TATIANA KUGELMEIER

**Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*)
por vibroestimulação: do condicionamento ao coágulo seminal**

São Paulo

2011

TATIANA KUGELMEIER

Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) por vibroestimulação: do condicionamento ao coágulo seminal

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2011

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2456
FMVZ

Tatiana Kugelmeyer

Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) por vibroestimulação: do condicionamento ao coágulo seminal / Tatiana Kugelmeyer. – 2011.

110 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. *Saimiri sciureus*. 2. Vibroestimulação peniana. 3. Condicionamento.
4. Cortisol. 5. Coágulo seminal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Colheita de sêmen de mico de cheiro (*Saimiri sciureus* - Linnaeus, 1758) por vibroestimulação peniana: características seminais e perfil hormonal”, protocolado sob o nº 1926/2010, utilizando 14 (quatorze) micos de cheiro, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/05/2010.

We certify that the Research “Semen collection by penile vibratory stimulation in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus* - Linnaeus, 1758): seminal characteristics and hormone profile”, protocol number 1926/2010, utilizing 14 (fourteen) squirrel monkeys, under the responsibility Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência

**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-24/09

Certificamos que o protocolo (P-87/09-2), intitulado "Criação, Produção e Manutenção de Primatas não Humanos no Centro de Criação de Animais de Laboratório/CECAL para atender aos Programas e Projetos Desenvolvidos na Fiocruz", sob a responsabilidade de **ANTONIO DA MOTA MARINHO**, foi aprovado de acordo com os Princípios Éticos no Uso de Animais, atendendo, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Esta licença tem validade até 09/12/2013 e inclui o uso total de:

Macaca fascicularis

- 30 machos
- 50 fêmeas

Macaca mulatta

- 216 machos
- 384 fêmeas

Saimiri sciureus

- 100 machos
- 186 fêmeas

Saimiri ustus

- 11 machos
- 3 fêmeas

Rio de Janeiro, 09 de dezembro de 2009.

Dr.ª. Norma Vollmer Labarthe

Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KUGELMEIER, Tatiana.

Título: Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) por vibroestimulação: do condicionamento ao coágulo seminal.

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr	Instituição:
_____	_____

Assinatura:	Julgamento:
_____	_____

Prof. Dr	Instituição:
_____	_____

Assinatura:	Julgamento:
_____	_____

Prof. Dr	Instituição:
_____	_____

Assinatura:	Julgamento:
_____	_____

Prof. Dr	Instituição:
_____	_____

Assinatura:	Julgamento:
_____	_____

Prof. Dr	Instituição:
_____	_____

Assinatura:	Julgamento:
_____	_____

Dedico aos meus amados Marcelo e Naila, o resultado de tantos dias de ausência e impaciência.

**Aos meus pais, Werner e Aparecida, e a
minha tia Lourdes por formarem o tripé
da minha segurança, acolhimento e
incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Decididamente conciliar doutorado, trabalho e família foi o projeto mais difícil de executar. E somente foi possível com a formação de uma grande equipe constituída por amigos, familiares, profissionais experientes, colegas de trabalho, parceiros institucionais.

Nomear e agradecer cada membro dessa equipe, por si só, já daria uma nova tese. Assim, deixo aqui meus agradecimentos à contribuição de cada um que resultou no trabalho aqui apresentado.

RESUMO

KUGELMEIER, T. **Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) por vibroestimulação**: do condicionamento ao coágulo seminal. [Collection and evaluation of semen from the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) using vibrostimulation: from conditioning to seminal coagulum]. 2011. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os macacos de cheiro (*S. sciureus*) são primatas neotropicais bastante ativos e que se estressam facilmente em cativeiro. Os métodos de colheita e avaliação do sêmen na espécie não foram padronizados de forma a reproduzi-los em diferentes centros de criação. O sêmen forma um firme coágulo imediatamente após a ejaculação e até o momento, nenhum método foi capaz de dissolvê-lo totalmente. Assim, a proposta deste estudo foi avaliar o condicionamento de *S. sciureus* ao método de colheita de sêmen por vibroestimulação peniana com o auxílio de observações comportamentais e dosagem de cortisol sérico. Objetivou-se ainda analisar o sêmen dos animais por meio de testes físicos e morfofuncionais, com e sem a utilização de enzima proteolítica para a dissolução do coágulo seminal. Foram estudados 12 machos adultos, alojados em dupla, em ambiente controlado. O condicionamento a vibroestimulação peniana foi desempenhado pela técnica de reforço positivo por meio de recompensa alimentar. Para a dissolução do coágulo seminal empregou-se a tripsina em três doses e dois tempos de incubação. O cortisol foi dosado pelo método de radioimunoensaio em amostras de soro. No presente estudo os animais foram condicionados às estimulações, porém a taxa de obtenção de ejaculados foi baixa. Contudo, a análise dos parâmetros físicos e morfofuncionais dos ejaculados obtidos mostrou altas porcentagens de espermatozóides móveis e com movimentos progressivos retilíneos com progressão boa à rápida. Somente os parâmetros concentração e espermatozóides com membrana plasmática íntegra foram menores do que o descrito para o gênero. A integridade do acrossomo e grau de atividade mitocondrial foram descritos pela primeira vez para a espécie e apresentaram alta porcentagem de integridade. O tratamento com a tripsina não foi eficaz na dissolução do coágulo nas concentrações de 0,5, 1 ou 5%, mas também não causou danos significativos aos espermatozóides. A dosagem de cortisol sérico demonstrou haver uma resposta aguda e não duradoura ao estresse logo após o procedimento de colheita de sêmen. O maior sucesso no emprego da vibroestimulação peniana

para colheita de sêmen de macacos de cheiro parece depender de ajustes nas técnicas de contenção e estimulação, sazonalidade reprodutiva e contato olfativo com as fêmeas.

Palavras-chave: *Saimiri sciureus*. Vibroestimulação peniana. Condicionamento. Cortisol. Coágulo seminal.

