotropicais,

Callithrix jacchus (VALLE, 2007) e *Leontopithecus chrysomelas* (SANTOS et al., 2014).

Segundo Graham (2001), o princípio das técnicas de avaliação de integridade de membrana plasmática é que membranas íntegras impedem a entrada de moléculas grandes (como corantes) na célula. Assim, espermatozoides com membranas plasmáticas íntegras não são corados, sendo considerados vivos. Espermatozoides corados são, portanto, considerados mortos por se pressupor lesão de membrana plasmática (GRAHAM, 2001; BJÖRND AHL; SÖDERLUND; KVEST, 2003). A integridade da membrana plasmática é essencial por limitar o meio intracelular e por permitir as interações célula-célula, como no caso do espermatozoide com o epitélio do trato genital feminino ou com o oócito (RODRIGUEZ-MARTINEZ; LARSSON; PERTOFT, 1997).

A avaliação da integridade da membrana acrossomoal é importante pois o acrossomo contém enzimas envolvidas no processo de penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito, favorecendo assim a fecundação. Para tanto, existem colorações não fluorescentes e fluorescentes (FLESCHE; GADELLA, 2000; GARNER; HAFEZ, 2004).

As colorações não fluorescentes são mais baratas e demandam menor complexidade de processamento, como a coloração simples descrita por Pope, Zhang e Dresser (1991), já utilizada e validada em *Callithrix jacchus* (VALLE et al., 2008), e utilizada em *Cebus apella* (PAZ et al., 2006a, 2006b), *Callithrix penicillata* (MASSAROTTO et al., 2010), *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011) e *Alouatta caraya* (CARVALHO, 2012), e a coloração com *kit* comercial Spermac[®] descrita em *Callithrix jacchus* (VALLE, 2007), *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011) e *Alouatta caraya* (CARVALHO, 2012). Colorações mais complexas envolvem a utilização de sondas fluorescentes, como FITC-PSA ou FITC-PNA, tendo sido descritas para *Callithrix jacchus* (PUDRITZ, 2000; O'BRIEN et al., 2003; VALLE et al., 2008). Espermatozoides íntegros apresentam coloração arroxeada na região de acrossomo quando corados pela coloração simples de Pope, Zhang e Dresser (1991), azulada/esverdeada quando corados com o *kit* comercial Spermac[®] e fluorescência verde intensa quando utilizadas as sondas FITC-PSA ou FITC-PNA.

Além das análises de integridade das membranas plasmática e acrossomal, realizadas neste estudo, outras colorações com diferentes objetivos têm sido

aplicadas ao sêmen de primatas neotropicais, como a análise da atividade citotóxica mitocondrial (DAB) descrita em sêmen de *Callithrix jacchus* (VALLE, 2007), *Callithrix penicillata* (MASSAROTTO et al., 2010) e *Alouatta caraya* (CARVALHO, 2012) e a análise da fragmentação de DNA (SCSA) em *Alouatta caraya* (CARVALHO, 2012) e *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011).

A avaliação da morfologia espermática pode ser feita visualmente ao microscópio ou de maneira automatizada, utilizando *softwares* desenvolvidos para este fim. Para análise visual, podem ser utilizados esfregaços corados ou preparações úmidas que devem ser lidas em microscópio de contraste de fase. Os espermatozoides anormais são classificados em defeitos maiores ou menores, e têm um potencial de fecundação inferior. A alta concentração destes defeitos está, portanto, associada à fertilidade reduzida (BLOM, 1973; CBRA, 1998; MOCÉ; GRAHAM, 2008; WHO, 2010).

A análise dos espermatozoides sob microscopia de luz, entretanto, possui limitações técnicas óbvias em termos de resolução, não permitindo a identificação da variedade total de defeitos morfológicos que podem acometer as organelas dos espermatozoides. Tais limitações podem ser superadas com o uso de microscopia eletrônica de transmissão, que permite a exploração da ultraestrutura celular e estudo rigoroso das diferentes organelas, e microscopia eletrônica de varredura, que fornece a imagem tridimensional do espermatozoide. Ambas as técnicas permitem uma avaliação mais detalhada das características espermáticas, sendo os melhores métodos para estudo de teratozoospermia, uma combinação heterogênea de defeitos na forma dos diferentes componentes celulares, que influencia negativamente no potencial de fecundação do espermatozoide (MORETTI; COLLODEL, 2012).

3 OBJETIVOS

- Padronizar a colheita de sêmen de *Alouatta guariba clamitans* por eletroejaculação por via retal com posterior análise do sêmen fresco, procedimentos inéditos para a espécie na literatura científica.
- Adaptar o método de preparo do sêmen de *Leontopithecus chrysomelas*, *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* para microscopia eletrônica de transmissão, nunca descrita para estas espécies.
- Descrever e comparar a ultraestrutura do espermatozoide entre as espécies *Leontopithecus chrysomelas*, *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*, contribuindo para os estudos da morfologia celular e reprodução assistida em prol da preservação das espécies.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este projeto teve sua execução respaldada na aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP sob o protocolo nº 5543 e aprovação pelo Sistema de Autorização de Informação em Biodiversidade – SISBIO, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, Ministério do Meio Ambiente – MMA, sob autorizações nº 48049-3 para *Leontopithecus chrysomelas* e *Alouatta guariba clamitans* e licença permanente nº 30086-1 para *Alouatta caraya*.

Os materiais e métodos utilizados serão descritos em sequência cronológica da realização dos procedimentos e, sempre que necessário, serão detalhados individualmente para cada espécie envolvida na pesquisa, dadas as variações e adaptações exigidas em função do modelo animal.

4.1 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados oito machos adultos, mantidos em cativeiro, listados a seguir:

- Quatro exemplares de *L. chrysomelas* do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro – CPRJ, mantidos em recinto de alvenaria e aço inoxidável com 6 m de comprimento, 3 m de largura e 3 m de altura, permitindo a entrada de ventilação e luz natural, exclusivamente. Cada recinto abrigava 4 a 5 animais de ambos os sexos, sendo os filhotes machos transferidos de recinto após a segunda experiência sexual. A limpeza do recinto era realizada diariamente três vezes ao dia, sendo recolhidos todos os restos alimentares. Os animais tinham acesso a água *ad libitum* e eram alimentados com frutas, legumes e ração comercial para primatas duas vezes ao dia, recebendo ainda insetos como tenébrios e gafanhotos esporadicamente.

- Dois exemplares de *A. caraya* do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens – CEMPAS, da Universidade do Estado de São Paulo – UNESP – Botucatu, mantidos cada um em um recinto de aço inoxidável de 2 m de comprimento, 1 m de largura e 2 m de altura, sem a companhia de outros animais, mas com contato visual com outros *Alouatta*, lateralmente e em frente ao recinto. O recinto permitia a entrada de ventilação e luz natural, e a limpeza do chão era realizada diariamente com água corrente. Os animais tinham acesso a água *ad libitum* em bebedouro do tipo *Niple* e eram alimentados com frutas, verduras, legumes, ovo cozido e ração comercial para primatas duas vezes ao dia.
- Um exemplar de *A.g. clamitans* do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens – CEMPAS, da Universidade do Estado de São Paulo – UNESP – Botucatu, mantido em recinto de aço inoxidável de 2 m de comprimento, 1 m de largura e 2 m de altura, sem a companhia de outros animais, mas com contato visual com outros *Alouatta*, lateralmente e em frente ao recinto. O recinto permitia a entrada de ventilação e luz natural, e a limpeza do chão era realizada diariamente com água corrente. O animal tinha acesso a água *ad libitum* em bebedouro do tipo *Niple* e era alimentado com frutas, verduras, legumes, ovo cozido e ração comercial para primatas duas vezes ao dia.
- Um exemplar de *A.g. clamitans* do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro – CPRJ, mantido em recinto de alvenaria e aço inoxidável com 6 m de comprimento, 3 m de largura e 3 m de altura, permitindo a entrada de ventilação e luz natural, exclusivamente. O recinto abrigava mais um macho adulto de *A. caraya*, e a limpeza era realizada diariamente três vezes ao dia, sendo recolhidos todos os restos alimentares. O animal tinha acesso a água *ad libitum* e era alimentado com frutas, vegetais e ração duas vezes ao dia.

A descrição dos animais utilizados encontra-se resumida no quadro 1.

Quadro 1 – Animais participantes do experimento. A sigla para identificação traz as iniciais da espécie seguidas de um número para identificação de cada indivíduo. A composição do grupo retrata os animais residentes no mesmo recinto do indivíduo experimental

Espécie	Identificação	Peso	Origem	Composição do grupo	Número de colheitas
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Lc1	...	CPRJ	5 animais, contendo machos e fêmeas	01
	Lc2	...			01
	Lc3	...			01
	Lc4	...			01
<i>Alouatta caraya</i>	Ac1	8,2 Kg	CEMPAS	Sozinho	03
	Ac2	7,7 Kg		Sozinho	02
<i>Alouatta guariba clamitans</i>	Agc1	6,0 Kg	CPRJ	Sozinho	02
	Agc2	7,0 Kg		1 macho	01

4.2 CONTENÇÃO

Para realização da morfometria testicular e colheita de sêmen, cada espécie foi submetida a um protocolo específico de contenção, descrito a seguir. Todos os animais, após a contenção, tiveram suas regiões genital e inguinal limpas com gaze umedecida em solução fisiológica e, quando necessário, os pêlos foram aparados com tesoura.

4.2.1 *L. chrysomelas*

L. chrysomelas foram contidos manualmente com auxílio de um puçá durante todos os procedimentos. A sala foi mantida à meia luz e, após o término do procedimento, os animais foram retirados da mesma.

Durante a colheita, um assistente treinado fazia, com uma das mãos, a contenção da cabeça, tórax e membros torácicos do animal, enquanto com a outra mão sustentava o membro pélvico esquerdo e a cauda, deixando a região genital livre para os estímulos, conforme descrito por Arakaki (2013).

4.2.2 *A. caraya* e *A.g. clamitans*

A. caraya e *A.g. clamitans* tiveram contenção farmacológica realizada a partir do protocolo descrito por Valle et al. (2004): Cloridrato de Quetamina (Dopalen[®], Ceva[®], Paulínia, São Paulo, Brasil) 7,5 mg/Kg associado a Cloridrato de Xilazina (Anasedan[®], Ceva[®], Paulínia, São Paulo, Brasil) 0,5 mg/Kg por via intramuscular. Quando necessário, a manutenção da anestesia foi feita pela reaplicação da metade da dose de Quetamina. A recuperação do procedimento anestésico ocorria após 60 a 90 minutos.

Após a anestesia, o animal era colocado sobre um cavalete de madeira especialmente desenvolvido para proporcionar posicionamento adequado para realização do procedimento de colheita de sêmen por eletroejaculação por via retal, primeiramente descrito para utilização em macacos *Rhesus* por Wagstaff (1972). Membros pélvicos e cauda do animal eram amarrados firmemente ao cavalete para evitar quedas e não prejudicar a colheita devido às contrações involuntárias dos membros seguidas à estimulação elétrica.

4.3 MORFOMETRIA TESTICULAR

A morfometria testicular foi realizada de maneira semelhante para todas as espécies, logo após a contenção. Foi utilizado paquímetro para aferição das medidas de comprimento, largura e espessura de cada um dos testículos, descritas em milímetros, e a circunferência escrotal foi medida com fita métrica e descrita em centímetros (Figura 6).

Figura 6 – Medição do comprimento testicular com paquímetro em *A. caraya* (A) e medição da circunferência escrotal com fita métrica em *A.g. clamitans* (B)

Fotos: Paloma Rocha Arakaki

4.4 COLHEITA DO SÊMEN

O sêmen de *L. chrysomelas* foi colhido por vibroestimulação peniana (PVS), uma técnica que tem sido descrita como boa alternativa à eletroejaculação por via retal (EE) para as menores espécies de primatas neotropicais, e descrita para a espécie por Santos et al. (2014). Esta técnica tem sido preferida por não causar danos ao animal, além de não ser necessário o uso de anestesia.

A. caraya e *A.g. clamitans*, espécies de maior porte, tiveram o sêmen colhido por EE, sob contenção farmacológica.

4.4.1 *L. chrysomelas*

L. chrysomelas tiveram o sêmen colhido por PVS, por meio do uso de vibrador peniano FertiCare® (Multicept ApS, Rungsted, Dinamarca), seguindo protocolo descrito por Valle et al. (2008). O aparelho de vibroestimulação foi adaptado de maneira a servir de suporte para uma vagina artificial (KÜDERLING et al., 2000), onde foi acoplado um tubo de vidro cilíndrico com bordas arredondadas para recepção do sêmen colhido, conforme descrito por Arakaki (2013) para saguis.

Para que ocorresse o estímulo, o tubo era aproximado suavemente do pênis e região perianal dos animais, tendo sido utilizada frequência de 75 Hz e amplitude de 1,5 mm. O procedimento de colheita consistiu de uma repetição de séries de dois minutos de estimulação seguidas por 30 segundos de descanso. As séries se repetiam até que houvesse a ejaculação, ou até que se atingisse o tempo limite de 20 minutos de manipulação do indivíduo (Figura 7).

Figura 7 – Aparelho de vibroestimulação peniana adaptado para colheita de sêmen de primatas de pequeno porte, com tubo de vidro acoplado para a colheita de sêmen (A) e colheita de sêmen por vibroestimulação penina em *L. chrysomelas* (B)

Foto: Rodrigo del Rio do Valle

Foto: Ana Paula Grabner

Após a obtenção dos ejaculados, foi adicionado a cada amostra 400 μ L de meio diluidor Biggers, Whitten e Whittingham's – BWB (Apêndice B) a 37°C, diretamente no tubo de colheita, para evitar a ocorrência de choque térmico enquanto a amostra aguardava processamento.

Considerando o pequeno volume do ejaculado de *L. chrysomelas* e a formação de coágulo após a colheita, nos casos em que a colheita resultou em concentração de espermatozoides recuperados da fração líquida menor que 10.000.000 spz/mL, foi realizado um *pool* de espermatozoides dos animais do plantel do CPRJ, a fim de se obter a concentração espermática adequada à realização da microscopia eletrônica.

4.4.2 *A. caraya* e *A.g. clamitans*

O sêmen de *A. caraya* e *A.g. clamitans* foi colhido por EE, utilizando um modelo de eletroejaculador para gado (DUBOI[®], Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil), adaptado para grandes primatas neotropicais. O aparelho possui uma probe com haste de resina de 1,2 cm de diâmetro por 11,4 cm de comprimento, e permite controle manual de regulação da intensidade e duração do estímulo elétrico. O equipamento e protocolo utilizados já foram descritos por Valle et al. (2004) para utilização em *Alouatta caraya*.

Para início da EE, a probe do eletroejaculador foi lubrificada com KY[®] gel (Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para a Saúde Ltda) e introduzida no reto do animal, e o protocolo se iniciou com estímulos de 2,0 V. A voltagem foi sendo gradativamente aumentada em 0,5 V a cada série de estímulos realizada, não podendo ultrapassar 8,0 V. Cada série consistiu em 30 estímulos de 2-3 segundos, separados por intervalos de 2-3 segundos entre estímulos sucessivos (Figura 8).

Figura 8 – Aparelho eletroejaculador adaptado para a utilização em grandes primatas neotropicais (A) e colheita de sêmen por eletroejaculação por via retal em *A. caraya* (B)

Foto: Rodrigo del Rio do Valle

Foto: Paloma Rocha Arakaki

O sêmen foi colhido em um tubo de vidro cilíndrico com bordas arredondadas, mantido a 37°C. Após a obtenção dos ejaculados, foi adicionado 500 µL de Ringer-Lactato (Laboratório Sanobiol, São Paulo, Brasil) a 37°C diretamente no tubo de colheita, para evitar ocorrência de choque térmico enquanto a amostra aguardava processamento.

4.5 ANÁLISE PRIMÁRIA DO SÊMEN

O sêmen foi avaliado quanto ao volume, pH, concentração, motilidade, integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e morfologia.