ABSTRACT

KUGELMEIER, T. **Collection and evaluation of semen from the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) using vibroestimulation: from conditioning to seminal coagulum.** [Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) por vibroestimulação: do condicionamento ao coágulo seminal]. 2011. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The squirrel monkeys (*S. sciureus*) are very active neotropical primates, who get easily stressed in captivity. The semen collection and evaluation methods in this species have not been standardized to make possible their reproduction in different breeding centers. The semen turns into a firm coagulum immediately after the ejaculation, and, so far, any method was able to dissolve it completely. Therefore, the aim of this study was to evaluate the conditionment of *S. sciureus* to the semen collection method through the penile vibrostimulation with the assistance of behavioural observation and serum cortisol. Another objective was to analyze the semen of these animals through physical and morphofunctional tests, with and without the use of proteolytic enzymes to dissolve the semen coagulum. The study was performed in twelve male adults, hosted in couples, in a controlled environment. The training for the penile vibrostimulation was made through the positive reinforcement technique, with food reward. To dissolve the semen coagulum, it was made use of trypsin, at three doses and two incubation periods. Cortisol was measured through radioimmunoassay in serum samples. For this study, the animals were conditioned to the stimulations, though the semen attainment rate was low. Therefore, the analysis of the physical and morphofunctional semen parameters resulted in high percentages of mobile spermatozoa, with a straight-line progressive movement (good to fast progression). Only the parameters concentration and integrity of sperm plasma membrane were lower than the pattern for this genus. The achrossome integrity and the mitochondrial activity were described for the first time for this species and presented high integrity percentage. The treatment with trypsin was effective in dissolving the coagulum in concentrations of 0.5, 1 or 5%, but did not bring significant hazard to the spermatozoa. Measurement of serum cortisol showed an acute and not durable response to stress immediately after semen collection

proceedings. The biggest success in the employment of the penile vibrostimulation in the collection of the squirrel monkey semen seems to depend on the handling and stimulation techniques, reproductive seasonality and contact with the female's smell.

Keywords: *Saimiri sciureus*. Penile vibrostimulation. Conditioning. Cortisol. Seminal coagulum.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 O GÊNERO <i>Saimiri</i>	18
2.1.1 Endocrinologia reprodutiva e do estresse nos machos	26
2.1.2 Manutenção em cativeiro	28
2.1.3 A espécie <i>Saimiri sciureus</i>	29
2.1.4 O sêmen de <i>Saimiri sp.</i>	31
2.2 SISTEMAS DE ACASALAMENTO, SELEÇÃO SEXUAL E COÁGULO SEMINAL	33
2.3 COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN EM PRIMATAS NÃO HUMANOS	35
2.3.1 Métodos de contenção física e condicionamento	37
2.3.2 Dissolução do coágulo seminal	39
2.3.3 Avaliação do sêmen	41
2.3.3.1 Testes físicos	42
2.3.3.2 Avaliação morfológica	42
2.3.3.3 Testes funcionais	43
2.4 DOSAGEM DE CORTISOL COMO FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO DO ESTRESSE	45
3 OBJETIVOS	48
4 MATERIAL E MÉTODO	49
4.1 ANIMAIS	49
4.1.1 Condições experimentais de alojamento e manejo	51
4.1.2 Adaptação e condicionamento	54
4.2 CONTENÇÃO, COLHEITA E AVALIAÇÃO SEMINAL	55
4.2.1 Contenção e colheita de sêmen	56

4.2.2 **Avaliação do sêmen** 60

4.2.2.1 Teste da tripsina 60

4.3 COLHEITA DE SANGUE E DOSAGEM DE CORTISOL SÉRICO 64

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 66

5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 67

5.1 ANIMAIS E CONDICIONAMENTO 67

5.2 AVALIAÇÃO DO SÊMEN..... 75

5.3 DOSAGENS HORMONAIS..... 87

6 **CONCLUSÕES**..... 92

REFERÊNCIAS 93

APÊNDICES 107

1 INTRODUÇÃO

Os primatas neotropicais despertam grande interesse em diversas áreas do conhecimento, tais como neurociência, comportamento, imunologia, virologia, bioquímica, biologia molecular, genética, parasitologia, medicina tropical (TORRES et al., 2010) e reprodução (HEWITSON, 2004). O considerável crescimento nas pesquisas com esses primatas, observado nas últimas quatro décadas, pode ser atribuído à disponibilidade das espécies, ao tamanho de pequeno e médio porte, à adaptabilidade às condições de cativeiro, ao bom desempenho reprodutivo e à facilidade de manejo (TORRES et al., 2010).

O Brasil possui mais de 90 espécies identificadas de primatas, o que lhe confere a posição de país com a maior diversidade do mundo. No entanto, a crescente pressão antrópica sobre as populações selvagens provoca uma drástica diminuição e, muitas vezes, a extinção de espécies, antes mesmo de serem conhecidas (RYLANDS et al., 2000).

Nesse contexto, o melhor conhecimento da fisiologia reprodutiva de determinada espécie pode auxiliar programas de conservação a desenvolverem tecnologias de reprodução assistida para criação em cativeiro de espécies ameaçadas (ESTRADA; GARBER; 2009; WOLF, 2009).

O gênero *Saimiri* ou macaco de cheiro é um dos gêneros mais conhecidos dentre os primatas neotropicais, devido ao seu extensivo uso em cativeiro

Das cinco espécies do gênero, duas são consideradas vulneráveis (*S. oestедii* e *S. vanzolinii*) e uma corre risco de extinção (*S. ustus*). *S. sciureus* e *S. boliviensis* não estão ameaçadas; porém, como ocorre com a maioria dos primatas não humanos, as populações em vida livre de todas as espécies do gênero encontram-se em declínio (IUCN, 2009).

Em estudos reprodutivos, o gênero *Saimiri* foi utilizado como modelo para estudo da sazonalidade e efeito do deslocamento entre hemisférios sobre a reprodução, testes de protocolos de indução da ovulação na mulher e, principalmente, em estudos sobre fertilização *in vitro* (DUKELOW, 1983). Atualmente é modelo para estudos sobre a bioquímica do trabalho de parto e prolapso dos órgãos pélvicos (ABEE, 2000).

Apesar de amplamente utilizados nas pesquisas, a fisiologia reprodutiva de *Saimiri* ainda é pouco conhecida, o que implica na redução do desempenho reprodutivo em cativeiro. Sabe-se que nas fêmeas o ciclo reprodutivo apresenta uma sazonalidade marcante, cujos fatores determinantes ainda não são totalmente conhecidos e parecem envolver uma complexa relação entre fatores socioambientais. Apesar de apresentarem uma taxa de concepção razoável em cativeiro, são muito suscetíveis ao estresse e apresentam altas taxas de aborto e morte neonatal. Possuem um ciclo ovariano extremamente curto, sem presença de menstruação, de difícil monitoramento por citologia vaginal ou observações comportamentais.