As análises de volume, pH, motilidade e integridade das membranas plasmática e acrossomal, que exigem avaliação imediata após a colheita, foram realizadas nas próprias instalações das instituições de abrigo dos animais. Para as análises de concentração e morfologia, uma alíquota do sêmen foi diluída em formol salina para análise posterior no laboratório de andrologia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP.

Os dados provenientes das análises de cada amostra colhida foram registrados nas fichas exibidas no apêndice A.

4.5.1 Processamento do sêmen

Imediatamente após a ejaculação, o pH seminal era mensurado com fita medidora de pH (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), suavemente encostada à extremidade do pênis ainda úmido (Figura 9).

Figura 9 – Leitura do pH do sêmen de *A. caraya*

Foto: Ana Paula Grabner

Em seguida, o meio diluidor previamente descrito para cada espécie era adicionado ao mesmo tubo de colheita, para aumentar o volume da amostra e possibilitar a realização das análises do sêmen fresco. Durante a diluição do sêmen, o volume seminal era aferido pela subtração do volume de meio diluidor, do volume total da amostra já diluída. A amostra era então transferida para um tubo eppendorf, mantido em banho-maria a 37°C durante todo o período de realização das análises.

4.5.2 Motilidade total e motilidade progressiva

Após a diluição do sêmen e aferição do volume, as amostras foram submetidas à análise para determinar o percentual de espermatozoides móveis (motilidade total) e espermatozoides móveis com movimentos progressivos (motilidade progressiva). Para tanto, 10 µL do sêmen diluído eram colocados sobre lâmina de vidro para microscopia e cobertos com lamínula (preparação úmida), e observados ao microscópio na objetiva de 40X.

4.5.3 Concentração espermática

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2010), concentração espermática representa o número de espermatozoides encontrados no sêmen, divididos pelo volume seminal. Para aferição da concentração espermática, 10 µL do sêmen diluído eram homogeneizados em 90 µL de solução de formol salina a 10%, em eppendorf. A solução de sêmen diluído em formol salina era então reservada para posterior análise de concentração e morfologia, que não demandam análise imediata.

Para o cálculo da concentração espermática, 10 µL da solução de sêmen diluído em formol salina eram dispostos em cada lado da câmara de Neubauer *improved*. Os espermatozoides eram contados ao longo de cinco quadrados em cada lado da câmara, em microscópio de contraste de fase na objetiva de 40X.

O cálculo da concentração obedeceu à seguinte fórmula:

$$\text{Sptz/mL} = (\sum \text{sptz } 10 \text{ quadrados} / 2) \times 5 \times \text{fator de diluição} \times 10 \times 1000$$

Onde: fator de diluição = $[(\text{vol. diluidor} + \text{vol. amostra}) / \text{vol. amostra}] \times 10$

4.5.4 Integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada por meio da coloração com eosina-nigrosina (Vita Scan[®], Lucron Bioproducts, Holanda), conforme protocolo validado para *Callithrix jacchus* (VALLE, 2007) e *Leontopithecus chrysomelas* (SANTOS et al., 2014).

Para realização da técnica, 5 µL do sêmen diluído eram homogeneizados, em eppendorf, com 5 µL de eosina-nigrosina, e incubados por 30 segundos. Após a incubação, 5 µL eram então utilizados para confecção de esfregaço em lâmina de vidro, posta para secar sobre placa aquecida a 37°C. Após a secagem, a lâmina era

imediatamente levada ao microscópio na objetiva de 100X, sob óleo de imersão, para a contagem de 200 espermatozoides.

Espermatozoides com membranas plasmáticas íntegras não são corados, sendo considerados vivos. Espermatozoides corados são considerados mortos por se pressupor lesão de membrana plasmática (Figura 10).

Figura 10 – Fotomicrografia de espermatozoides de *A.g. clamitans* corados com eosina-nigrosina, objetiva de 100 X sob óleo de imersão. Espermatozoide não corado apresenta membrana plasmática íntegra (A) e espermatozoide corado apresenta membrana plasmática não íntegra (B)

Fotos: Ana Paula Grabner

4.5.5 Integridade de membrana acrossomal

A integridade da membrana acrossomal foi avaliada por meio da coloração simples para acrossomo (POPE et al., 1991), conforme protocolo validado para *Callithrix jacchus* por Valle et al. (2008).

Para realização da técnica, 5 µL do sêmen diluído eram homogeneizados, em eppendorf, com 5 µL de corante simples para acrossomo, e incubados por 90 segundos. Após a incubação, 5 µL eram então utilizados para confecção de esfregaço em lâmina de vidro, posta para secar sobre placa aquecida a 37°C. Após a secagem, a lâmina era imediatamente levada ao microscópio na objetiva de 100X, sob óleo de imersão, para a contagem de 200 espermatozoides.

Espermatozoides íntegros apresentam coloração arroxeada na região de acrossomo, diferentemente dos lesados, que possuem toda a cabeça com coloração mais clara e homogênea (Figura 11).

Figura 11 – Fotomicrografia de espermatozoides de *A.g. clamitans* corados com corante simples para acrossomo, objetiva de 100 X sob óleo de imersão. Espermatozoide com acrossomo corado apresenta membrana acrossomal íntegra (A) e espermatozoide com acrossomo não corado apresenta membrana acrossomal não íntegra (B)

Fotos: Ana Paula Grabner

4.5.6 Morfologia espermática

A mesma solução de sêmen com formol salina, preparada previamente para concentração, foi utilizada para análise da morfologia espermática por meio de preparação úmida. Para tanto, 10 µL dessa solução eram dispostos em uma lâmina de vidro para microscopia e cobertos com lamínula, e 100 espermatozoides eram avaliados na objetiva de 100X em microscópio de contraste de fase, sob óleo de imersão. Após a análise, foi estabelecido o percentual de células portadoras de morfologia normal, de defeitos maiores e de defeitos menores, conforme avaliação descrita por Valle (2007) para *Callithrix jacchus*.

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Após a realização da análise primária, o volume restante do sêmen diluído foi fixado em glutaraldeído 2% tamponado com pH 7,2, sendo respeitada a proporção de uma parte de amostra diluída para três partes de glutaraldeído. As amostras fixadas foram conservadas sob refrigeração, e enviadas o mais breve possível para processamento no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB da Universidade de São Paulo, *campus* Cidade Universitária.

Por não haver descrição na literatura de metodologia de preparo de sêmen para as espécies estudadas, foi utilizada metodologia definida no laboratório de Microscopia Eletrônica do ICB, que consiste na realização de cinco etapas básicas: fixação, desidratação, infiltração de resina, cortes ultrafinos e posterior contrastação com metais pesados.

A fixação inicial da amostra foi feita em glutaraldeído 2% tamponado com pH 7,2, no próprio local de colheita do sêmen. É necessária a permanência da amostra no glutaraldeído por ao menos uma hora, antes da realização das etapas subsequentes. A seguir, cada amostra foi centrifugada a 200 rpm por 10 minutos para formação de *pellet*. Para as amostras provenientes dos coágulos, não foi necessária a centrifugação, sendo a continuidade da técnica a partir de então, idêntica ao processamento da fração líquida. O *pellet* (ou coágulo) foi então lavado em 0,5 mL de tampão cacodilato de sódio, sendo o tampão descartado após a lavagem. Na sequência, foi adicionado ao *pellet* (ou coágulo) 0,5 mL de tetróxido de ósmio por uma hora e meia, com posterior lavagem em 0,5 mL de tampão cacodilato de sódio. O processo de fixação se completou com a adição de 1 mL de uranila *over night*.

O processo de desidratação se iniciou com a retirada da uranila da amostra, seguida por duas passagens do *pellet* (ou coágulo), por 10 minutos, em álcool 70%, duas passagens de 10 minutos em álcool 95%, quatro passagens de 10 minutos em álcool 100% e duas passagens de 10 minutos em óxido de propileno.

Para a inclusão de resina, foi misturado 0,5 mL de óxido de propileno em resina *spurr*, na proporção de 1:1, sendo a mistura adicionada ao *pellet* (ou coágulo) e mantida por quatro a oito horas em agitação lenta. A seguir esta mistura foi

substituída por resina *spurr* pura, por três a cinco horas, antes de ser depositada na forma de silicone para finalização dos blocos. Os blocos permaneceram na forma por um período mínimo de 30 horas.

Para confecção das telas, foram utilizados cortes ultrafinos do material processado, com espessura de 70 – 80 nm. Foi necessária permanência dos cortes depositados nas telas por um período mínimo de três horas, para haver adesão.

A contrastação com metais pesados se iniciou com a imersão das telas em uranila durante 5 minutos, com posterior lavagem em água bidestilada. O processo foi finalizado com a imersão em chumbo por 5 minutos, seguida de lavagem em água bidestilada.

A composição das soluções utilizadas no preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão está descrita no apêndice C.

A análise dos espermatozoides sob microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres FMVZ-USP e no Setor de Microscopia eletrônica do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram avaliados usando o programa SAS System for Windows 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias por meio do aplicativo Guided Data Analysis. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 - Log10X; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X²) e se a normalidade não fosse obtida, empregava-se, então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Para as análises paramétricas foi utilizado o teste Tukey para a comparação entre mensurações de cada porção do espermatozoide das três espécies envolvidas no estudo (*L. chrysomelas*, *A. caraya* e *A.g.clamitans*).

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias, seus respectivos erros padrões dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não haviam transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre os diferentes grupos.

5 RESULTADOS

Para as análises de ultraestrutura, foram obtidas duas amostras de sêmen por espécie. Nos casos em que as colheitas de sêmen não resultaram em amostras de qualidade para realização da microscopia eletrônica de transmissão, as colheitas foram repetidas até a obtenção de amostras consistentes para análise.

5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

As duas primeiras colheitas realizadas utilizaram o animal Ac1 e funcionaram como piloto para padronização da técnica. O protocolo então utilizado foi semelhante ao descrito neste trabalho, salvo a utilização de glutaraldeído comercial sem pH controlado para fixação inicial dos espermatozoides. Embora a análise do sêmen fresco tenha aparentado um material de qualidade, a preparação para microscopia eletrônica apresentou células fragmentadas e em decomposição, inadequadas para análise e sendo, portanto, excluídas dos resultados aqui exibidos.

A partir da terceira colheita de Ac1, foi utilizado glutaraldeído 2% tamponado com pH 7,2, e as amostras para microscopia eletrônica passaram a exibir o padrão de qualidade esperado.

5.2 AMOSTRAS

A descrição das amostras obtidas será feita separadamente por espécie.

5.2.1 *L. chrysomelas*

A primeira amostra de *L. chrysomelas* foi composta por um *pool* dos ejaculados dos animais Lc1, Lc2 e Lc3, para garantir concentração espermática

superior a 10.000.000 sptz/mL na fração líquida. Os três animais ejacularam volumes extremamente reduzidos, com presença de grande coágulo seminal.

A segunda amostra foi conseguida apenas com o ejaculado de Lc4, que não coagulou, garantindo concentração espermática superior a 10.000.000 sptz/mL na fração líquida.

A taxa de sucesso das colheitas de sêmen de *L. chrysomelas* foi de 100% (as quatro tentativas de colheita realizadas resultaram em ejaculação).

Fração líquida e coágulo foram processados e analisados separadamente para microscopia eletrônica de transmissão. Para análise do sêmen fresco, foi utilizada apenas a fração líquida do sêmen.

5.2.2 *A. caraya*

A primeira amostra de *A. caraya* foi obtida na terceira colheita do animal Ac1. O sêmen proveniente das duas primeiras colheitas deste animal foi utilizado apenas para padronização das técnicas, sendo descartado da utilização final no trabalho por não ter apresentado boa fixação após a inclusão no glutaraldeído, o que impossibilitou a realização de micorscopia eletrônica de transmissão.

A segunda amostra da espécie foi proveniente do ejaculado obtido na segunda colheita de Ac2. A primeira tentativa de colheita não resultou em ejaculação.

A taxa de sucesso das colheitas de sêmen de *A. caraya* foi de 80% (das cinco tentativas de colheita realizadas, quatro resultaram em ejaculação).

Não foi observado coágulo seminal nos ejaculados de *A. caraya*, sendo os resultados aqui exibidos derivados, portanto, apenas da análise da fração líquida.

5.2.3 *A.g. clamitans*

A primeira amostra de *A.g. clamitans* resultou de colheita única do animal Agc2.

A segunda amostra da espécie foi proveniente do ejaculado obtido na segunda colheita de Agc1, pois a primeira tentativa de colheita não resultou em ejaculação. A amostra obtida apresentou concentração de espermatozoides muito pequena, o que dificultou a obtenção de *pellet* durante o processamento para microscopia eletrônica de transmissão.

A taxa de sucesso das colheitas de sêmen de *A.caraya* foi de 66,7% (das três tentativas de colheita realizadas, duas resultaram em ejaculação).

Não foi observado coágulo seminal nos ejaculados de *A.g. clamitans*, sendo os resultados aqui exibidos derivados, portanto, apenas da análise da fração líquida.

Um resumo das amostras obtidas pode ser encontrado no quadro 2.

Quadro 2 – Animais participantes do experimento e sua contribuição com amostras de qualidade para análise da microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides

Espécie	Identificação	Número de colheitas	Amostra gerada
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Lc1	01	Sim, <i>pool</i>
	Lc2	01	
	Lc3	01	
	Lc4	01	Sim
<i>Alouatta caraya</i>	Ac1	03	Sim, na colheita 3
	Ac2	02	Sim, na colheita 2
<i>Alouatta guariba clamitans</i>	Agc1	02	Sim, na colheita 2
	Agc2	01	Sim

5.3 MORFOMETRIA TESTICULAR

Os valores obtidos durante a mensuração dos testículos dos animais participantes do experimento estão descritos na tabela 1. Os testículos de *L. chrysomelas* tiveram médias de 10,4 mm para comprimento, 7,5 mm para largura, 7,9 mm para espessura e 4,2 cm para circunferência escrotal. *A. caraya* apresentaram testículos com médias de 23,2 mm para comprimento, 17,5 mm para largura, 17,7 mm para espessura e 9,7 cm para circunferência escrotal. *A.g. clamitans* apresentaram testículos com médias de 24,5 mm para comprimento, 16,2 mm para largura, 15,7 mm para espessura e 10,5 cm para circunferência escrotal. As médias obtidas não fazem distinção entre testículo direito e testículo esquerdo.

Tabela 1 – Valores absolutos da morfometria testicular de *L. chrysomelas*, *A. caraya* e *A.g. clamitans*

Espécie	Animal	Testículo direito			Testículo esquerdo			CE (cm)
		C (mm)	L (mm)	E (mm)	C (mm)	L (mm)	E (mm)	
<i>L. chrysom.</i>	Lc1	11	8	8	10	7	7,5	4,2
	Lc2	12	9	9,5	11	8	9	4,7
	Lc3	10	8	9	8	6	7,5	4
	Lc4	11,5	7	5	10	7	7,5	4
<i>A. caraya</i>	Ac1	20	15	15	20	15	16	9
	Ac2	28	20	21	25	20	19	10,5
<i>A.g. clamitans</i>	Agc1	26	16	15	25	15	15	9,5
	Agc2	24	17	18	23	17	15	11,5

C = comprimento; L = largura; E = espessura; CE = circunferência escrotal.

5.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN FRESCO DE *L. CHRYSOMELAS*, *A. CARAYA* E *A.G. CLAMITANS*

A avaliação do sêmen fresco engloba as análises realizadas logo após a colheita do sêmen. A avaliação inicial aqui descrita se refere ao sêmen que gerou amostras de qualidade para microscopia eletrônica, exibidas no quadro 2.

Os valores absolutos de volume, pH, concentração, motilidade, motilidade progressiva, integridade de membrana plasmática e integridade de membrana acrossomal, bem como informações sobre aspecto do sêmen e presença ou não de coágulo, estão resumidos na tabela 2. Não foi possível aferir o volume da fração líquida do sêmen de *L. chrysomelas*. Assim, a concentração de espermatozoides nesta espécie foi calculada sobre o volume total da amostra já diluída em BWW.