Os métodos de colheita e avaliação do sêmen de *Saimiri* ainda não foram padronizados de forma a reproduzi-los em diferentes centros de criação. O sêmen forma um firme coágulo imediatamente após a ejaculação e até o momento, nenhum método foi capaz de dissolvê-lo totalmente.

Em conjunto, esses fatores dificultam o manejo reprodutivo e o emprego das técnicas de reprodução assistida (ARTs em inglês – *Assisted Reproductive Technologies*), tais como inseminação artificial, fertilização *in vitro*, transferência de embriões, criopreservação de gametas e embriões.

O estudo mais detalhado dessas questões permitirá adequar o manejo e estabelecer colônias autossustentáveis, de forma a evitar a retirada desses animais de seu *habitat* natural. A criação e a reprodução em cativeiro, quando bem planejadas e monitoradas, ainda permitem um melhor controle genético, reprodutivo e sanitário da colônia, de forma a garantir maior qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos nas pesquisas.

No Brasil, há duas colônias de *S. sciureus* disponíveis para pesquisa, uma no Centro Nacional de Primatas (CENP), Instituto Evandro Chagas (IEC), em Ananindeua/PA e outra no Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro/ RJ. Ambas as instituições pertencem ao Ministério da Saúde (MS).

A colônia de *S. sciureus* do Cecal possui cerca de 300 indivíduos, destinados à pesquisa biomédica. O Centro possui, ainda, cerca de 80 *S. ustus*. Na colônia de *S. sciureus*, a taxa de prenhez (número de fêmeas prenhes sobre o número total de fêmeas em idade reprodutiva) é de aproximadamente 50%, enquanto a

produtividade (número de filhotes desmamados sobre o número total de fêmeas em idade reprodutiva) não ultrapassa 30%.

Dessa maneira, o refinamento do manejo diário, com o investimento em programas de treinamento e condicionamento dos animais, poderá contribuir para a redução dos níveis de estresse (PRESCOTT; BOWELL; BUCHANAN-SMITH; 2005) e melhorar o desempenho reprodutivo da colônia (DUKELOW, 1983). Estudos sobre a fisiologia reprodutiva de machos, particularmente da colheita e avaliação do sêmen, permitirão acessar o potencial reprodutivo de determinado animal e, futuramente, aplicar as ARTs.

Assim, a proposta deste estudo foi avaliar o condicionamento de *S. sciureus* ao método de colheita de sêmen por vibroestimulação peniana com o auxílio de observações comportamentais, bem como as consequências do uso deste método como potencial agente estressor, por meio da dosagem de cortisol sérico. Objetivou-se ainda analisar o sêmen dos animais estudados por meio de testes físicos e morfofuncionais, com e sem a utilização de enzima proteolítica para a dissolução do coágulo seminal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os primatas humanos e não humanos apresentam sistemas reprodutivos complexos, com grande variedade interespecíes e interindividuais, quanto aos aspectos anatômicos, fisiológicos e comportamentais.

Dentre as várias espécies, as do gênero *Saimiri* apresentam biologia reprodutiva peculiar que, por um lado responsável, é pelas dificuldades encontradas na criação em cativeiro, por outro estimula a curiosidade e investigação científica.

2.1 O GÊNERO *Saimiri*

O gênero *Saimiri* é popularmente conhecido no Brasil como macaco de cheiro ou mão de ouro (AURICCHIO, 1995). Os macacos de cheiro possuem tamanho reduzido e pelagem de coloração acinzentada a esverdeada com variação de tons de preto a amarelo-alaranjado de acordo com a espécie (GROVES, 2005). Assim, lembram um esquilo, sendo conhecidos, por isso, como *mono ardilla*, em espanhol e *squirrel monkey*, em inglês, ambos significando macaco esquilo, na tradução para o português. A face é caracteristicamente branca com focinho preto, daí seu nome em alemão *Totenkopffaffen*, ou macaco da cabeça de morto em português (GROVES, 2005).

Os primeiros estudos sobre o gênero foram realizados por volta de 1930 e focaram aspectos comportamentais (DUKELOW, 1983). Somente nas décadas de 60, 70 e até meados dos anos 80, as espécies do gênero, principalmente *S. sciureus* foram extensivamente estudadas (DUKELOW, 1983; GROVES, 2005).

Na década de 60, surgiram os primeiros relatos científicos sobre o funcionamento das áreas sensorial e motora do córtex cerebral de *Saimiri*, os quais embasaram sua utilização em estudos subsequentes (DUKELOW, 1983). O surgimento desses estudos coincidiu com o advento das pesquisas aeroespaciais e, como apresentaram grande tolerância para forças gravitacionais, foram recomendados para esse tipo de pesquisa (BEISCHER, 1968; DUKELOW, 1983).

Desde então, seu uso cresceu rapidamente, devido à disponibilidade de indivíduos na natureza, à facilidade de contenção e manipulação e à variedade de indicações de uso, desde doenças infecciosas, não infecciosas e pesquisas reprodutivas, até pesquisa espacial (DUKELOW, 1983; 1985; KALTER, 1985).

Assim, foram utilizados em pesquisas sobre termorregulação (ADAIR, 1985); doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, hipertensão e necrose do miocárdio (STRICKLAND; CLARKSON, 1985), colelitíase (STRICKLAND; CLARKSON, 1985), farmacologia (HANSON, 1968) e farmacologia comportamental (BARRETT, 1985), doença Creutzfeldt-Jakob e enfisema (ABEE, 2000).

São primatas neotropicais, originários da América Latina, com maior prevalência na América Central do lado do Pacífico e região Amazônica (DUKELOW, 1983; GOODALL; MITTERMEIER, 1999). Das cinco espécies do gênero, apenas uma não ocorre no Brasil (*S. oerstedii*).

Os macacos de cheiro são classificados em (GROVES, 2005):

Classe Mammalian

Ordem Primates

Subordem Haplorrhini

Infraordem Simiiformes

Platyrrhini

Família Cebidae

Subfamília Cebinae

Gênero *Saimiri* (VOIGT, 1831)

Existe uma grande discordância quanto a taxonomia do gênero *Saimiri*. Alguns autores consideram o gênero como contendo uma só espécie, *Saimiri sciureus* e várias subespécies definidas por características fenotípicas como cor da pelagem, formato da cabeça e das orelhas, formato dos arcos periorbitais (COSTELLO et al., 1993). Outros autores consideram a existência de mais espécies, o número delas variando de autor para autor. Para alguns existiriam duas: *S. sciureus* e *S. oerstedii*, a primeira amplamente distribuída pela América do Sul e a segunda restrita à América Central (GARRAUD, 1993). Outros consideram a existência de mais espécies, como *S. ustus* e *S. boliviensis*, além de quatro subespécies de *S. sciureus*: *S. s. sciureus*, *S. s. macrodon*, *S. s. albigena* e *S. s.*

cassiquiarensis, duas subespécies de *S. boliviensis*: *S. b. boliviensis* e *S. b. peruviansis* e duas subespécies de *S. oerstedii*: *S. o. oerstedii* e *S. o. citrinellus* (HERSHKOWITZ, 1984). Em 1985, foi descrita a espécie *S. vanzolini* (AYRES; VANZOLINI, 1985).

Devido a essa variedade de interpretações e falta de consenso entre taxonomistas, nos trabalhos científicos é comum a descrição da origem geográfica acompanhando o nome da espécie estudada.

Em um programa de reprodução de *Saimiri* em cativeiro, é importante distinguir as espécies e subespécies e um dos métodos mais acurados é pelo cariótipo. Esta identificação vai assegurar acasalamentos apropriados a fim de evitar a produção de inversões heterozigotas, que podem reduzir a eficiência reprodutiva. Também é aconselhável cariotipar os animais com a finalidade de pesquisa, uma vez que as características fisiológicas e susceptibilidade à indução experimental de doenças varia entre espécies e subespécies (comunicação pessoal)¹.

Embora o número diplóide de 44 cromossomos seja constante em todos os *Saimiri*, inversões pericêntricas têm ocorrido entre populações de diferentes áreas geográficas (JONES; MA, 1975; HERSHKOVITZ, 1984). *Saimiri sciureus sciureus* (guianês) é endêmico da Guiana e nordeste do Brasil, e tem sete pares de cromossomos acrocêntricos, incluindo os cromossomos 15 e 16; este cariótipo é considerado como a forma ancestral (DUTRILLAUX; COUTURIER, 1981). *Saimiri boliviensis boliviensis* (boliviano) ocorre no sudoeste do Brasil, Bolívia e sudeste do Peru e tem seis pares de cromossomos acrocêntricos, sendo o par nº 15 submetacêntrico devido a uma inversão pericêntrica. *Saimiri boliviensis peruviansis* (peruano) ocorre na bacia do Rio Ucayali-Huallaga no Peru e tem cinco pares de cromossomos acrocêntricos, sendo os pares 15 e 16 submetacêntricos. Animais híbridos têm sido descritos com pares heteromórficos de cromossomos (JONES et al., 1973; MA et al., 1974; LAU; ARRIGHI, 1976; LAU et al., 1977, FOGEL, 1984). *Saimiri ustus* é espécie endêmica do Brasil, com cinco pares de cromossomos acrocêntricos assim como a espécie *S. vanzolini* descrita por Ayres e Vanzolini (1985) com seis pares de cromossomos acrocêntricos.

¹ Informação fornecida por Beatriz B. Goldschmidt em 2011.

Todas as espécies possuem uma coloração preta ao redor da boca e máscaras de pêlo branco ao redor dos olhos, formando um arco cujo padrão as divide em dois grupos (GROVES, 2005; INGBERMANN; STONE; CHEIDA, 2008):

- Grupo “gótico”: caracterizado por conter máscara facial branca formando um arco alto acima dos olhos e um espesso tufo de pelos na cauda.
- Grupo “romano”: possui faixa estreita de coloração branca sobre a sombrancelha e não possui tufo de pelos.

O quadro 1 apresenta a distribuição, habitat e principais características morfológicas das espécies do gênero, segundo classificações taxonômicas mais recentes (RYLANDS et al., 2000; GROVES, 2005; INGBERMANN; STONE; CHEIDA, 2008; PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010).

A maioria dos estudos descritos na literatura refere-se a *S. sciureus* e *S. boliviensis* provavelmente por serem mais abundantes tanto em cativeiro quanto em vida livre.

Saimiri são primatas diurnos e arborícolas (DUKELOW, 1983) ágeis e ativos (INGBERMANN; STONE; CHEIDA, 2008). Apresentam postura quadrúpede e passam a maior parte do tempo forrageando e se alimentando (AUSMAN; GALLINA; NICOLSI, 1985). As interações sociais representam apenas cerca de 5% das atividades diárias (THOISY et al., 2002). Sua dieta é insetívora-frugívora, quando disponíveis, preferem insetos a vegetais (BALDWIN, 1985). Os itens ingeridos podem variar sazonalmente e incluem também pequenos vertebrados, néctar, gomos, castanhas, sementes e ovos de pássaros (THORINGTON, 1968; BALDWIN; BALDWIN, 1981). A maior parte da água ingerida provém dos frutos que ingerem ou empastada nos vegetais e apenas ocasionalmente descem ao chão (BALDWIN, 1985).

Como as outras espécies de primatas platirrinos e catarrinos estudadas, *Saimiri* possui visão colorida, porém diferente da forma tricromática normal observada no homem. Há uma significativa variação interanimal na sensibilidade visual e visão de cores, com pelo menos cinco diferentes fenótipos de visão colorida. A implicação dessa característica para o comportamento da espécie em ambiente natural se existe, ainda é desconhecida (JACOBS, 1985).