Tabela 2 – Valores absolutos da análise do sêmen fresco: pH, volume, concentração, motilidade total, motilidade progressiva, integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal, aspecto e presença de coágulo

	<i>L. chrysomelas</i>		<i>A. caraya</i>		<i>A.g. clamitans</i>	
	<i>Pool</i>	<i>Lc4</i>	<i>Ac1</i>	<i>Ac2</i>	<i>Agc1</i>	<i>Agc2</i>
pH	7,3	7,4	8,1	7,8	8,1	7,2
Volume (µL)	...	...	22	30	20	27
Concentr. (X10 ⁶ sptz/mL)	11,7*	30,2*	729,6	3197,7	65	1727,3
Motilidade total (%)	60	50	75	70	0	60
Motilidade progressiva (%)	50	40	60	60	0	50
Memb. plasm. íntegra (%)	83,5	53,5	59	70	45	81
Acrossomo íntegro (%)	83,5	69,5	67	80	85	76,5
Aspecto	Esbr.	Esbr.	Esbr.	Leit.	Trans.	Esbr.
Coágulo	Sim	Não	Não	Não	Não	Não

Concentr. = concentração; sptz/mL = espermatozoides/mL; Esbr. = esbranquiçado; Leit. = leitoso; Trans. = esbranquiçado quase translúcido.

*Concentração da fração líquida do sêmen já diluída em 400 µL de BWB.

O animal Ac2 ejaculou espontaneamente durante o procedimento de limpeza testicular, após a exibição de contrações rítmicas dos testículos seguidas à manipulação. O ejaculado obtido apresentou a maior concentração de espermatozoides registrada durante o trabalho, conferindo coloração leitosa ao sêmen.

A análise da morfologia espermática registrou predominância de defeitos menores dos espermatozoides, especialmente caudas dobradas e cabeças delgadas. A descrição detalhada da análise morfológica realizada sob microscopia de luz encontra-se na tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação da morfologia espermática sob microscopia de luz (percentual de espermatozoides)

	<i>L. chrysomelas</i>		<i>A. caraya</i>		<i>A.g. clamitans</i>	
	<i>Pool</i>	<i>Lc4</i>	<i>Ac1</i>	<i>Ac2</i>	<i>Agc1</i>	<i>Agc2</i>
Cabeça subdesenvolvida	-	1	-	-	-	-
Pequena anormal	-	-	-	-	-	1
Contorno anormal	-	-	1	-	-	3
Cauda enrolada cabeça	-	-	1	-	4	-
Fortemente dobr/enrolada	7	7	0,5	3	4	4
Defeito peça intermediária	1	-	1	-	-	-
Formas teratológicas	-	1	0,5	1	-	1
Formas duplas	-	1	1,5	-	-	-
Total defeitos maiores	8	10	5,5	4	8	9
Cabeça delgada	11	17	1	9	4	9
Cabeça gigante	-	-	3,5	1	4	-
Isolada normal	3	1	2,5	-	8	1
Cauda dobrada	37	32	34	31	16	25
Cauda enrolada	6	2	2	9	4	4
Retroimplantação	-	1	2,5	4	-	1
Implantação oblíqua	1	1	3	7	12	6
Gota distal	2	1	-	-	-	-
Cabeça isolada + P.I.	-	-	-	1	-	-
Total defeitos menores	60	55	48,5	62	48	45
Total células normais	32	35	46	34	44	34

Fortemente dobr/enrolada = fortemente dobrada e enrolada.

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os resultados obtidos após a análise das fotos de microscopia eletrônica de transmissão serão descritos separadamente por espécie animal.

5.5.1 *L. chrysomelas*

As imagens exibidas para *L. chrysomelas* foram obtidas no microscópio de transmissão do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres FMVZ-USP.

Os espermatozoides de *L. chrysomelas* apresentaram cabeça estreita e alongada, colo suavemente estreito, peça intermediária com diâmetro pouco menor que aquele observado na cabeça e ânulo discreto (Figura 12).

Figura 12 – Visão geral do espermatozoide de *L. chrysomelas*, corte longitudinal

Foto: acervo particular

Ca = cabeça; Co = colo; PI = peça intermediária; An = ânulo; PP = peça principal

Aumento: 7100 X

A cabeça do espermatozoide apresentou uma média de 23,2 μm de comprimento por 5,2 μm de largura. Foram raras as células que exibiram a cabeça cortada em sua face mais larga, neste caso chegando a apresentar largura média de 11,8 μm .

A cabeça foi caracterizada por um núcleo grande e evidente que apresenta quantidade variável de vacuolos, e quantidade mínima de citoplasma. O núcleo encontra-se recoberto pelo acrossomo, que ocupa de metade a dois terços da porção anterior da cabeça. O acrossomo apresentou largura média de 0,2 μm (Figuras 13 e 14).

Figura 13 – Cabeça do espermatozoide de *L. chrysomelas*, corte longitudinal

Foto: acervo particular

nu = núcleo; ac = acrossomo

Aumento: 11000 X

Figura 14 – Comparação entre acrossomos do espermatozoide de *L. chrysomelas*, corte longitudinal

Foto: acervo particular

1 = cabeça apresentando acrossomo íntegro; 2 = cabeça apresentando acrossomo em processo de liberação de vesículas

Aumento: 7100 X

O colo, ou peça de conexão, é a região localizada entre a cabeça e a peça intermediária, sendo caracterizado pela presença de um centríolo, o centríolo proximal (orientado transversalmente à célula), e de colunas segmentadas que conferem aspecto de faixas transversais características nesta região (Figura 15).

Figura 15 – Colo do espermatozoide de *L. chrysomelas*, corte longitudinal

Foto: acervo particular

Ca = cabeça; Co = colo; cp = centríolo proximal = PI = peça intermediária

Aumento: 28000 X

A peça intermediária apresentou comprimento médio de 29,6 μm por 4,5 μm de largura. É caracterizada por um axonema microtubular 9+2 central envolto por nove fibras densas. Este conjunto é envolvido por uma bainha mitocondrial helicoidal e, por fim, uma membrana plasmática (Figura 16).

Figura 16 – Peça intermediária do espermatozoide de *L. chrysomelas*, cortes longitudinal (A) e transversal (B)

Foto: acervo particular

ax = axonema; fd = fibras densas; mi = mitocôndrias da bainha mitocondrial helicoidal; mp = membrana plasmática

Aumento: 22000 X

A peça principal apresentou média de 2,1 μm de diâmetro. É formada pelo axonema microtubular 9+2 central, que se continua desde a peça intermediária. A continuidade das fibras densas originadas na peça intermediária foi confirmada na observação de cortes longitudinais, mas dificilmente percebida em cortes transversais, o que impediu sua contagem. Em certas regiões da peça principal, foram percebidas duas colunas longitudinais em proximidade com a região ocupada pelas fibras densas. Circundando este conjunto, foi facilmente percebida a presença da bainha fibrosa, formada por costelas concêntricas. O conjunto todo é protegido externamente por uma membrana plasmática (Figura 17).

Figura 17 – Peça principal do espermatozoide de *L. chrysomelas*, cortes transversal (A) e longitudinal (B)

Foto: acervo particular

ax = axonema; fd = fibras densas; bf = bainha fibrosa composta por suas costelas concêntricas; cl = colunas longitudinais evidentes apenas em certos segmentos da peça principal; mp = membrana plasmática; PT = peça terminal característica, formada apenas pelo axonema e membrana plasmática

Aumento: 22000 X (A) e 11000 X (B)

A peça terminal é a continuação natural da peça principal, não tendo nenhuma demarcação evidente na transição. Foi facilmente identificada por possuir apenas o axonema central 9+2 envolto por membrana plasmática.

O aspecto geral dos espermatozoides da fração líquida do sêmen de *L. chrysomelas* pode ser comparado com o aspecto dos espermatozoides provenientes do coágulo nas figuras 18 e 19. No coágulo, foram encontradas células semelhantes àsquelas da fração líquida, em cortes longitudinais e transversais em um mesmo plano, porém em menor concentração que na fração líquida, e dispersas em uma matriz não muito densa.

Figura 18 – Visão geral dos espermatozoides de *L. chrysomelas* provenientes da fração líquida do sêmen

Foto: acervo particular

Aumento: 3500 X

Figura 19 – Visão geral dos espermatozoides de *L. chrysomelas* provenientes do coágulo do sêmen

Foto: acervo particular

Aumento: 3500 X

5.5.2 *A. caraya*

As imagens exibidas para *A. caraya* foram obtidas no microscópio de transmissão do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres FMVZ-USP.

Os espermatozoides de *A. caraya* apresentaram cabeça com extremidade afilada, colo suavemente estreito, peça intermediária com frequente presença de abundante citoplasma residual e ânulo pronunciado (Figura 20).

Figura 20 – Visão geral do espermatozoide de *A. caraya*, corte longitudinal

Foto: acervo particular

Ca = cabeça; Co = colo; PI = peça intermediária; An = ânulo; PP = peça principal

Aumento: 5600 X

A cabeça do espermatozoide apresentou uma média de 20,4 μm de comprimento por 7,9 μm de largura. Apresenta aspecto característico, com um núcleo grande e evidente que apresenta quantidade variável de vacuolos, e quantidade mínima de citoplasma. O núcleo se encontra recoberto pelo acrossomo, que ocupa de dois terços a três quartos da porção anterior da cabeça. O acrossomo apresentou largura média de 0,2 μm (Figura 21).

Figura 21 – Cabeça do espermatozoide de *A. caraya*, corte longitudinal

Foto: acervo particular

nu = núcleo; ac = acrossomo

Aumento: 18000 X

O colo do espermatozoide de *A. caraya* apresenta os componentes característicos desta região, sendo possível, nesta espécie, a identificação de dois centríolos: o centríolo proximal (orientado transversalmente à célula) e o centríolo distal (orientado longitudinalmente, dando origem ao axonema), assim como as colunas segmentadas características da região (Figura 22).

Figura 22 – Colo e peça intermediária do espermatozoide de *A. caraya*, corte longitudinal

Foto: acervo particular

Ca = cabeça; Co = colo; cp = centríolo proximal; cd = centríolo distal; PI = peça intermediária; ax = axonema; fd = fibras densas; mi = mitocôndrias da bainha mitocondrial helicoidal; mp = membrana plasmática

Aumento: 14000 X

A peça intermediária apresentou comprimento médio de 19,2 µm por 6,5 µm de largura e possui aspecto característico, exibindo axonema microtubular 9+2 central envolto por nove fibras densas. Todo o conjunto é envolvido pela bainha mitocondrial helicoidal e, por fim, pela membrana plasmática (Figuras 22 e 23). Grande quantidade de citoplasma residual foi encontrado em boa parte das células analisadas.

Figura 23 – Peças intermediárias de espermatozoides de *A. caraya*, cortes transversais

Foto: acervo particular

ax = axonemas com boa definição; fd = fibras densas com boa definição; mi = mitocôndrias da bainha mitocondrial helicoidal; mp = membrana plasmática

Aumento: 14000 X

A peça principal do espermatozoide de *A. caraya* apresentou média de 2,4 μm de diâmetro. Possui aspecto característico, formada pelo axonema microtubular 9+2 central e pelas fibras densas originadas na peça intermediária, que nesta região se apresentam em número de sete. As colunas longitudinais que ocupam certas regiões da peça principal, em proximidade com as fibras densas, são de difícil individualização nesta espécie. Circundando as fibras densas, foi facilmente percebida a presença da bainha fibrosa com suas costelas concêntricas, assim como a membrana plasmática externamente (Figura 24).

A peça terminal também apresentou aspecto característico, sendo facilmente identificada por possuir apenas o axonema central 9+2 envolto por membrana plasmática.

Figura 24 – Peça principal do espermatozoide de *A. caraya*, cortes longitudinal (A) e transversais (B e C)

Foto: acervo particular

ax = axonema (os característicos nove pares de microtúbulos envolvendo os dois microtúbulos centrais estão evidentes no corte transversal B); fd = fibras densas (as sete fibras densas características da peça principal são percebidas no corte transversal C); bf = bainha fibrosa; cc = costelas concêntricas da bainha fibrosa; mp = membrana plasmática

Aumento: 44000 X (A), 71000 X (B) e 36000 X (C)

O aspecto geral dos espermatozoides de *A. caraya* pode ser observado na figura 25. Considerando a ausência de coágulo seminal em ambas as amostras colhidas para a espécie, a imagem visualizada aqui exhibe espermatozoides oriundos, exclusivamente, da fração líquida.

Figura 25 – Visão geral dos espermatozoides de *A. caraya*

Foto: acervo particular

Aumento de 4000 X

5.5.3 *A.g. clamitans*

As imagens exibidas para *A.g. clamitans* foram obtidas no microscópio de transmissão do Setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB. O equipamento apresentava avaria na calibração das barras para medição das células, motivo pelo qual as barras foram ocultadas nas fotos aqui apresentadas. As mensurações dos espermatozoides de *A.g. clamitans* aqui apresentadas são oriundas do microscópio de transmissão do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres FMVZ-USP, já utilizado para as demais espécies relatadas neste trabalho, e que proporcionou fotos de qualidade para mensuração, mas não para a análise morfológica detalhada aqui exibida.

Os espermatozoides de *A.g. clamitans* apresentaram cabeça com extremidade afilada, colo suavemente estreito, peça intermediária com frequente presença de abundante citoplasma residual e ânulo pronunciado (Figura 26).

Figura 26 – Visão geral do espermatozoide de *A.g. clamitans*, corte longitudinal

Foto: acervo particular

Ca = cabeça; Co = colo; PI = peça intermediária; An = ânulo; PP = peça principal

Aumento: 4000 X

A cabeça do espermatozoide apresentou média de 21,4 μm de comprimento por 7,7 μm de largura. Possui aspecto característico, exibindo núcleo grande e evidente com quantidade variável de vacuolos, e quantidade mínima de citoplasma. O núcleo se encontra recoberto pelo acrossomo, que ocupa de dois terços a três quartos da porção anterior da cabeça. O acrossomo apresentou largura média de 0,2 μm (Figura 27).

Figura 27 – Cabeça do espermatozoide de *A.g. clamitans*, corte longitudinal

Foto: acervo particular

nu = núcleo; ac = acrossomo

Aumento: 15000 X

O colo do espermatozoide de *A.g. clamitans* apresenta os componentes característicos, sendo possível a identificação do centríolo proximal (orientado transversalmente à célula) e do centríolo distal (orientado longitudinalmente), bem como das colunas segmentadas (Figura 28).

A peça intermediária apresentou comprimento médio de 12,5 μm por 6,9 μm de largura e possui aspecto característico, com axonema microtubular 9+2 central envolto pelas nove fibras densas. Todo o conjunto é circundado pela bainha mitocondrial helicoidal e, por fim, pela membrana plasmática (Figura 28). Grande quantidade de citoplasma residual foi encontrado em boa parte das células analisadas.

Figura 28 – Colo e peça intermediária do espermatozoide de *A.g. clamitans*, cortes longitudinal (A) e transversal (B)

Foto: acervo particular

Ca = cabeça; Co = colo; cp = centríolo proximal; cd = centríolo distal; PI = peça intermediária; ax = axonema; fd = fibras densas; mi = mitocôndrias da bainha mitocondrial helicoidal; mp = membrana plasmática

Aumento: 20000 X (A) e 12000 X (B)

O ânulo representa a região de transição entre a peça intermediária e a peça principal da cauda do espermatozoide. Quando analisado em corte transversal, exibiu uma interessante combinação de elementos característicos destas duas porções da cauda: o axonema microtubular 9+2 central circundado pelas nove fibras densas características da peça intermediária (as fibras ainda não sofreram redução para as sete, típicas da peça principal), a bainha fibrosa característica da peça principal envolvida parcialmente pela bainha mitocondrial helicoidal da peça intermediária, e o envoltório final de membrana plasmática (Figura 29).

Figura 29 – Ânulo do espermatozoide de *A.g. clamitans* em corte transversal, combinando elementos característicos das peças intermediária e principal

Foto: acervo particular

ax = axonema; fd = nove fibras densas características da peça intermediária; bf = bainha fibrosa característica da peça principal; mi = mitocôndrias da bainha mitocondrial helicoidal característica da peça intermediária, envolvendo parcialmente o axonema; mp = membrana plasmática

Aumento: 20000 X

A peça principal do espermatozoide de *A.g. clamitans* apresentou média de 2,9 μm de diâmetro. Possui aspecto característico, exibindo axonema microtubular 9+2 central e as sete fibras densas que se continuam da peça intermediária. As colunas longitudinais que ocupam certas regiões da peça principal, em proximidade com as fibras densas, são facilmente visualizadas. Circundando as fibras densas, foi facilmente percebida a presença da bainha fibrosa com suas costelas concêntricas, assim como a membrana plasmática externamente (Figura 30).

A peça terminal apresentou aspecto característico, sendo identificada por seu axonema central 9+2 envolto exclusivamente por membrana plasmática.

Figura 30 – Peça principal do espermatozoide de *A.g. clamitans*, cortes longitudinal (A) e transversais (B e C)

Foto: acervo particular

ax = axonema; fd = fibras densas (as sete fibras densas características da peça principal são percebidas no corte transversal B); cl = colunas longitudinais (evidentes apenas em certos segmentos da peça principal, visíveis no corte transversal C); bf = bainha fibrosa com suas costelas concêntricas; mp = membrana plasmática

Aumento: 15000 X (A) e 30000 X (B e C)

A figura 31 exibe o aspecto geral dos espermatozoides de *A.g. clamitans*. Considerando a ausência de coágulo seminal em ambas as amostras colhidas desta espécie, a imagem visualizada aqui exibe espermatozoides oriundos da fração líquida, exclusivamente.

Figura 31 – Visão geral dos espermatozoides de *A.g.clamitans*

Foto: acervo particular

Aumento de 3000 X

5.6 COMPARAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DOS ESPERMATOZOIDES DE *L. CHRYSOMELAS*, *A. CARAYA* E *A.G. CLAMITANS*.

Após a análise detalhada dos aspectos da ultraestrutura dos espermatozoides de *L. chrysomelas*, *A. caraya* e *A.g. clamitans*, foi possível perceber que todos apresentaram os componentes característicos já descritos para espermatozoides humanos e de demais primatas não humanos, sejam eles do velho ou do novo mundo: uma cabeça contendo o núcleo recoberto pelo acrossomo, um colo fazendo a transição entre a cabeça e a cauda da célula, caracterizado pela presença do centríolo proximal, e uma cauda formada por três porções características e ultraestruturalmente distintas: a peça intermediária com suas nove fibras densas e mitocôndrias dispostas em arranjo helicoidal, a peça principal com suas sete fibras densas e envolta por sua bainha fibrosa, e a peça terminal contendo apenas o axonema envolto por membrana plasmática.

Embora as espécies apresentem os mesmo componentes característicos, foi possível perceber que *L. chrysomelas* apresentaram espermatozoides com cabeça proporcionalmente delgada em relação ao comprimento, enquanto *A. caraya* e *A.g. clamitans* exibiram maior largura na região próxima ao colo, com extremidade anterior afilada. O acrossomo de *L. chrysomelas* tendeu a ocupar de metade a dois terços da extremidade anterior da cabeça do espermatozoide, enquanto os acrossomos de *A. caraya* e *A.g. clamitans* se distribuíram ocupando de dois terços a três quartos da extremidade anterior da cabeça.

As peças intermediárias de *L. chrysomelas* apresentaram grande comprimento em relação à largura. Peças intermediárias de *A. caraya* e *A.g. clamitans* apresentaram largura semelhante, embora as de *A. caraya* possuíssem comprimento maior que as de *A.g. clamitans*. Para ambos os *Alouatta*, foi constatada presença de abundante citoplasma residual na peça intermediária de grande parte das células analisadas, fato não percebido em *L. chrysomelas*.

Devido à menor largura de sua peça intermediária, *L. chrysomelas* apresentaram o ânulo (transição da peça intermediária para a peça principal) bastante discreto, ao passo que o ânulo dos *Alouatta*, que possuem peças intermediárias mais largas, exibiu uma transição bastante abrupta para a peça principal.

As peças principais não exibiram grandes diferenças entre as espécies, embora tenha sido notado que *A.g. clamitans* apresentou maior espessura desta região, especialmente quando comparado com *L. chrysomelas*. As colunas longitudinais que podem ser percebidas em certos trechos da peça principal foram facilmente identificadas em *A.g. clamitans* e *L. chrysomelas*, mas se apresentaram com pouca distinção em *A. caraya*.

A análise estatística das mensurações dos espermatozoides das três espécies pelo teste de Tukey evidenciou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o comprimento da peça intermediária de *L. chrysomelas*, *A. caraya* e *A.g. clamitans*, entre a largura da peça intermediária de *L. chrysomelas* em relação aos *Alouatta*, e entre a largura da peça principal de *L. chrysomelas* e *A.g. clamitans*.

Os resultados completos da comparação das mensurações dos espermatozoides das três espécies estão exibidos na tabela 4. Não foi possível

obter a medida de comprimento da peça principal para nenhuma das espécies por não ter sido visualizada nenhuma célula que apresentasse a totalidade da região em corte longitudinal.

Tabela 4 – Valores (média $\pm$ desvio padrão) da mensuração dos espermatozoides de *L. chrysomelas*, *A. caraya* e *A.g. clamitans* comparados pelo teste de Tukey

	<i>L. chrysomelas</i>	<i>A. caraya</i>	<i>A.g. clamitans</i>
Comp. cab. (μm)	23,19 $\pm$ 2,53 ^a	20,39 $\pm$ 2,03 ^a	21,36 $\pm$ 1,16 ^a
Larg. cab. (μm)	6,49 $\pm$ 2,95 ^a	7,89 $\pm$ 1,6 ^a	7,75 $\pm$ 0,54 ^a
Larg. acros. (μm)	0,23 $\pm$ 0,08 ^a	0,22 $\pm$ 0,04 ^a	0,22 $\pm$ 0 ^a
Comp. P.I. (μm)	29,58 $\pm$ 0,59 ^a	19,16 $\pm$ 2,59 ^b	12,5 $\pm$ 1,52 ^c
Larg. P.I. (μm)	4,49 $\pm$ 0,28 ^a	6,55 $\pm$ 0,43 ^b	6,87 $\pm$ 0,71 ^b
Larg. P.P (μm)	2,06 $\pm$ 0,19 ^a	2,43 $\pm$ 0,53 ^{a,b}	2,86 $\pm$ 0,39 ^b

Comp. cab. = comprimento da cabeça; Larg. cab. = largura da cabeça; Larg. acros. = largura do acrossomo; Comp. P.I. = comprimento da peça intermediária; Larg. P.I. = largura da peça intermediária; Larg. P.P. = largura da peça principal.

^{a,b} ou ^c = Letras diferentes indicam presença de diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os parâmetros.

6 DISCUSSÃO

Tendo em vista que os objetivos deste trabalho foram a adaptação do método de preparo do sêmen de *L. chrysomelas*, *A. caraya* e *A.g. clamitans* para microscopia eletrônica de transmissão com posterior descrição e comparação da ultraestrutura dos espermatozoides destas espécies, foi possível trabalhar com um número bastante restrito de animais (dois machos por espécie), uma vez que a unidade experimental considerada é representada por cada espermatozoide presente no ejaculado.

Desta forma, embora o “n” considerado seja adequado e suficiente na busca pelos objetivos propostos, a comparação entre as características seminais das espécies aqui estudadas fica com seu valor bastante limitado em função do pequeno número de animais participantes do estudo. Ainda assim, o confronto dos dados decorrentes desta pesquisa com aqueles já descritos na literatura é importante para ressaltar a qualidade do sêmen obtido neste trabalho.

Os métodos de colheita de sêmen escolhidos tiveram respaldo em descrições prévias disponíveis na literatura, tendo sido escolhida a vibroestimulação peniana para *L. chrysomelas*, após relatos de obtenção de sêmen de maior qualidade em um calitriquídeo, *Callithrix jacchus* (SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004; VALLE, 2007; ARAKAKI, 2013), e a eletroejaculação por via retal para os Alouatta, conforme relatos de sucesso em *A. caraya* por Moreland et al. (2001), Valle et al. (2004) e Carvalho (2012). Embora não exista na literatura referência à colheita prévia de sêmen de *A.g. clamitans*, foi utilizado aqui o protocolo já descrito e comprovado para *A. caraya*, espécie com a qual compartilha o gênero Alouatta, bem como as características reprodutivas (AURICCHIO, 1995) e a média de peso corporal (RUMIZ, 1990; AURICCHIO, 1995), o que permitiu a utilização adequada do equipamento de eletroejaculação previamente descrito, com sucesso na obtenção dos ejaculados.

A taxa de sucesso da vibroestimulação peniana para obtenção de ejaculados de *L. chrysomelas* foi de 100%, enquanto a eletroejaculação por via retal apresentou taxa de sucesso de 80% para *A. caraya*, e de 66,7% para *A.g. clamitans*. Das tentativas de colheita realizadas, duas não resultaram em ejaculação: uma no *A.*

caraya Ac2 e uma no *A.g. clamitans* Agc1. Ainda assim, estes dados devem ser considerados com cautela, devido ao pequeno número de animais analisados, e a fatores pontuais inerentes ao equipamento eletroejaculador utilizado: ficou evidente após a realização destes procedimentos sem sucesso que o equipamento apresentava avaria, após uma troca mal-sucedida de bateria que resultou em liberação de voltagem severamente menor que a indicada pelo aparelho. O dano ao equipamento foi constatado devido à ausência de contração dos membros pélvicos dos animais, involuntária e característica, durante os momentos de estimulação elétrica. Após correção da falha técnica, as colheitas voltaram a apresentar o sucesso esperado.

A repetição de colheitas observada no *A. caraya* Ac1 foi devida à necessidade de padronização da técnica de fixação do sêmen para microscopia eletrônica de transmissão, que foi conseguida na terceira colheita realizada no indivíduo, visto não ter sido encontrada na literatura qualquer alusão à realização de microscopia eletrônica de transmissão em sêmen de primatas neotropicais, embora estejam disponíveis descrições bastante consistentes em humanos (PEDERSEN, 1969) e primatas do velho mundo (PEDERSEN, 1972), ricas comparações entre espécies, incluindo mamíferos e insetos (FAWCETT, 1970), além da tecnologia empregada no diagnóstico de alterações espermáticas em humanos (REICHART et al., 2000; BACCETTI et al., 2004; SKOWRONEK et al., 2010; CURTI et al., 2014), ou no estudo da fisiologia do movimento da cauda de espermatozoides bovinos em diferentes estados de motilidade (LESICH et al., 2014).

Os demais protocolos utilizados para este trabalho já se encontravam convenientemente descritos para primatas neotropicais, como as colheitas de sêmen por vibroestimulação peniana e eletroejaculação acima relatadas, a utilização de BWW como diluidor de sêmen para *L. chrysomelas* (SANTOS et al., 2014), o uso de Ringer-Lactato como diluidor de sêmen para *A. caraya* (VALLE et al., 2004; CARVALHO, 2012), agora também utilizado com sucesso em *A.g. clamitans* neste estudo, bem como as análises do sêmen fresco e avaliação morfológica em microscopia de luz (VALLE, 2007; VIDAL et al., 2007; CARVALHO, 2012; ARAKAKI, 2013).

O sêmen de *L. chrysomelas* apresentou coagulação, em coincidência com o já descrito para a espécie por Vidal et al. (2007). Três dos animais utilizados neste

estudo (Lc1, Lc2 e Lc3) apresentaram pequena fração líquida e um coágulo consistente que não se dissolveu após a adição de BWV. A presença do coágulo representou um entrave à realização da microscopia eletrônica, uma vez que reduziu severamente a concentração de espermatozoides disponíveis na fração líquida; para compensar tal fato, foi necessária a confecção de um *pool* dos ejaculados destes três animais, para que a amostra resultante apresentasse concentração de espermatozoides suficiente para a realização do preparo para microscopia eletrônica (superior a 10.000.000 de espermatozoides/mL). A análise do coágulo seminal sob microscopia eletrônica de transmissão evidenciou grande quantidade de espermatozoides represados nesta porção do sêmen. O sêmen do último *L. chrysomelas* (Lc4) apresentou um coágulo de menores proporções, que se dissolveu completamente após a adição de BWV ao ejaculado, e apresentou concentração espermática suficiente para realização da microscopia eletrônica, reforçando o fato de que muitos espermatozoides permanecem represados no coágulo seminal e este, quando desfeito, melhora a qualidade do sêmen, conforme sugerido por Valle et al. (2004).

A. caraya e *A.g. clamitans* não apresentaram coágulo seminal, em concordância com as descrições de Moreland et al. (2001) e Valle et al. (2004) para *A. caraya*, e corroborando a sugestão destes últimos de que a ausência de coagulação possa ser uma característica do gênero *Alouatta*.

A análise do sêmen fresco de *A. caraya* evidenciou pH semelhante ao descrito por Valle et al. (2004), embora ligeiramente mais alcalino em relação ao descrito por Carvalho (2012) e com maior acidez que o descrito por Moreland et al. (2001). Uma possível explicação para tais diferenças é a contribuição que cada glândula acessória possui na porcentagem final do plasma seminal, visto que as vesículas seminais apresentam secreção com pH mais alcalino, enquanto a próstata libera secreção de pH mais ácido (WHO, 2010). O tamanho, bem como o posicionamento da probe durante a realização da eletroejaculação, pode estimular a produção de secreção de determinada glândula acessória em proporção maior que das demais. Não foram encontrados na literatura dados que permitam a comparação do pH seminal de *L. chrysomelas* ou *A.g. clamitans* com os dados do presente estudo.

A concentração de espermatozoides no sêmen de *A. caraya* encontra-se dentro dos limites descritos na literatura para a espécie, embora a amostra proveniente do animal Ac2 apresente concentração consideravelmente maior que a média descrita nos demais estudos (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO, 2012). O animal Ac2 apresentou contrações testiculares rítmicas e ejaculação espontânea após o procedimento de limpeza testicular, e o sêmen resultante exibiu concentração elevada de espermatozoides, bem como coloração leitosa, em comparação com o esbranquiçado suave dos demais ejaculados observados. Conforme evidenciado por Valle (2007), a técnica de colheita de sêmen utilizada pode interferir na qualidade do sêmen obtido, especialmente em relação ao volume e motilidade. Esta observação pode ser uma justificativa ao fato do sêmen proveniente de uma ejaculação natural apresentar concentração de espermatozoides e, conseqüentemente, qualidade seminal muito superior àquela observada na amostra obtida por eletroejaculação (animal Ac1). Não foram encontrados na literatura dados que permitam a comparação da concentração de espermatozoides do sêmen de *L. chrysomelas* ou *A.g. clamitans* com os dados do presente estudo.

O volume dos ejaculados de *A. caraya* encontra-se dentro dos padrões anteriormente descritos para a espécie (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO, 2012). A aferição do volume do ejaculado de *L. chrysomelas* foi impedida devido à presença do coágulo seminal, que reduz severamente a fração líquida mensurável do sêmen. Esta dificuldade já foi relatada por Arakaki (2013) com o uso de pipetas automáticas, sendo reforçada pela observação de Matson et al. (2010) que a viscosidade da amostra prejudica a obtenção de amostras precisas após a pipetagem. Uma alternativa a este entrave foi proposta por Vidal et al. (2007), que utilizaram micropipetas para a aferição do volume da fração líquida do ejaculado de *L. chrysomelas*, obtendo valor médio de 11,9 μ L, embora para isso tenham destinado parte das amostras de seu estudo exclusivamente para este fim. Não foram encontrados dados na literatura que possam ser comparados aos dados de *A.g. clamitans*.