Espécie	Distribuição	Habitat	Características morfológicas
<i>S. sciureus</i> (LINNAEUS, 1758)	Norte da Bacia Amazônica, abrangendo a Guiana e Guiana Francesa, Suriname e norte do Brasil.	Florestas primárias e secundárias. Muitas vezes preferem habitats alterados, com maior quantidade de artrópodes.	Arco “gótico” e tufo de pelos nas orelhas. Pelos curtos e espessos, topo da cabeça marrom-acinzentado, mãos, pés e antebraços amarelos ou alaranjados. Região ventral do tórax branca ou branco-amarelado.
<i>S. ustus</i> (I. GEOFFROY, 1843)	Sul da bacia amazônica, entre os rios Purus e Tapajós.	Áreas de terra firme, várzea e igapó, com maior densidade populacional em áreas de várzea.	Arco “gótico”, não possuem pelos nas orelhas. Coxas acinzentadas e tamanho corporal maior do que <i>S. sciureus</i> .
<i>S. oerstedii</i> (REINHARDT, 1872)	Áreas isoladas da Costa Rica e Panamá.		Arco “gótico”, possuem tufo de pelos nas orelhas. Corpo de coloração avermelhada ou laranja-avermelhada e cabeça geralmente preta ou rajada.
<i>S. boliviensis</i> (GEOFFROY; de BLAINVILLE, 1834)	Porção oeste da bacia amazônica, no Brasil, Peru, Colômbia e Venezuela.	Áreas de terra firme, várzea e igapó, com maior densidade populacional nas áreas de várzea.	Arco “romano”, corpo de coloração verde rajada de preto. Cabeça com pelagem preta ou com borda preta. Superfície dorsal da cauda preta.
<i>S. vanzolini</i> (AYRES, 1935)	Restrita à bacia amazônica, na desembocadura do Rio Japurá.	Áreas de várzea sazonalmente alagadas.	Arco “romano” e superfície dorsal do corpo preta.

Quadro 1 – Caracterização e distribuição das cinco espécies descritas de micos de cheiro, gênero *Saimiri*

Vivem em grupos sociais com vários machos e fêmeas (GOODALL; MITTERMEIER, 1999). O tamanho do grupo pode variar de dezenas a centenas de

indivíduos (BALDWIN; BALDWIN, 1981) e a densidade populacional varia de 8 a 528 animais por km² (BALDWIN, 1985).

A composição do grupo varia constantemente ao longo do dia, com formação de subgrupos, os quais novamente se juntam no local de dormir (DuMOND, 1968; THORINGTON, 1968). Um grupo típico contém 20% de filhotes e infantis (até 10 meses de idade), 32% de juvenis (11 a 30 meses), 29% de fêmeas adultas (acima de 2,5 anos), 13% de machos subadultos (2 a 3 anos) e 6% de machos adultos (acima de 3 anos) (BALDWIN, 1985). Entre os machos a hierarquia social é marcante, enquanto nas fêmeas é observada apenas em situações estressantes (DUKELOW, 1983).

A maturidade sexual ocorre aos 2,5 a 3,5 anos para as fêmeas e 3,5 a 5 anos para os machos (DUKELOW, 1983; BALDWIN, 1985). A idade de entrada na puberdade está intimamente relacionada ao peso da fêmea assim como a duração da primeira fase de elevação dos níveis de testosterona nos machos (COE; SMITH; LEVINE, 1985). O ciclo ovariano é bem curto quando comparado a outras espécies de primatas, com duração em torno de sete a 12 dias, a maioria entre oito a 10 dias (DUKELOW, 1983; 1985). Não se observa ocorrência de menstruação e a citologia vaginal, apesar de bastante empregada, não é considerada, como em outras espécies de animais de laboratório, um bom indicador para a fase do ciclo (DUKELOW, 1983; 1985). A gestação dura, em média, 150 dias (137 a 175 dias), ao final da qual nasce um único filhote relativamente grande, com proporção de peso em relação à mãe de 1:7 (92 a 129 g) (DUKELOW, 1983). A longevidade conhecida é acima de 20 anos (MENDOZA, 1999), mas estima-se que possa chegar a 30 anos (WILLIMS, 2008).

As espécies do gênero são marcadamente sazonais, com estações reprodutivas bem definidas (TAUB; ADAMS; AUERBACH, 1978; BALDWIN; BALDWIN, 1981). Em *S. oerstedii* em ambiente natural, por exemplo, a maioria dos nascimentos ocorre sincronizada em uma semana, a qual pode ter lugar de fevereiro a início de abril e os acasalamentos ocorrem de agosto a início de outubro.

Os fatores que influenciam a sazonalidade reprodutiva ainda não são totalmente conhecidos. Uma complexa interação entre fatores socioambientais e fisiológicos modula o grau de sazonalidade e está relacionada ao início ou retardamento da estação reprodutiva (COE; ROSENBLUM, 1978).

Como a maioria das populações de *Saimiri* vive em ambientes com pouca variação no fotoperíodo ao longo do ano (apenas 11 minutos na região amazônica) (DUKELOW, 1983) e as chuvas são frequentes, o ciclo reprodutivo comumente é relacionado ao nível de precipitação e disponibilidade de alimento (DuMOND, 1968; BALDWIN; BALDWIN, 1981). Na região amazônica, os acasalamentos ocorrem entre junho e setembro (estação seca) enquanto que o terço final da gestação, parto e lactação correspondem à estação mais chuvosa, entre dezembro e fevereiro (DUKELOW, 1983).

No entanto, sabe-se que o sinalizador ambiental mais confiável para que o organismo tome as providências e se antecipe a uma dada situação desfavorável, é o fotoperíodo (ROSEMBLUM, 1968). O mesmo autor afirmou que em *Saimiri*, o início da estação reprodutiva está relacionado à diminuição do fotoperíodo.

A influência desse sinalizador ambiental foi evidente quando micos de cheiro foram transportados da América do Sul para a América do Norte (Flórida/ EUA) e as fêmeas retomaram a atividade cíclica ovariana e cópulas nos dias mais curtos do ano (dezembro a abril) (COE; SMITH; LEVINE, 1985). O mesmo fenômeno foi observado quando animais procedentes de Iquitos/ Peru foram transferidos também para a Flórida/ EUA, em condições de semicativeiro (DuMOND; HUTCHINSON, 1967). A estação de partos passou de fevereiro e março (inverno na Flórida) para junho a agosto (verão), em três anos. Numa comparação do efeito da temperatura, fotoperíodo e precipitação sobre a sazonalidade reprodutiva de *Saimiri* observou-se maior influência da temperatura e fotoperíodo para animais mantidos em cativeiro ou semicativeiro nos EUA (TREVINO, 2007).