Os valores de motilidade espermática total para *A. caraya* são semelhantes aos descritos previamente na literatura (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO, 2012), e os valores de motilidade progressiva só puderam ser

comparados aos descritos por Carvalho (2012), com os quais apresentaram semelhança, pois os demais estudos envolvendo a espécie utilizam uma escala diferente de avaliação, que impede a comparação dos resultados. Valle (2007) destaca que a motilidade progressiva é uma característica que apresenta correlação positiva com diversas outras desejáveis ao sêmen, como motilidade total e concentração, considerando-a assim como uma boa variável para a avaliação da qualidade seminal. Não se encontram disponíveis na literatura dados referentes à motilidade total e progressiva de *L. chrysomelas* e *A.g. clamitans*.

As colorações destinadas à análise da integridade de membrana plasmática e membrana acrossomal exibiram, para *A. caraya*, resultados condizentes com os anteriormente apresentados na literatura por Valle et al. (2004) e Carvalho (2012) para integridade de membrana plasmática, e por Carvalho (2012), único relato encontrado de realização de avaliação de integridade de membrana acrossomal na espécie. Embora a coloração com eosina-nigrosina, para avaliação de integridade de membrana plasmática, já tenha sido validada por Santos et al. (2014) para utilização em *L. chrysomelas*, os autores não exibem os valores obtidos característicos da espécie, não havendo assim dados disponíveis na literatura para comparação das colorações de membrana plasmática e acrossomo para a espécie, nem para *A.g. clamitans*.

A análise da morfologia espermática sob microscopia de luz evidenciou maior porcentagem de defeitos totais (média de 60%) relatados nos *A. caraya* do presente estudo, contra 37,5% relatados por Moreland et al. (2010) e 21,3% descritos por Valle et al. (2004). De maneira semelhante, os defeitos totais observados nos *L. chrysomelas* deste estudo também apresentaram média (66,5%) maior que o relato de Vidal et al. (2007) para a espécie, com média de 32,71% de defeitos totais.

Especialmente para *A. caraya*, espécie na qual todos os parâmetros da análise do sêmen fresco puderam ser comparados com dados similares já publicados, apresentando coincidência, fica evidente certa inconsistência nos resultados da análise morfológica dos espermatozoides. Ficou claro que no presente estudo as caudas dobradas representam o defeito de maior ocorrência, com média de 32,5% em *A. caraya* e de 34,5% em *L. chrysomelas*, defeito este que não é relatado em nenhum dos demais estudos reprodutivos envolvendo as espécies. Desta forma, conforme sugerido por Arakaki (2013) após observação semelhante no

sêmen de *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*, é plausível que este defeito seja adquirido durante o processamento do sêmen, por choque térmico, e não durante a espermatogênese e posterior caminho do espermatozoide no trato reprodutivo do macho. Aceitando-se esta hipótese, e desconsiderando este defeito da soma de defeitos totais, os valores obtidos no presente estudo se apresentariam perfeitamente condizentes com os relatados na literatura para *A. caraya* e *L. chrysomelas*. Não foram encontrados na literatura dados de morfologia espermática para *A.g. clamitans*, para comparação com os dados deste estudo.

Considerando a uniformidade dos dados provenientes da análise do sêmen fresco de *A. caraya* com os demais estudos publicados para a espécie, é coerente afirmar que a metodologia de colheita e processamento do sêmen empregada no presente estudo foi capaz de gerar amostras de qualidade para a utilização como modelo para a descrição da ultraestrutura do espermatozoide desta espécie.

O reduzido número de dados disponíveis na literatura para comparação com *L. chrysomelas*, e a ausência total destes para comparação com *A.g. clamitans*, impede uma análise mais detalhada da qualidade do sêmen aqui obtido para estas espécies. Ainda assim, a realização de metodologia padronizada para as três espécies deste trabalho para colheita (exceto de *L. chrysomelas*, que teve o sêmen obtido por vibroestimulação peniana, ao invés de eletroejaculação por via retal) e processamento do sêmen permite extrapolar que a qualidade das amostras de *A.g. clamitans* e *L. chrysomelas* também é satisfatória para a utilização como modelo para microscopia eletrônica de transmissão. No caso particular de *L. chrysomelas*, esperava-se previamente sêmen de melhor qualidade, conforme já evidenciado em comparações da técnica de vibroestimulação peniana com a técnica de eletroejaculação por via retal (SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004; VALLE, 2007; ARAKAKI, 2013).

Não foram encontradas na literatura descrições do preparo de amostras ou dos aspectos da ultraestrutura dos espermatozoides de primatas neotropicais sob microscopia eletrônica de transmissão. Assim, os resultados aqui apresentados constituem o primeiro relato destas informações, e servirão como parâmetro para futuros estudos morfológicos envolvendo a preparação e avaliação do sêmen destes primatas, bem como para estudos que utilizem dados morfológicos para o diagnóstico de alterações espermáticas, incluindo os danos adquiridos pós

descongelamento, fator este relevante quando da utilização de biotecnologias em prol da preservação das espécies.

Embora não tenham sido encontradas na literatura descrições da utilização de microscopia eletrônica de transmissão em espermatozoide de primatas neotropicais, a técnica vem sendo amplamente empregada na espécie humana e em outros mamíferos, revelando, segundo Pedersen (1969), grande similaridade entre os espermatozoides estudados, porém com presença de diferenças pontuais que servem para caracterização e distinção dos espermatozoides provenientes de cada espécie. Fica evidente, assim, a importância do conhecimento da particular ultraestrutura do espermatozoide de cada espécie animal, de modo a permitir a utilização futura e sinérgica destes dados em prol do desenvolvimento das biotecnologias aplicadas à reprodução.

Ainda assim, descrições morfológicas da ultraestrutura espermática foram abundantes nos idos de 1970/80 (PEDERSEN, 1969; FAWCETT, 1970; MARTIN; GOULD; WARNER, 1975; GOULD, 1980), mas deixaram de ser foco de publicações recentes. Para as espécies humana e bovina, onde já se encontram disponíveis dados consistentes da ultraestrutura básica do espermatozoide, tem sido possível a utilização da microscopia eletrônica de transmissão no auxílio ao diagnóstico de infertilidade ou subfertilidade, bem como na proposta de novos modelos que ampliem o conhecimento acerca da fisiologia celular do espermatozoide (REICHART et al., 2000; BACCETTI et al., 2004; SKOWRONEK et al., 2010; CURTI et al., 2014; LESICH et al., 2014). Para os primatas do novo mundo é necessária, em primeiro lugar, a geração de dados básicos de ultraestrutura, antes de se pensar na aplicação da microscopia eletrônica como auxílio à reprodução das espécies.

A carência de dados no tocante à ultraestrutura de espermatozoides de primatas do novo mundo pode ser devida à dificuldade na preservação destas células durante o processamento das amostras para microscopia, bem como em função da grande variabilidade morfológica apresentada por espermatozoides normais, o que torna complexo o estabelecimento de um limite claro entre as morfologia normal e a morfologia celular alterada, que possa levar à alteração da capacidade de fecundação. Pedersen (1969) ressalta que, mesmo em um ejaculado normal, estão presentes espermatozoides severamente pleomórficos, além de espermatozoides mortos, imóveis e imaturos. Estas diferenças são projetadas em

larga escala quando se avalia o sêmen sob microscopia eletrônica de transmissão, onde se tem acesso exclusivamente a finíssimos cortes (na projeção de nanômetros) que permitem a comparação apenas entre as células ali contidas, uma amostra de pequenas proporções em comparação com o sêmen total liberado durante a ejaculação. Dados concretos e válidos acerca da morfologia celular, no que concerne à associação dos aspectos da ultraestrutura aplicados à avaliação da fertilidade, só serão obtidos após a realização de múltiplas pesquisas e utilização de diferentes técnicas.

Para o sucesso da preparação de amostras de sêmen para microscopia eletrônica de transmissão, é fundamental a diluição inicial do ejaculado, o que evita que proteínas coaguladas obscureçam a morfologia celular que se deseja avaliar (PEDERSEN, 1969). Especialmente no que se refere ao ejaculado de primatas do novo mundo, a diluição do sêmen também tem fundamental importância no aumento do volume da amostra, quantificado em poucos microlitros.

Um fator severamente limitante à qualidade da preparação de amostras para microscopia eletrônica de transmissão é o pH do agente de fixação inicial do sêmen. Neste estudo, foram preparadas duas amostras fixadas em glutaraldeído 2% sem pH controlado, resultando em células fragmentadas e amostras sem valor para definição da morfologia celular normal. A utilização de glutaraldeído 2% tamponado com pH 7,2 permitiu a fixação de amostras de qualidade. Valores de pH semelhantes são citados por Pedersen (1969) (7,3 – 7,5), Baskett e Rowarth Jr. (1975) (7,2), Skowronek et al. (2010) (7,2 – 7,4) e Lesich et al. (2014) (7,2). Para este estudo, preparações de glutaraldeído 2% mantiveram o pH previsto por um período não superior a sete dias, sob refrigeração até o momento da adição ao sêmen.

Outro fator limitante à qualidade das amostras para microscopia eletrônica de transmissão é a concentração de espermatozoides/mL de ejaculado. Foram encontrados na literatura valores de corte de 150 milhões de sptz/mL (PEDERSEN, 1969) e 20 milhões de sptz/mL (CURTI et al., 2014). Neste estudo, a amostra que apresentou menor concentração de espermatozoides veio do animal Agc1 (65 milhões de sptz/mL), e permitiu correta realização da técnica, embora com maior dificuldade para obtenção de *pellet* que permitisse o processamento bem sucedido para a microscopia.

Alterações de temperatura do sêmen já fixado em glutaraldeído não prejudicaram a obtenção de espermatozoides de qualidade, em acordo com as observações de Pedersen (1969).

A observação da ultraestrutura da cabeça do espermatozoide revelou um núcleo grande e evidente, com cromatina de aspecto granular e presença de pequenos vacúolos. Segundo Pedersen (1969), a granularidade da cromatina em espermatozoides humanos pode ser uma expressão da progressiva maturidade celular, não representando condição patológica. Ainda segundo o autor, os vacúolos encontrados no núcleo não são considerados indícios de condição degenerativa, e diferem dos demais vacúolos celulares por não apresentarem delimitação de membrana, sugerindo a simples formação de defeitos localizados decorrentes do processo de condensação da cromatina (FAWCETT, 1970). Ainda assim, vacúolos nucleares devem ser avaliados com cautela, pois sua presença em grandes proporções e extensão é indicativa de dano ao DNA. Tal fato é particularmente importante quando associado a vacúolos que ocupem área nuclear superior a 50% (FRANCO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

O acrossomo constitui uma vesícula que contém enzimas importantes à penetração da zona pelúcida, determinante para o processo de fecundação do oócito (GARNER; HAFEZ, 2004; SAMUELSON, 2007; WROBEL; BERGMANN, 2012). Sob microscopia eletrônica de transmissão, possui a extremidade anterior mais espessa que o segmento de posição intermediária, conhecido por região equatorial. A porção anterior permite um processo de vesiculação para liberação das enzimas acrossomais durante a fecundação (PEDERSEN, 1969), que pôde ser constatado em certas células dos primatas aqui observados.

Neste estudo, foram observadas diferenças morfológicas entre as cabeças de *L. chrysomelas* em relação às duas espécies de *Alouatta*, sendo ela estreita e com afilamento anterior menos pronunciado no primeiro, e mais larga apresentando abrupto estreitamento anterior nos últimos. Embora não tenham sido constatadas diferenças significativas de comprimento e largura da cabeça dos espermatozoides das três espécies, sua morfologia característica permite o reconhecimento da espécie por parte do observador. O acrossomo, que ocupa a extremidade anterior da cabeça, apresentou espessura semelhante em todas as espécies, embora possua menor extensão em *L. chrysomelas* (metade a dois terços da extremidade

anterior) que nos *Alouatta* (dois terços a três quartos da extremidade anterior). Pedersen (1969) relata para o espermatozoide humano extensão semelhante à dos *Alouatta*.

A região do colo caracteriza a transição da cabeça à cauda do espermatozoide, sendo estas duas porções ancoradas pela fossa de implantação, uma concavidade observada no aspecto mais caudal do núcleo (PEDERSEN, 1969; FAWCETT, 1970) e facilmente perceptível nos espermatozoides aqui estudados. Não foram percebidas, contudo, diferenças marcantes nesta região entre as três espécies aqui estudadas.

Ainda na região do colo, é característica a presença de um ou dois centríolos (centríolos proximal e distal), que apresentam o aspecto típico descrito para a estrutura: nove tercetos de microtúbulos dispostos em arranjo cilíndrico (PEDERSEN, 1969). Fawcett (1970) relata a presença dos dois centríolos apenas em espermatozoides imaturos de mamíferos, com a transformação do centríolo distal no axonema do espermatozoide maduro. Bakst e Howarth Jr. (1975) evidenciam a presença do centríolo distal em espermatozoides maduros de galos, em concordância com estudos prévios na espécie (NAGANO, 1962; LAKE; SMITH; YOUNG, 1968) e em cobras (AUSTIN, 1965; HAMILTON; FAWCETT, 1968).

O último componente característico da região do colo é uma sequência de colunas segmentadas organizadas em arranjo transversal, que se sobrepõem parcialmente à região ocupada pelos centríolos. Em seu trabalho com galos, Baskt e Howarth Jr. (1975) propõem que tais estrias apenas são observadas no colo das espécies que perdem o centríolo distal durante a maturação do espermatozoide (mamíferos), estando ausentes nas espécies que mantêm o centríolo distal no espermatozoide maduro (galos e cobras).

Neste estudo, não foi constatada a presença de centríolo distal em espermatozoides de *L. chrysomelas*, embora a estrutura esteja presente em certos espermatozoides dos *Alouatta*. Também foi constatada nas três espécies estudadas a presença das colunas segmentadas em sobreposição aos centríolos, o que leva a crer que não seria esperada a presença do centríolo distal em espermatozoides maduros. A aparente contradição decorrente da presença do centríolo distal em um espermatozoide de mamífero pode ser justificada pela liberação de células imaturas durante a ejaculação, fato que encontra amparo na observação da presença de

grande quantidade de citoplasma residual na peça intermediária dos espermatozoides de *Alouatta*, observação também característica de espermatozoides imaturos. Assim, é coerente supor que os ejaculados dos *Alouatta* exibiram mais espermatozoides imaturos que os ejaculados de *L. chrysomelas*.

Não fica claro, contudo, se a liberação de maior proporção de espermatozoides imaturos é uma característica do gênero *Alouatta*, ou se o fato se deve à condição de alojamento dos animais utilizados para este estudo. Coincidentemente, todos os *L. chrysomelas* participantes do trabalho ficavam alojados juntamente com fêmeas da espécie, enquanto os *Alouatta* permaneciam isolados, ou na companhia exclusiva de machos. Faz-se necessário estudo comparativo envolvendo maior número de animais representantes de cada espécie, sujeitos a diferentes condições de alojamento no tocante à formação de grupos sociais, para o esclarecimento desta questão.

A cauda do espermatozoide é nitidamente dividida em três regiões distintas, as peças intermediária, principal e terminal. Fawcett (1970) atribui o início da movimentação da cauda à região de peça intermediária, sendo a peça principal o segmento mais efetivo da locomoção. Tal movimentação só é possível devido à presença do axonema 9+2 central, envolto pelas fibras densas que acredita-se contribuir ainda mais com os movimentos da cauda.