A constituição do grupo tem forte influência na dinâmica reprodutiva de macacos de cheiro (THORINGTON, 1968; MENDOZA, 1999, SCHIML et al., 1999) e alterações anuais na estrutura do grupo estão associadas às fases reprodutivas (COE; ROSEMBLUM, 1978; SCHIML et al., 1999). Na maior parte do ano os macacos de cheiro preferem associar-se em subgrupos com indivíduos do mesmo gênero e faixa etária (THORINGTON, 1968; BALDWIN, 1985).

As fêmeas assumem uma posição central e a dinâmica do grupo é definida pelo seu grau de afinidade com cada subgrupo que, por sua vez, é influenciado pela fase do ciclo reprodutivo (BALDWIN, 1985). Na maior parte do tempo permanecem com outras fêmeas adultas e subadultas ou com os filhotes durante os meses de parto e lactação. Os machos adultos permanecem periféricamente, sendo aceitos

apenas na estação reprodutiva (DUKELOW, 1983). Apesar de se manterem relativamente isolados na maior parte do tempo, com frequência apresentam determinados comportamentos sexuais durante todo o ano, como ereção e tentativa de cópula (LATTA; HOPF; PLOOG, 1967). Porém, essas tentativas são repelidas ativamente pelas fêmeas, que aceitam a cópula apenas na estação de acasalamentos (WILSON, 1977).

As condições de cativeiro podem minimizar o impacto das mudanças climáticas e dos fatores nutricionais sobre a reprodução, podendo prolongar a estação reprodutiva de determinada espécie (DURRANT, 1998). *S. sciureus* mantiveram a sazonalidade reprodutiva quando transferidos para o cativeiro, porém a estação de parição passou de três meses como relatado para as populações selvagens na América do Sul (DUKELOW, 1983) para seis meses após cinco anos de estudo na Carolina do Norte/ EUA (TAUB; ADAMS; AUERBACH, 1978). No Centro de Criação de Animais de Laboratório, Rio de Janeiro/ Brasil, os partos ocorrem ao longo de sete meses, de setembro e março (KUGELMEIER; VALLE; MONTEIRO, 2010).

Pouco antes e durante a estação reprodutiva ocorrem mudanças morfológicas, comportamentais e fisiológicas, tanto nos machos quanto nas fêmeas (CHEN et al., 1981; MENDOZA, 1999; SCHIML et al., 1999; MOORMAN et al., 2002).

Quanto às modificações morfológicas, o fenômeno de ganho de peso ou 'fatting' é mais pronunciado nos machos (MENDOZA et al., 1978; MENDOZA, 1999). Esse fenômeno inicia-se dois a três meses antes do início das cópulas e o ganho é de 85 a 300 g do peso corporal, dependendo da espécie e porte do animal (DuMOND, 1968; BALDWIN, 1985). O ganho ocorre principalmente no subcutâneo do tórax, ombros e braços, conferindo-lhes uma aparência de animais gordos (BALDWIN, 1985).

Na estação de acasalamento os machos tornam-se mais ativos, reativos e irascíveis. Ocorre aumento da frequência de displays genitais e brigas entre os machos e as relações de dominância tornam-se mais conspícuas (BALDWIN, 1985).

Segundo Newman (1985), o 'display' genital é uma das formas mais importantes de comunicação em *Saimiri* e consiste na abertura de uma ou ambas as coxas e exposição da genitália. Essa forma de comunicação é utilizada tanto por machos quanto por fêmeas, porém é mais comum entre os machos. O 'display'

genital é exibido em padrão sazonal com a maior frequência durante a estação de acasalamento. A função desse comportamento é discutível, mas em geral é uma tentativa de aproximação, quando direcionado para as fêmeas ou uma confirmação de dominância, quando direcionado para outro macho.

A investigação olfatória da região anogenital das fêmeas também aumenta durante a estação de cópulas e auxilia os machos na detecção das fêmeas em estro. As fêmeas, por sua vez, esfregam sua genitália com maior frequência em troncos e galhos nessa época (NEWMAN, 1985).

Após a estação de acasalamento os machos perdem a sua condição de “*fattening*”, tornam-se menos sociais, diminuem o interesse pelas fêmeas, param de se aproximar e assumem a posição mais periférica do grupo (BALDWIN, 1985).

2.1.1 Endocrinologia reprodutiva e do estresse nos machos

Além do estímulo das fêmeas, acredita-se que as modificações sazonais nos machos sejam andrógeno dependente, com ativação anual do eixo hipotálamo hipófise gonadas (WIEBE et al., 1988). Os mesmos autores afirmaram que o pico na secreção de testosterona coincide com a fase em que as fêmeas retomam a atividade ovariana e a redução dos níveis desse hormônio acarreta declínio na frequência de cópulas e de ejaculações. Além do aumento da testosterona, ocorre aumento da androstenediona antes e no início da estação de acasalamentos *S. boliviensis*. O aumento observado na androstenediona estaria relacionado ao ganho de peso e ao ‘*fattening*’ observados na estação reprodutiva.

A androstenediona tem origem predominantemente adrenal e sugere uma ativação também do eixo hipotálamo hipófise adrenal (WIEBE et al., 1988). Além dos esteróides sexuais, os níveis de cortisol também se elevam antes da estação reprodutiva (SCHIML et al., 1999).

Durante o ganho de peso, tanto a testosterona quanto o cortisol elevam-se. Ao comparar os animais da Bolívia, que são maiores, os valores principalmente de testosterona foram maiores do que os dos animais da Guiania (400 a 500 ng/ mL vs 100 a 150 ng/ mL, respectivamente) (COE; SMITH; LEVINE, 1985).