A peça intermediária é facilmente delimitada à microscopia eletrônica de transmissão pela presença da bainha mitocondrial helicoidal, que permite a geração da energia necessária à movimentação da cauda. O arranjo helicoidal das mitocôndrias é importante para aumentar a flexibilidade da peça intermediária durante a movimentação da cauda (PEDERSEN, 1969). Conforme observado por Pedersen (1969) e Fawcett (1970), as mitocôndrias mais proximais avançam ligeiramente em direção ao colo do espermatozoide, fato também constatado nas espécies abordadas neste estudo. Certa desorganização das mitocôndrias humanas (PEDERSEN, 1969) pode ser comparada ao arranjo exibido pelos *Alouatta*, em contraposição a um arranjo muito mais regular observado em *L. chrysomelas*.

A correta contagem das mitocôndrias na peça intermediária não é possível devido ao seu arranjo helicoidal, embora seja possível contar o número de giros exibidos em cada corte longitudinal de peça intermediária. O maior número de giros reflete em consequente aumento de comprimento da peça intermediária. Fawcett

(1970) refere 10 a 12 giros em espermatozoides humanos e de touros, e 15 a 17 em cães. Neste estudo, também foram encontradas severas diferenças entre *L. chrysomelas* em relação aos *Alouatta*: 19 a 21 giros no primeiro, e cinco a sete nos últimos.

Acredita-se que o maior comprimento da peça intermediária esteja associado à maior capacidade de geração de energia pelos espermatozoides de certas espécies animais. A justificativa, contudo, não é clara. Fawcett (1970) sugere que condições impostas pelo trato reprodutivo da fêmea, que acarretem dificuldade de ascendência aos espermatozoides, sejam uma razão plausível. Neste estudo, foi constatada diferença significativa de comprimento de peça intermediária entre as três espécies observadas, com especial detalhe ao comprimento muito excecente aos demais apresentado pela peça intermediária de *L. chrysomelas*. Uma justificativa possível a esta observação é o comportamento reprodutivo poliândrico da espécie, onde vários machos podem acasalar com a mesma fêmea. Neste caso, maior reserva energética pode favorecer o espermatozoide na competição pelo oócito. Nos *Alouatta*, observa-se comportamento reprodutivo poligínico, de forma que cada macho acasala com mais de uma fêmea, mas a fêmea recebe um único macho. Coincidentemente, estas espécies apresentam peça intermediária (e consequentemente reserva energética) severamente menor.

Esta associação de peças intermediárias mais longas com a dificuldade sofrida pelo espermatozoide na busca pelo oócito também é constatada na comparação de espermatozoides de formas de vida mais primitivas (que apresentam fecundação externa) com espermatozoides de mamíferos (que possuem fecundação interna). Na fecundação interna, as barreiras a serem vencidas pelos espermatozoides são maiores, especialmente devido ao meio mais viscoso, o que reflete em peças intermediárias maiores nos espermatozoides de mamíferos (FAWCETT, 1970).

O ânulo representa a transição da peça intermediária à peça principal. Mais que um simples estreitamento, representa uma região com concentração de material eletrodenso apostado à membrana celular. Acredita-se que sua função seja impedir o deslocamento caudal das mitocôndrias durante os batimentos da cauda. Neste estudo, verificou-se que a concentração de material eletrodenso é mais evidente em espermatozoides de *L. chrysomelas* e *A. caraya* que nos de *A.g. clamitans*. Por outro lado, no que concerne à diferença de espessura entre as peças intermediária e

principal, que confere ao ânulo uma característica mais marcada, devido à transição abrupta, *L. chrysomelas* possui ânulo bastante discreto em comparação com os *Alouatta*, que o apresentam bastante marcado. Este fato se deve à largura significativamente menor da peça intermediária de *L. chrysomelas* em relação à dos *Alouatta*.

A peça principal é caracterizada pela presença do axonema central 9+2 envolto por fibras densas e, mais externamente, por uma bainha fibrosa. Esta bainha fibrosa é formada por costelas concêntricas semicirculares, que se fixam ao longo de duas colunas longitudinais ou, nas regiões em que esta não existe, nas próprias costelas contralaterais conferindo, nestes casos, maior espessura à região. As colunas longitudinais, quando presentes, ancoram-se às fibras densas para evitar deslocamento caudal durante os batimentos da cauda. O revestimento final de membrana plasmática apresenta certa frouxidão nos dois terços proximais da peça principal, favorecendo assim maior amplitude de movimento da cauda (PEDERSEN, 1969; FAWCETT, 1970).

Em seu estudo com espermatozoides humanos, Pedersen (1969) relata que as colunas longitudinais não são delimitadas com clareza nesta espécie, e parecem mais evidentes na porção proximal da peça principal. No presente estudo, colunas longitudinais foram percebidas com clareza nos espermatozoides de *L. chrysomelas* e *A.g. clamitans*, mas foram de difícil individualização em *A. caraya*. Particularmente nas espécies que exibem colunas longitudinais evidentes, foi nítida a percepção de que certos cortes de peça principal apresentam a estrutura, que se encontra ausente em outros cortes, corroborando o observado por Pedersen (1969) em espermatozoide humano, de que as colunas longitudinais não se estendem por todo o segmento da peça principal.

Os demais aspectos da peça principal das espécies abordadas neste estudo são muito semelhantes à descrição acima apresentada para a região, exceto pela diferença significativa de largura apresentada entre os espermatozoides de *L. chrysomelas* e *A.g. clamitans*. Esta diferença, contudo, pode representar um maior tamanho do espermatozoide de *A.g. clamitans* em relação ao de *L. chrysomelas*, especialmente pela constatação de largura maior de cabeça e largura significativamente maior da peça intermediária.

O comprimento total dos espermatozoides aqui estudados não pôde ser mensurado devido à ausência de cortes longitudinais que exibissem a célula em sua total extensão. Não fica claro, assim, se há diferença de tamanho total dos espermatozoides de *L. chrysomelas*, *A. caraya* e *A.g. clamitans*. A comparação das larguras dos espermatozoides apresentada acima sugere uma possível diferença de tamanho celular, mas é necessário outro tipo de preparação dos espermatozoides para que este dado possa ser comprovado. A microscopia eletrônica de transmissão, por apresentar células cortadas em planos finíssimos, dificilmente será capaz de exibir um corte longitudinal perfeito e total de um espermatozoide.

Um rico complemento à descrição da ultraestrutura do espermatozoide pode ser conseguido com a utilização sinérgica de microscopia eletrônica de varredura, que permite a mensuração total, bem como a visualização externa e tridimensional da célula, dando uma noção mais real do aspecto do espermatozoide, embora não permita a visualização dos componentes internos da célula.

Em um estudo comparativo da morfologia do espermatozoide de primatas do velho e do novo mundo utilizando microscopia eletrônica de varredura, Martin, Gould e Warner (1975) apresentaram uma rica comparação de tamanho entre os espermatozoides das diferentes espécies estudadas (exibindo em certos casos diferenças consideráveis, entre 57,36 μm e 77,61 μm), assim como evidenciaram o aspecto do coágulo seminal apresentando espermatozoides em meio a uma matriz protéica, e alta taxa de implantação abaxial de peça intermediária em *Saimiri sciureus*, uma espécie de primata do novo mundo. Estas últimas observações corroboram o observado no presente estudo em relação ao coágulo, e à presença da implantação abaxial como um defeito menor comum em espermatozoides de primatas do novo mundo. Infelizmente, os citados autores não trabalharam com nenhuma das espécies abordadas neste estudo.

Em outro estudo envolvendo microscopia eletrônica de varredura com espermatozoides de primatas, Gould (1980) conclui que as maiores diferenças observadas entre as espécies são representadas por variações de tamanho e forma da membrana acrossomal, além do número, tamanho e organização das mitocôndrias na peça intermediária, diferenças estas condizentes com as observadas do presente estudo.

Fica evidente, portanto, a validade da pesquisa dos aspectos ultraestruturais dos espermatozoides, especialmente quando abordados por diferentes técnicas que exibam resultados comparáveis, mas também complementares.

Na espécie humana, há tempos que se investe na busca pelo estabelecimento de padrões ultraestruturais que possam ser utilizados como parâmetros para o estabelecimento do diagnóstico de patologias seminais e de infertilidade ou subfertilidade. Estando claramente estabelecidos os padrões morfológicos normais, alterações deste padrão podem ser detectadas com clareza, como nos casos relatados por Reichart et al. (2000); Baccetti et al. (2004); Skowronek et al. (2010) e Curti et al. (2014), onde são nitidamente percebidas células líticas, axonemas com padrão alterado ou desorganizado, ausência do microtúbulo central do centríolo proximal ou ausência da bainha fibrosa na peça principal.

O uso de imagens da ultraestrutura dos espermatozoides de primatas neotropicais só trará benefícios aos programas de reprodução destas espécies, muitas vezes ameaçadas de extinção, como no caso de *L. chrysomelas* apresentado neste trabalho, quando se investir na pesquisa básica e geração de dados para futuras comparações com finalidade diagnóstica, seja de patologias primárias, seja da interferência dos processos de criopreservação sobre a morfologia espermática. Para a geração de dados não há outra opção que não seja a árdua pesquisa e descrição morfológica do maior número de espécies que se possa abordar, pelo maior número de autores que se possa comparar.

7 CONCLUSÕES

- A utilização de eletroejaculação por via retal para colheita de sêmen de *A.g. clamitans* resultou em ejaculação de sêmen de qualidade, sendo considerada um método adequado para a obtenção de sêmen nesta espécie.
- A análise do sêmen fresco de *A.g. clamitans* foi realizada com sucesso, permitindo a primeira descrição das características do sêmen fresco desta espécie.
- A adaptação do método de preparo de sêmen de *L. chrysomelas*, *A. caraya* e *A.g. clamitans* para microscopia eletrônica de transmissão apresentou sucesso, permitindo a recuperação de espermatozoides de qualidade para análise ultraestrutural.
- Os espermatozoides das três espécies estudadas apresentaram os componentes básicos descritos para o espermatozoide humano, com variações na forma e tamanho destes.
- As diferenças mais significativas encontradas entre os espermatozoides comparados foram extensão de acrossomo, bem como comprimento, largura e organização de peça intermediária.

REFERÊNCIAS

- ABBOT, D. H. Behavioral and physiological suppression of fertility in subordinate marmoset monkeys. **American Journal of Primatology**, v. 6, p. 169-186, 1984.
- ACKERMAN, D. R.; ROUSSEL, J. D. Fructose, lactic acid and citric acid content of the semen of eleven subhuman primate species and of man. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, p. 563-566, 1968.
- AGORAMOORTHY, G.; HSU, M. J. Extragroup copulation among wild red howler monkeys in Venezuela. **Folia Primatologica**, v. 71, p. 147–151, 2000.
- AGUIAR, L. M.; MELLEK, D. M.; ABREU, K. C.; BOSCARATO, T. G.; BERNARDI, I. P.; MIRANDA, J. M. D.; PASSOS, F. C. Sympatry between *Alouatta caraya* and *Alouatta clamitans* and the rediscovery of free-ranging potential hybrids in Southern Brazil. **Primates**, v. 48, p. 24-248, 2007.
- 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, p. 107-119, 1994.
- ARAKAKI, P. R. **Avaliação de duas concentrações de glicerol na criopreservação do sêmen de duas espécies de primatas neotropicais**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- ARAKAKI, P. R.; CARVALHO, F. M.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VALLE, R. R. Collection and analysis of semen from Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*). In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS CONFERENCE, 2011, Kansas City. **Proceedings...** Kansas City: American Association of Zoo Veterinarians, 2011. p. 14-15.
- ARAKAKI, P. R.; CARVALHO, F. M.; MENDES, C. M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VALLE, R. R. Evaluation of sperm DNA fragmentation of semen from Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*). In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PRIMATOLOGICAL SOCIETY, 24º, 2012, Cancun. **Proceedings...** Cancun: IPS, 2012. P. 282.
- ARAÚJO, L. L.; LIMA, J. S.; OLIVEIRA, K. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VALLE, R. R.; DOMINGUES, S. F. S. Uso de solução à base de água de coco a 37°C como diluidor de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) mantido em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 588-594, 2009.
- ARDITI, S.I.; PLACCI, L.G. Hábitat y densidad de *Aotus azarae* y *Alouatta caraya* en Riacho Pilagá, Formosa. **Boletín Primatológico Latinoamericano**, v. 2, p. 29-47, 1990.
- AURICCHIO, P. **Primas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995. 168 p.
- AUSTIN, C. R. Fine structure of the snake sperm tail. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 12, p. 452-462, 1965.

- BACCETTI, B.; BRUNI, E.; GAMBERA, L.; MORETTI, E.; PIOMBONI, P. An ultrastructural and immunocytochemical study of a rare genetic sperm tail defect that causes infertility in humans. **Fertility and Sterility**, v. 82, n. 2, p. 463-468, 2004.
- BADER, H. Electroejaculation in chimpanzees and gorillas and artificial insemination in chimpanzees. **Zoo Biology**, v. 2, p. 307-314, 1983.
- BARNABE, R. C.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; OLIVEIRA, C. A.; BARNABE, A. H. Analysis of some normal parameters of the spermiogram of captive capuchin monkeys (*Cebus apella* Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n. 6, p. 331-333, 2002.
- BASKET, M. R.; HOWARTH JR., B. The head, neck and midpiece of cock spermatozoa examined with the transmission electron microscope. **Biology of Reproduction**, v. 12, p. 632-640, 1975.
- BEDFORD, J.M. Biology of primate spermatozoa. **Contributions to Primatology** v. 3, p. 97-139, 1974.
- BENNETT, J. P. Semen collection in the squirrel monkey. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 13, p. 353-355, 1967.
- BJÖRNDAHL, L.; SÖDERLUND, I.; KVIST, U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. **Human Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 813-816, 2003.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinærmedicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.
- BRACKETT, B. G. Reprodução em mamíferos do sexo masculino. In: REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 639-640.
- BROWN, A. D.; ZUNINO, G. E. Hábitat, densidad y problemas de conservación de los primates de Argentina. **Vida Silvestre Neotropical**, v. 3, p. 30-40, 1994.
- BUSH, D. E.; RUSSEL, L. H.; FLOWERS, A. I.; SORENSEN, A. M. Semen evaluation in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Laboratory Animal Science**, v. 25, p. 588-593, 1975.
- CARMINATTI, M. O. F.; SETZ, E. Z. F. Cuidado parental em *Alouatta caraya* em cativeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 25., 2004, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2004. p. 249
- CARVALHO, F. M. **Avaliação de diuoidores à base de gema de ovo e lecitina de soja para a congelação de sêmen de *Alouatta caraya***. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

COIMBRA-FILHO, A. F. Mico-leão, *Leontideus rosalia* (Linnaeus, 1766), situação atual da espécie no Brasil (Callithricidae - Primates). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 41, p. 29-52, 1969.

COIMBRA-FILHO, A. F. *Leontopithecus rosalia chrysopygus* (Mikan, 1823) o mico-leão do Estado de São Paulo (Callitrichidae . Primates). **Silvicultura**, v. 10, p. 1-36, 1976a.

COIMBRA-FILHO, A. F. **Os sagüis do gênero *Leontopithecus* Lesson, 1840 (Callithricidae - Primates)**. 1976. 90 f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Janeiro, Rio de Janeiro, 1976b.

COIMBRA-FILHO, A. F.; MAIA, A. A. O processo de muda dos pêlos de *Leontopithecus r. rosalia* (Linnaeus, 1766). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 39, n. 1, p. 83-93, 1979.

COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. Conservation of the Brazilian lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). In: PRINCE RAINIER III OF MONACO, H. S. H; BOURNE, G. H. (Ed.). **Primate conservation**. New York: Academic Press, 1977. p. 59-94.

COIMBRA-FILHO, A.F.; MITTERMEIER, R.A. Distribution and ecology of the genus *Leontopithecus* Lesson, 1840 in Brazil. **Primates**, v. 14, p. 47-66, 1973.

COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. Taxonomy of the genus *Leontopithecus* Lesson, 1840. In: BRIDGWATER, D. D (Ed.). **Saving the lion marmoset**. Wheeling: Wild Animal Propagation Trust, 1972. p. 7-22.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

CROCKETT, C. M.; EISENBERG, J. F. Howlers: Variation in group size and demography. In: SMUTS, B. B.; CHENEY, D. L.; SEYFARTH, R. M.; WRANGHAM, R. W.; STRUHSAKER, T. T (Ed.). **Primates societies**. Chicago: University of Chicago Press, 1987. p. 54-68.

CUI, K. H. The effect of stress on semen reduction in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Human Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 568-573, 1996.

CUI, K. H.; FLAHERTY, S. P.; NEWBLE, C. D.; GUERIM, M. V; NAPIER, A. J.; MATTHEUS, C. D. Collection and analysis of semen from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Andrology**, v. 12, n. 3, p. 214-220, 1991.

CURTI, G.; SKOWRONEK, F.; VERNOCCHI, R.; RODRIGUEZ-BUZZI, A. L.; RODRIGUEZ-BUZZI, J. C.; CASANOVA, G.; SAPIRO, R. Morphological evaluation of sperm from infertile men selected by magnetic activated cell sorting (MACS). **Reproductive Biology**, v. 14, p. 289-292, 2014.

DELLA SERRA, O. Divisão do gênero *Leontocebus* (Macacos, Platyrrhini) em dois subgêneros sob bases de caracteres dento-morfológicos. **Papéis Avulsos Zoologia**, v. 10, n. 8, p. 147-154, 1951.

DI BITETTI, M. S.; JANSON, C. H. When will the stork arrive? Patterns of birth seasonality in Neotropical primates. **American Journal of Primatology**, v. 50, p. 109-130, 2000.

DURRANT, B. S. Semen collection, evaluation and cryopreservation in exotic animal species: maximizing reproductive potential. **Ilar News**, v. 32, n. 1, p. 2-9, 1990.

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

EPPLÉ, G.; KATZ, Y. The saddle back tamarin and other tamarins. In: HEARN, J. (Ed.). **Reproduction in new world primates**. Lancaster: MTP Press Limited, 1983. p.115-148.

ESTRADA, A. Primate conservation in South America: the human and ecological dimensions of the problem. In: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; BICCA-MARQUES, J. C.; HEYMANN, E. W.; STRIER, K. B. (Ed.). **South american primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation**. New York: Springer, 2009. 564 p.

FAWCETT, D. W. A Comparative View of Sperm Ultrastructure. **Biology of Reproduction Supplement**, v. 2, p. 90-127, 1970.

FERNANDEZ-DUQUE, E.; WALLACE, R. B.; RYLANDS, A. B. *Alouatta caraya*. **The IUCN red list of threatened species**. Version 2014.2. 2008. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10 ago. 2014.

FERRARI, S. F.; LOPES-FERRARI, M. A. A re-evaluation of the social organization of the Callitrichidae, with reference to the ecological differences between genera. **Folia Primatologica**, v. 52, n. 3-4, p. 132-147, 1989.

FLEAGLE, J.; TEJEDOR, M. F. Early platyrrhines of southern South America. In HARTWING, W.C. (Ed.) **The primate fossil record**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 161–173.

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

FORMAN, L.; KLEIMAN, D. G.; BUSH, R. M.; DIETZ, J. M.; BALLOU, J. D.; PHILLIPS, L. G.; COIMBRA-FILHO, A. F.; O'BRIEN, S. J. Genetic variation within and among lion tamarins. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 71, p. 1-11, 1986.

FRANCO, J. G. J. R.; BARUFFI, R. L. B.; MAURI, A. L.; PETERSEN, C. G.; OLIVEIRA, J. B. A.; VAGNINI, L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 17, p. 42-45, 2008.

FRENCH, J. A.; BALES, K. L.; BAKER, A. J.; DIETZ, J. M. Endocrine monitoring of wild dominant and subordinate females *Leontopithecus rosalia*. **International Journal of Primatology**, v. 24, n. 6, p. 1281-1300, 2003.

GARBER, P. A.; ESTRADA, A. Advancing the Study of South American Primates. In: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; BICCA-MARQUES, J. C.; HEYMANN, E. W.; STRIER, K.B. (Ed.). **South american primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation**. New York: Springer, 2009. 564 p.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 97.

GOULD, K. G. Scanning electron microscopy of the primate sperm. **International Review of Cytology**, New York, v. 63, p. 323-354, 1980.

GOULD, K. G., MANN, R. D. Comparisons of electro stimulation methods for semen recovery in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Journal of Medical Primatology**, v. 17, p. 95-103, 1988.

GOULD, K. G.; STYPEREK, R. P. Improved methods for freeze preservation of chimpanzee sperm. **American Journal of Primatology**, New York, v. 18, p. 275-284, 1989.

GOULD, K. G.; WARNER, H.; MARTIN, D. E. Rectal probe electroejaculation of primates. **Journal of Medical Primatology**, New York, v. 7, p. 213-222, 1978.

GOULD, K. G.; YOUNG, L. G. Functional parameters of chimpanzees (*Pan troglodytes*) sperm from ejaculates collected by rectal probe electrostimulation and by artificial vagina. **American Journal of Primatology**, v. 39, p. 115-122, 1996.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS ANNUAL CONVENTION, 47. 2001, San Diego. **Proceedings...** 2001. v. 47, p. 302-305.

GREGORIN, R. Taxonomy and geographic variation of species of the genus *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 1, p. 64-144, 2006.

GREGORIN, R.; KUGELMEIER, T.; VALLE, R. R. Gênero *Alouatta* Lacépède 1799. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; ANDRADE, F. R. **Primates brasileiros**. Londrina: Technical Books, 2008. p. 189-204.

GROVES, C. P. **Primate taxonomy**. Washington: Smithsonian Institution Press, 2001.

GUIMARÃES, M. A. B. V. **Contribuição para o estudo da colheita e avaliação do sêmen do macaco prego *Cebus apella* (Erxleben, 1777)**. 1994. 41 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 97.

HAMILTON, D. W.; FAWCETT, D. W. Unusual features of the neck and middle-piece of snake spermatozoa. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 23, p. 81-97, 1968.

HARRIS, E. E.; GIFALLI-INGHETTI, C.; BRAGA, Z. H.; KOIFFMAN, C. P. Cytochrome b sequences show subdivision between populations of the brown howler monkey *Alouatta guraiba* from Rio de Janeiro and Santa Catarina, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 13, n. 2, p. 16–17, 2005.

HARRISON, R. M.; WOLF, R. H. Sperm parameters and testicular volumes in *Saguinus mystax*. **Journal of Medical Primatology**, v. 14, p. 281-284, 1985.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; CERDA-MOLINA, A. L.; PÁEZ-PONCE, L. D.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Seasonal emission of seminal coagulum and in vivo sperm dynamics in the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **Theriogenology**, v. 69, p. 466-472, 2008a.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; CERDA-MOLINA, A. L.; PÁEZ-PONCE, D. L.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. The seminal coagulum favours passage of fast-moving sperm into the uterus in the black-handed spider monkey. **Reproduction**, v. 136, n. 4, p. 411-421, 2008b.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; PARRA, G. C.; CERDA-MOLINA, A. L.; PÉREZ-BOLAÑOS, S. C.; SÁNCHEZ, V. D.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Digestion by trypsin enhances assessment of sperm parameters in the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **Laboratory Primate Newsletter**, v. 41, n. 3, p. 40-45, 2002b.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; PARRA, G. C.; CERDA-MOLINA, A. L.; PÉREZ-BOLAÑOS, S. C.; SÁNCHEZ, V. D.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Sperm quality differences between the rainy and dry seasons in captive black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). **American Journal of Primatology**, v. 57, p. 35-41, 2002a.

HERSHKOVITZ, P. **Living new world monkeys (Platyrrhini), with an introduction to primates**. Chicago: University of Chicago Press, 1977.

HOAGE, R. J. Parental care in *Leontopithecus rosalia rosalia*: sex and age differences in carrying behaviour and the role of prior experience. In: KLEIMAN, D. G. (Ed.). **The biology and conservation of the Callitrichidae**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1977. p. 293-305.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **The IUCN red list of threatened species**. [200-?] Disponível em: <<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=39916>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **The IUCN red list of threatened species**. [200-?] Disponível em: <<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=40643>>. Acesso em: 16 nov. 2015.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **The IUCN red list of threatened species**. [200-?] Disponível em: <<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=41545>>. Acesso em: 16 nov. 2015.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **The IUCN red list of threatened species**. [200-?] Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/41545/0>>. Acesso em: 06 mai. 2015.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **The IUCN red list of threatened species**. [200-?] Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/39916/0>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **The IUCN red list of threatened species**. [200-?] Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/39918/0>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **The IUCN red list of threatened species**. [200-?] Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/40643/0>>. Acesso em: 10 ago. 2014.

JANINI, J. B. M.; PEREIRA, O. S. **Atlas de morfologia espermática**. São Paulo: Atheneu, 2001. 251p.

KIERULFF, M. C. M.; RABOY, B.; PROCÓPIO DE OLIVEIRA, P.; MILLER, M.; PASSOS, F. C.; PRADO, F. Behavioral ecology of *Leontopithecus*. In: KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. (Ed.). **The lion tamarins of Brazil**. Washington: Smithsonian Institution Press, 2002. p. 157-187.

KIERULFF, M. C. M.; RYLANDS, A. B.; MENDES, S. L.; DE OLIVEIRA, M. M. *Leontopithecus chrysomelas*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2014.2, 2008. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10 ago. 2014.

KLEIMAN, D. G. Characteristics of reproduction and sociosexual interactions in pairs of lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*) during the reproductive cycle. In: KLEIMAN, D. G. (Ed.). **The biology and conservation of the Callitrichidae**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1977. p. 181-190.

KLEIMAN, D. G. The development of pair preferences in the lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*): male competition or female choice? In: ROTHE, H., WALTERS, H. J.; HEARN, J. P. (Ed.). **Biology and behaviour of marmosets**. Gottingen: Proceedings of the Marmoset Workshop, 1978. p. 203-208.

KOWALEWSKI, M. M.; ZUNINO, G. E. Birth seasonality in *Alouatta caraya* in Northern Argentina. **International Journal of Primatology**, v. 25, n. 2, p. 383–400, 2004.

KRAEMER, D. C.; CRUZ, N. D. C. V. Collection, gross characteristics and freezing of baboon semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 20, p. 345-348, 1969.

KÜDERLING, I.; MORRELL, J. M.; NAYUDU, P. L. Collection of semen from marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) for experimental use by vaginal washing. **Laboratory Animals**, v. 30, p. 260-266, 1996.

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

KUGELMEIER, T. **Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) por vibroestimulação: do condicionamento ao coágulo seminal**. São Paulo, 2011. 232 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LAKE, P. E.; SMITH, W.; YOUNG, D. The ultrastructure of the ejaculated fowl spermatozoon. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 53, p. 356-366, 1968.

LANG, C. M. A technique for the collection of semen from squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) by electro-ejaculation. **Laboratory Animal Care**, v. 17, n. 2, p. 218-221, 1967.

LANZENDORF, S. E.; HOLMGREN, W. J.; SCHAFFER, N.; HATASAKA, H.; WENTZ, A. C.; JEYENDRAN, R. S. In vitro fertilization and gamete micromanipulation in the lowland gorilla. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 9, p. 358-364, 1992.

LESICH, K. A.; PINHO, T. G.; DANG, L.; LINDEMANN, C. B. Ultrastructural evidence that motility changes caused by variations in ATP, Mg^{2+} and ADP correlate to conformational changes in reactivated bull sperm axonemes. **Cytoskeleton**, v. 71, p. 649-661, 2014.

LOKSCHIN, L. X.; PRINTES, R. C.; CABRAL, J. N. H.; BUSS, G. Powerlines and howler monkey conservation in Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Neotropical Primates**, v. 14, n. 2, p. 76-80, 2007.

MARTIN, D. E.; GOULD, K. G.; WARNER, H. Comparative morphology of primate spermatozoa using scanning electron microscopy. Families Hominidae, Pongidae, Cercopithecidae and Cebidae. **Journal of Human Evolution**, v. 4, p. 287-292, 1975.

MASSAROTTO, V. M.; CARVALHO, F. M.; ARAKAKI, P. R.; CALVI, T. S.; NICHI, M.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; MIGLINO, M. A.; VALLE, R. R. Collection and analysis of semen from *Callithrix penicillata*. **Primate Research**, v. 26, p. 164, 2010.

MATSON, P. L.; MYSSONSKI, K.; YOVICH, S.; MORRISON, L.; IRVING, J.; BAKOS, H. W. The density of human semen and the validation of weight as an indicator of volume: a multicentre study. **Reproductive Biology**, v. 10, n. 2, p. 141-153, 2010.

MENDES, S. L.; RYLANDS, A. B.; KIERULFF, M. C. M.; DE OLIVEIRA, M. M. *Alouatta guariba*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2008**: e.T39916A10284881, 2008b. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 23 mar. 2016.

MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. F. Systematics: species and subspecies - an update. In: MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. F.; DA FONSECA, G. A. B. (Ed.), **Ecology and behavior of neotropical primates**. Washington: World Wildlife Fund, 1988. p. 13-75.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. *In vitro* evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104-118, 2008.

MORAES, I. A.; PISSINATTI, L.; FERREIRA, A. M.; PISSINATTI, A. Sazonalidade do processo reprodutivo em *Leontopithecus* em cativeiro (Callitrichidae- Primates). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 31., 2004, São Luis. Anais...1 CD-ROM.

MORELAND, R. B.; RICHARDSON, M. E.; LAMBERSKI, N.; LONG, J. A. Characterizing the reproductive physiology of the male southern black howler monkey, *Alouatta caraya*. **Journal of Andrology**, v. 22, n.3, p. 395-403, 2001.

MORETTI, E.; COLLODEL, G. Electron microscopy in the study of human sperm pathologies. **Translocations**, v. 33, p. 343-351, 2012.

MORRELL, J. M.; HODGES, J. K. Germplasm cryopreservation of non-human primates. In: WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (Ed.). **Cryobanking the genetic resource: wildlife conservation for the future?** New York: Taylor & Francis, 2001. p. 407-426.

MORRELL, J. M.; KÜDERLING, I.; HODGES, J. K. Influence of semen collection method on ejaculate characteristics in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 2, p. 164-172, 1996.

NAGANO, T. Observations on the fine structure of the developing spermatid in the domestic chicken. **Journal of Cell Biology**, v. 14, p. 193-205, 1962.

NATORI, M. An analysis of cladistic relationships of *Leontopithecus* based on dental and cranial characters. **Journal of the Anthropological Society of Nippon**, v. 97, n. 2, p. 157-167, 1989.

NEVILLE, M. K.; GLANDER, K. E.; BRAZA, F.; RYLANDS, A. B. The Howling Monkeys, Genus *Alouatta*. In: MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. F.; DA FONSECA, G. A. B. (Ed.). **Ecology and behavior of neotropical primates**. Washington: World Wildlife Fund, 1988. p. 349-453.

NORCONK, M. A.; WRIGHT, B. W.; CONKLIN-BRITTAIN, N. L.; VINYARD, C. J. Mechanical and Nutritional Properties of Food as Factors in Platyrrhine Dietary Adaptations. In: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; BICCA-MARQUES, J. C.; HEYMANN, E. W.; STRIER, K. B. (Ed.). **South american primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation**. New York: Springer, 2009. 564 p.

O'BRIEN, J. K.; HOLLINSHEAD, F. K.; EVANS, K. M.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. **Reproduction, Fertility and Development**, v.15, p. 367-375, 2003.

OERKE, A. K.; EINSPANIER, A.; HODGES, J. K. Noninvasive monitoring of follicle development ovulation, and corpus luteum formation in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) by ultrasonography. **American Journal of Primatology**, v. 39, p. 99-113, 1996.

OLIVEIRA, J. B.; MASSARO, F. C.; BARUFFI, R. L. R.; MAURI, A. L.; PETERSEN, C. G.; SILVA, L. F. I.; VIGNINI, L. D.; FRANCO, J. G. J. R. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. **Fertil Steril**, v. 94, p. 1937-1940, 2010.