Os autores mantiveram machos com contato visual e olfatório com fêmeas durante estudo sobre ritmo diário de secreção de testosterona dentro (noites longas) e fora da estação de acasalamento (noites curtas). Nesse estudo colheram sangue dos animais seis vezes por dia (a cada 4 horas), com intervalo de uma semana durante um mês. Não informam se os animais foram condicionados ou não a manipulação para colheita do sangue. Encontraram diferença nos níveis hormonais entre os dois momentos, bem como no padrão de secreção diário. Nos dois momentos os níveis de testosterona foram maiores durante a noite do que durante o dia, mas fora da estação de acasalamento os níveis, além de mais baixos, diminuíram durante o dia, enquanto que no acasalamento permaneceram elevados durante todo o dia. Nesse estudo também relacionaram o *status* social dos machos aos níveis de testosterona e verificaram que os machos dominantes apresentaram picos hormonais consideravelmente mais altos entre 0:00 e 4:00 horas na estação de acasalamento. O mesmo não ocorreu fora dela. Esse padrão de variação também ocorreu para os níveis de cortisol.

Em *Saimiri*, as concentrações de hormônios esteroides são de 10 a 50 vezes mais elevadas do que as observadas na espécie humana, com grande variabilidade nos níveis basais, inclusive durante um mesmo dia (COE; SMITH; LEVINE, 1985). Para esses autores os hormônios peptídeos apresentaram níveis dentro da faixa de valores encontrada para outras espécies. Assim, a diferença observada na dinâmica do sistema endócrino de *Saimiri* parece ser periférica, ocorrendo no próprio órgão e não devido a maior atividade hipotalâmica ou hipofisária.

A maioria dos primatas do Novo Mundo apresenta níveis extremamente elevados de esteroides sexuais e adrenais (COE; SAVAGE; BROMLEY, 1992), enquanto que o perfil endocrinológico dos primatas do Velho Mundo se assemelha mais com o da espécie humana (COE; SMITH; LEVINE, 1985). Investigações sobre o metabolismo do cortisol, utilizando técnicas de biologia molecular, demonstraram não haver diferenças estruturais ou funcionais nos receptores de corticosteroides entre o homem e primatas do Velho Mundo e as espécies do Novo Mundo (FULLER; SMITH; ROGERSON, 2004; SCAMMELL et al., 2006). A diferença consiste em mudanças na conformação das proteínas envolvidas no sítio de ligação do hormônio ao receptor (*'heat shock protein 90 (hsp90) complex'*), responsáveis pela diminuição da afinidade do receptor ao cortisol (FULLER; SMITH; ROGERSON, 2004).

De fato, em *Saimiri* a taxa de ligação do cortisol às proteínas plasmáticas do sangue é relativamente baixa, aproximadamente 40% nos níveis fisiológicos

A manutenção de níveis hormonais elevados em *Saimiri* deve ter uma importância adaptativa, porém sua real função ainda é desconhecida. O custo biológico dessa condição pode ser elevado, devido seus efeitos nas funções digestiva, cardiovascular, renal e imunológica (COE; SMITH; LEVINE, 1985). São extremamente susceptíveis a doenças relacionados ao estresse como aterosclerose e aortites (COE; SMITH; LEVINE, 1985), ambas desenvolvidas tanto em populações cativas quanto selvagens (STRICKLAND; CLARKSON, 1985).

2.1.2 Manutenção em cativeiro

Em cativeiro, as condições de criação dos animais devem seguir as normas preconizadas pelas instituições que regulamentam a manutenção e criação de primatas de laboratório, tais como o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 1996; 2003), o *International Primatological Society* (IPS, 2001), a *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International* (AAALAC) e as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) locais.

A proporção de machos para fêmeas pode ser de 1:10 em recintos maiores ou 1:3 em alojamentos menores (DUKELOW, 1983; HENDRICKX; DUKELOW, 1995). Sempre que possível, deve-se evitar alojar os animais individualmente, exceto em casos estritamente necessários para o delineamento experimental (DUKELOW, 1983; IPS, 2001).

Os animais podem ser mantidos com ração comercial com 24 a 25% de proteína e 6 a 7% de gordura (DUKELOW, 1983). Segundo o autor, altas taxas de aborto podem ser causadas por dietas com níveis baixos de proteína. Além disso, o alimento deve ser ofertado pelo menos duas vezes ao dia e quanto mais vezes melhor, de forma a evitar desperdício e reduzir o estresse.

O sistema de oferta de água pode ser por mamadeiras individuais ou sistemas automáticos. Um animal adulto sadio deve beber de 50 a 100 mL de água por dia (DUKELOW, 1983).

Saimiri são arbóreos e não possuem calosidades isquiáticas, por isso podem desenvolver ferimentos, caso o recinto não possua poleiros e piso adequados (ABEE, 1985). A altura do recinto é muito importante, recomenda-se um mínimo de 51 cm de altura e 0,15 m² de área por animal (NRC, 1996). Os poleiros e plataformas devem ser instalados em altura que permita ficarem com a cauda pendente, sem tocar o piso (DUKELOW, 1983).

Saimiri não toleram temperaturas baixas e os animais alojados individualmente tendem a sofrer mais com a perda de calor. A faixa de temperatura ideal para esses animais fica em torno de 21 a 27° C (DUKELOW, 1983; ABEE, 1985). A utilização de poleiros e plataformas confeccionados de material que não o metal é importante para auxiliar na manutenção do calor (ABEE, 1985). A umidade relativa do ar deve ser mantida entre 40 a 60% e o sistema de ventilação e ar condicionado deve permitir 10 a 15 trocas de ar por hora (DUKELOW, 1983; ABEE, 1985). A utilização de sistemas com pressão negativa auxilia na contenção do odor e a sala de criação deve ser isolada das outras áreas de trabalho (ABEE, 1985).

Os recintos devem ser higienizados diariamente, com água quente ou sob pressão e a utilização de detergente é variável (ABEE, 1985).

2.1.3 A espécie *Saimiri sciureus*

S. sciureus é a espécie mais amplamente distribuída nas florestas tropicais da América do Sul (GROVES, 2005). Vivem em florestas primárias e secundárias e muitas vezes preferem habitats alterados, onde a quantidade de artrópodes frequentemente é mais alta (INGBERMANN; STONE; CHEIDA, 2008). As áreas de vida de *S. sciureus* estão em torno de 100 a 300 ha e as distâncias percorridas por dia podem ser de 2 a 3 km. Tornam-se altamente insetívoros durante a estação seca, quando os frutos maduros não estão disponíveis (STONE, 2007). Apesar de serem arborícolas, frequentemente utilizam os níveis inferiores do dossel das florestas, podendo descer ao chão a procura de ortópteros grandes e água (INGBERMANN; STONE; CHEIDA, 2008).