OLIVEIRA, K. G.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; DOMINGUES, S. F. S. Conservação do sêmen e liquefação do coágulo seminal de macaco-prego (*Cebus apella*) em água de coco em pó (ACP-118®), em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 617-621, 2010.

OLIVEIRA, K. G.; MIRANDA, S. A.; LEÃO, D. L.; BRITO, A. B.; SANTOS, R. R.; DOMINGUES, S. F. S. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 75-80, 2011.

PAZ, R. C. R.; TEIXEIRA, R. H. F.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Avaliação das características seminais de macacos pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, antes e após vasectomia bilateral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 561-567, 2006a.

PAZ, R. C. R.; ZACARIOTTI, R. L.; TEIXEIRA, R. H. P.; GUIMARÃES, M. A. B. V. O efeito das enzimas hialuronidase e tripsina na liquefação do sêmen de macacos pregos (*Cebus apella*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 196-201, 2006b.

PEDERSEN, H. The postacrosomal region of the spermatozoa of man and *Macaca arctoides*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 40, n.3, p. 366-377, 1972.

PEDERSEN, H. Ultrastructure of the ejaculated human sperm. **Z Zellforsch**, v. 94, p. 542-554, 1969.

PINTO, L. P. S. **Distribuição geográfica, população e estado de conservação do mico-leão-de-cara-dourada, *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae, Primates)**. 1994. 85 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

PINTO, L. P. S.; RYLANDS, A. B. Geographic distribution of the golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*: implications for its management and conservation. **Folia Primatologica**, v. 68, p. 161-180, 1997.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v. 22, p.87-95, 1991.

POPE, C. E.; DRESSER, B. L.; CHIN, N. W.; LIU, J. H.; LOSKUTOFF, N. M.; BEHNKE, E. J.; BROWN, C.; MCRAE, M. A.; SINOWAY, C. E.; CAMPBELL, M. K.; CAMERON, K. N.; OWENS, O. M.; JOHNSON, C. A.; EVANS, R. R.; CEDARS, M. I. Birth of a western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) following in vitro fertilization and embryo transfer. **American Journal of Primatology**, v. 41, p. 247-260, 1997.

PUDRITZ, S. **Untersuchungen zu Kapazitierung und Akrosomreaktion der Spermatozoen des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) in vitro**. 2000. 115 f. Doutorado (Doctoral thesis) - Faculty of Biology, University of Marburg, Marburg, 2000.

PUSEY, A. E.; PACKER, C. Dispersal and philopatry. In: SMUTS, B. B.; CHENEY, D. L.; SEYFARTH, R. M.; WRANGHAM, R. W.; STRUHSAKER, T. T. (Ed.). **Primate societies**. Chicago: University of Chicago Press, 1987. p. 250-266.

REICHART, M.; ELTES, F.; SOFFER, Y.; ZIGENREICH, E.; YOGEV, L.; BARTOOV, B. Sperm ultramorphology as a pathophysiological indicator of spermatogenesis in males suffering from varicocele. **Andrologia**, v. 32, p. 139-145, 2000.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 297-308, 1997.

ROSENBERGER, A. L. Evolutionary Morphology, Platyrrhine Evolution, and Systematics. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 294, n. 12, p. 1955-1974, 2011

ROSENBERGER, A. L.; TEJEDOR, M. F.; COOKE, S. B.; PEKAR, S. Platyrrhine Ecophylogenetics in Space and Time. In: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; BICCA-MARQUES, J. C.; HEYMANN, E. W.; STRIER, K. B. (Ed.). **South american primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation**. New York: Springer, 2009. 564 p.

ROSENBERGER, A. L.; COIMBRA-FILHO, A. F. Morphology, taxonomic status and affinities of the lion tamarins, *Leontopithecus* (Callitrichinae, Cebidae). **Folia Primatologica**, v. 42, p. 149-179, 1984.

ROUDEBUSH, W. E.; MATHUR, R. S. Presence of platelet-activating factor in squirrel monkey (*Saimiri boliviensis*) spermatozoa: seasonal differences. **American Journal of Primatology**, v. 45, p. 301-305, 1998.

RUMIZ, D. I. *Alouatta caraya*: population density and demography in northern Argentina. **American Journal of Primatology**, v. 21, p. 279-294, 1990.

RYLANDS, A. B. **The behaviour and ecology of three species of marmosets and tamarins (Callitrichidae, Primates) in Brazil**. 1982. 202 f. Tese (Doutorado), Universidade de Cambridge, Cambridge, 1982.

RYLANDS, A. B. Sympatric Brazilian callitrichids: the black-tufted-ear marmoset, *Callithrix kuhli*, and the golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*. **Journal of Human Evolution**, v. 18, n. 7, p. 679-695, 1989.

RYLANDS, A. B. The ecology of the lion tamarins, *Leontopithecus*: some intrageneric differences and comparisons with other callitrichids. In: RYLANDS, A. B. (Ed.). **Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology**. Oxford: Oxford University Press, 1993. p. 296–313.

RYLANDS, A.B.; BRANDON-JONES, D. Scientific nomenclature of the red howlers from the northeastern Amazon in Brazil, Venezuela, and the Guianas. **International Journal of Primatology**, v. 19, n. 5, p. 879-905, 1998.

RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. Systematics, distributions, and some notes on the conservation status of the Callitrichidae. In: RYLANDS, A.B (Ed.). **Marmosets and tamarins: systematics, behaviour and ecology**. Oxford: Oxford University Press, 1993. p. 11-77.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. The Diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An annotated taxonomy. In: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; BICCA-MARQUES, J. C.; HEYMANN, E. W.; STRIER, K. B. (Ed.). **South american primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation**. New York: Springer, 2009. 564 p.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA JR, J. S. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. **International Zoo Yearbook**, v. 46, n. 1, p. 11-24, 2012.

RYLANDS, A. B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A.; GROVES, C. P.; RODRÍGUEZ-LUNA, E. An assessment of the diversity of New World primates. **Neotropical Primates**, v. 8, n. 2, p. 61-93, 2000.

SAMPAIO, R.; RÖHE, F.; PINHO, G.; SILVA-JÚNIOR, J. S.; FARIAS, I. P.; RYLANDS, A. B. Re-description and assessment of the taxonomic status of *Saguinus fuscicollis cruzlimai* Hershkovitz, 1966 (Primates, Callitrichinae). **Primates**, v. 56, n. 2, p. 131-144, 2015.

SAMUELSON, D. A. **Tratado de histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 413 – 415.

SANKAI, T.; TERAOKA, K.; YANAGIMACHI, R.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 273-278, 1994.

SANTOS, C.V. **Estudo comparativo do cuidado parental e desenvolvimento de filhotes de calitriquídeos (*Callithrix* e *Leontopithecus*) em função do tamanho do grupo**. 1994. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 1994.

SANTOS, I. L. S. A.; CARVALHO, J. C.; ARAKAKI, P. R.; RASSY, F. B.; NICHII, M.; VALLE, R. R. Validação da coloração com eosina/nigrosina para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de Mico-Leão-de-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*). In: CONGRESSO, 17; ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 23., 2014, São Paulo. Anais... 2014. p. 318-319. Disponível em: <<http://www.abravas.org.br/conteudo.php?go=52&file=anais-2014.html>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

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

SEUÁNEZ, H. N.; FORMAN, L.; ALVES, G. Comparative chromosome morphology in three callitrichid genera: *Cebuella*, *Callithrix* and *Leontopithecus*. **Journal of Heredity**, v. 79, p. 418-424, 1988.

SHOEMARKER, A. H. F. Fecundity in the captive howler monkey (*Alouatta caraya*). **Zoo Biology**, v.1, n. 2, p. 149-156, 1982.

SIMPSON, G. G. **Splendid Isolation**: the curious history of South American Mammals. Yale: Yale Univ, 1980. 12p.

SILVA, K. S. M. **Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de Ateles (macaco-aranha) mantidos em cativeiro**. 2005. 83 f. Dissertação (Ciência Animal) - Centro Agropecuário, Universidade Federal do Pará, Belém.

SKOWRONEK, M. F.; ALCIATURI, J.; CASANOVA, G.; CAPURRO, A.; MONTES, J. M.; SAPIRO, R. Value of quantitative ultramorphological sperm analysis in infertile men. **Reproductive Biology**, v. 10, n. 2, p. 125-139, 2010.

STEELE, J. Hominid evolution and primate social cognition. **Journal of Human Evolution**, v. 18, p. 421-432, 1989.

STRIER, K. B.; MENDES, S. L.; SANTOS, R. R. Timing of births in sympatric brown howler monkeys (*Alouatta fusca clamitans*) and northern muriquis (*Brachyteles arachnoides hypoxanthus*). **American Journal of Primatology**, v. 5, p. 87–100, 2001.

THOMPSON, S. D. Zoo research and conservation: beyond sperm and eggs toward the science of animal management. **Zoo Biology**, v. 12, p. 155-159, 1993.

THOMSON, J. A.; ILLIF-SIZEMDRE, S. A.; GLIESSMAN, P. M.; WOLF, D. P.; Collection and fertilization potential of sperm from the sulawesi crested black macaque (*Macaca nigra*). **American Journal of Primatology**, v. 28, p. 289-297, 1992.

THORINGTON JR., R. W.; RUIZ, J. C.; EISENBERG, J. F. A study of a black howler monkey (*Alouatta caraya*) population in northern Argentina. **Am J Primatol**, v. 6, p. 357-366, 1984.

TOLLNER, T. L.; VANDEVOORT, C. A.; OVERSTREET, J. M.; DROBNIS, E. Z.; Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 347-352, 1990.

VALERIO, D. A.; ELLIS, E. B.; CLARK, M. L.; THOMPSON, G. E. Collection of semen from macaques by electro ejaculation. **Laboratory Animal Care**, v. 19, n. 2, p. 250-252, 1969.

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

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

VALLE, R. R.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; MUNIZ, J. A. P. C.; BARNABE, R. C.; VALE, W. G. Collection and evaluation of semen from captive howler monkeys (*Alouatta caraya*). **Theriogenology**, v. 62, p. 131-138, 2004.

VALLE, R. R.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; NAYUDU, P. L. Validation of an acrosome staining for a Neotropical primate species, the common marmoset (*Callithrix jacchus*) for use under field conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 38, 2006. Supplement 1.

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

VAN PELT, L. P.; KEYSER, P. E. Observation on semen collection and quality in macaques. **Laboratory Animal Care**, v. 20, n. 4, p. 726-733, 1970.

VERONA, C. E. S.; SOUZA, F. F.; TONIOLLO, G. H.; GARCIA, J. M.; ESPER, C. R. Colheita e avaliação do sêmen de sagui-de-tufo-preto (*Callithrix jacchus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 544-552, 2009.

VIDAL, F. D.; LUZ, M. S.; PINHO, T. G.; PISSINATTI, A. Coleta de sêmen em micoleão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (Kuhl, 1820) através da eletroejaculação. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 67-71, 2007.

WAGSTAFF, P. A. A device to simplify the rectal probe electro-ejaculation technic for rhesus monkeys. **Journal of American Association of Laboratory Animal Science**, v. 22, p. 748-749, 1972.

WIKIPÉDIA. Alouatta caraya. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. 2015. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Black_howler>. Acesso em: 6 maio 2016.

WIKIPÉDIA. Alouatta guariba clamitans. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. 2015. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Alouatta_guariba_clamitans>. Acesso em: 24 março 2016.

WIKIPÉDIA. Leontopithecus chrysomelas. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. 2015. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Leontopithecus_chrysomelas>. Acesso em: 10 agsto 2014.

WILDT, D.; PUKAZHENTHI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S.; HOWARD, J.; ROTH, T. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction Fertility Development**, v. 7, p. 811-824, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5. ed. Suíça: WHO Press, 2010. 271 p.

WROBEL, K.H.; BERGMAN, S. Sistema reprodutivo do macho. In: EURELL, J. A.; FLAPPIER, B. L. **Histologia veterinária de dellmann**. 6. ed. Barueri: Manole, 2012. p. 239-241.

YEOMAN, R. R.; RICKER, R. B.; WILLIAMS, L. E.; SONKSEN, J.; ABEE, C. R. Vibratory stimulation of ejaculation yields increased motile spermatozoa, compared with electroejaculation, in squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 36, n. 1, p. 33-38, 1997.

YEOMAN, R. R.; SONKSEN, J.; GIBSON, S. V.; RIZK, B. M.; ABEE, C. R. Penile vibratory stimulation yields increased spermatozoa and accessory gland production compared with rectal electroejaculation in a neurologically intact primate (*Saimiri boliviensis*). **Human Reproduction**, v. 13, n. 9, p. 2527-2531, 1998.

APÊNDICE A

Modelo de ficha individual

Dados do animal	
Espécie:	Idade:
Identificação:	Peso:
Número de colheitas:	

Biometria testicular		
Medida	Testículo esquerdo	Testículo direito
Comprimento		
Largura		
Espessura		
Circunferência escrotal		

Colheitas e análise inicial do sêmen					
Colheita número					
Data					
Hora início					
Hora término					
Coloração					
Coágulo					
Volume amostra (µL)					
Volume diluidor (µL)					
pH					
Motilidade total (%)					
Motilidade progr. (%)					
Conc. (x106 spz/ml)					
E/N (% membr. I/NI)	/	/	/	/	/
Pope (% acr. I/NI)	/	/	/	/	/

Morfologia					
Colheita número					
Defeitos maiores					
Defeito acrossomo					
Cabeça subdesenv.					
Cabeça isolada patol.					
Estreitamento base					
Piriforme					
Pequena anormal					
Contorno anormal					
Pouch formation					
Cauda enrolada cab.					
Forte/e dobrada/enr.					
Dobrada com gota					
Defeito na peça int.					
Gota proximal					
Formas teratológicas					
Formas duplas					
Defeitos menores					
Cabeça delgada					
Cabeça gigante					
Cabeça curta					
Pequena normal					
Cabeça larga					
Isolada normal					
Cauda dobrada					
Cauda enrolada					
Retroimplantação					
Implant. abaxial					
Implant. oblíqua					
Gota distal					
Cabeça isol. + P. I.					

APÊNDICE B

Composição do meio diluidor Biggers, Whitten e Whittingham's – BWW

Reagente	Concentração	Quantidade 1x (p/ 1L)
NaCl	94,59mM	5,528g
KCl	4,78mM	0,356g
CaCl ₂ * (2H ₂ O)	1,71mM	0,251g
KH ₂ PO ₄	1,19mM	0,162g
MgSO ₄	1,19mM	0,293g
NaHCO ₃	5,07mM	0,426g
HEPES	20mM	4,766g
Piruvato de Sódio	0,25mM	0,028g
Lactato de Sódio*	21,58mM	4,030g ou 3,030mL
Glicose	5,56mM	1,002g
BSA	-	3g/L
Penicilina G	100.000U/L	0,063g
Estreptomicina	50mg/L	0,05g
Vermelho de Fenol	1mL de solução 0,5%/L	1mL

pH final da solução: 7,4 ou 7,5

** Lactato de Sódio 60% (p/p) sendo d=1,33g/mL (para volume calculado)

APÊNDICE C

Composição das soluções para microscopia eletrônica de transmissão

Tampão cacodilato de sódio

Reagente	Quantidade
Cacodilato de sódio	2,14 mL
Água destilada (q.s.p.)	100 mL
HCl ou NaOH	O suficiente para acertar o pH em 7,2

Glutaraldeído a 2% com pH 7,2

Reagente	Quantidade
Glutaraldeído 25%	1 mL
Tampão cacodilato de sódio	10,5 mL

Tetróxido de ósmio

Reagente	Quantidade
Tetróxido de ósmio	1 % do volume total
Sacarose	10,56 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

Uranila

Reagente	Quantidade
Uranila	0,5 g
Sacarose	10,56 g
Água destilada (q.s.p.)	100 mL