A espécie é considerada, junto com o *Aotus sp.* (macaco da noite), o modelo ideal para pesquisa sobre malária e desenvolvimento de vacinas contra a doença,

por apresentar os mesmos sintomas homem quando acometido por essa doença, mesmo não sendo hospedeiros naturais do parasita (OMS).

Em cativeiro, os machos pesam em média 851 ± 119 g (660 – 1100 g) (Figura 1) e as fêmeas 670 ± 71 g (560 – 800 g) (ANDRADE et al., 2004).

Figura 1- Exemplar de *Saimiri sciureus* macho exibindo o fenômeno de “fatting”.
- Rio de Janeiro - 2010

Em ambiente natural os machos começam a reproduzir aos 4,5 anos de idade e as fêmeas aos três anos (ROBINSON; JANSON, 1987). No Cecal, Rio de Janeiro, as fêmeas parem seu primeiro filhote em média ao redor de 74 meses, ou aproximadamente seis anos (KUGELMEIER; VALLE; MONTEIRO, 2010), mínimo três anos.

Quanto aos aspectos anatômicos do aparelho reprodutor masculino, o escroto é grande, semipenduloso e assimétrico, localizado posteriormente ao pênis. O pênis é cilíndrico, medindo 35 mm de comprimento, encoberto por prepúcio retrátil e possui osso peniano e algumas espículas queratinizadas vestigiais laterais ao corpo do pênis. Na parte interna da bolsa escrotal, o testículo e o epidídimo juntos formam uma massa relativamente pequena e globular. Na borda ventral do testículo podem ser observadas veias helicoidais e proeminentes. As vesículas seminais são tubulares e não ramificadas. A próstata localiza-se na parte proximal da uretra, imediatamente distal à bexiga (HILL, 1960). Os diâmetros testiculares longitudinais

foram $15,47 \pm 2,11$ mm para o esquerdo e $15,03 \pm 2,13$ mm para o direito. Os diâmetros transversais foram $10,06 \pm 0,92$ e $9,95 \pm 1,51$ para os testículos esquerdo e direito, respectivamente (LAVERDE-CORREA; ROBLES-MEDINA, 2001).

2.1.4 O sêmen de *Saimiri* sp.

As tabelas 1 e 2 demonstram algumas características do sêmen de *S. sciureus* e *S. boliviensis*.

Ackerman e Roussel (1968) obtiveram ejaculados com $36,75 \pm 18,99$ % (média $\pm$ DP) de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (células eosina negativas) e $45,25 \pm 6,18$ % de espermatozóides anormais. Quanto aos aspectos bioquímicos, as concentrações de ácido láctico, ácido cítrico e frutose no plasma seminal foram, respectivamente, 151,2, $48,36 \pm 13,6$ e $110,4 \pm 129$ mg/ 100 mL de sêmen.

Lang (1968) obteve um volume médio de ejaculado de 100 μ L por meio de eletroejaculação. A contagem de espermatozóides foi de $295 \pm 13 \times 10^3$ e a porcentagem de espermatozoides vivos foi de $79 \pm 2\%$.

A cabeça é estreita e observa-se um intumescimento apical ou crista e a margem posterior do acrossomo tem aparência serrilhada. A peça intermediária insere-se de forma atípica na porção posterior da cabeça. As mitocôndrias são finas no corte transversal e faz múltiplas voltas ao redor da peça intermediária; são aproximadamente 53 giros. A mitocôndria e peça intermediária arranjam-se regularmente (DUKELOW, 1983).

Os primeiros ensaios para criopreservação do sêmen de *S. sciureus* foram realizados com o emprego de diluente contendo 20% de gema de ovo, 11% de lactose e 4% de glicerol. O tempo de equilíbrio do glicerol foi de 45 minutos. A porcentagem de espermatozóides móveis após o descongelamento ($52,8 \pm 20$ %) foi comparável com os valores observados no sêmen a fresco ($65,85 \pm 15,35$ %) (Denis et al., 1976).

Tabela 1 - Características seminais de *Saimiri* sp.

Espécie	Volume (μL) ou peso (g)	Concentração (x 10 ⁶ spz/ mL)	Motilidade (%)	Dissolução coágulo	Referência
<i>S. sciureus</i>	---	153 ± 96,73 ^{*1}	35 ± 11,8 ^{*1}	tripsina 1%	ACKERMAN; ROUSSEL, 1968
	400 ¹ μL	205,9 ¹	52 ¹		ROUSSEL;
	(200 – 1500)	(80,8 – 310,9)	(40 – 80)		AUSTIN, 1968
	160 ± 57 ¹ μL	427 ± 160 ^{*1}	65,84 ± 15,35 ^{*1}	Incubação	DENIS et al., 1976
	125 ¹ g	80 a 300 ¹	40 a 80 ¹	Incubação	DUKELOW, 1983
<i>S. boliviensis</i>	205 ± 25 ¹	4,7 ± 2,7 ¹	44,1 ± 11,4 ¹	Incubação com meio	YEOMANN et al., 1998
	436 ± 90 ²	77,1 ± 20,4 ²	80,6 ± 4,3 ²		

*Valores calculados. ¹Sêmen colhido por eletroestimulação. ²Sêmen colhido por vibroestimulação

Tabela 2 – Morfometria dos espermatozóides de *Saimiri* sp.

Espécie	Dimensões lineares do espermatozóide (μm) – média ± DP				
	Cabeça		Comprimento	Comprimento	Comprimento
	Largura	comprimento	da PI*	da cauda	total
<i>S. sciureus</i>	5,11 ± 0,02 ¹	3,51 ± 0,01 ¹	9,03 ± 0,12 ¹	55,34 ± 0,13 ¹	69,24 ± 0,15 ¹
	5,5 ± 0,3 ²	3,6 ± 0,3 ²	10, 0 ± 0,5 ²	55,1 ± 2,7 ²	70,6 ± 2,8 ²
<i>S. boliviensis</i>	5,71 ± 0,45 ³	3,76 ± 0,45 ³	12,2 ± 0,45 ³	65,68 ± 0,45 ³	71,39 ± 0,45 ³

*PI: Peça intermediária. ¹Dukelow, 1983. ²Laverde-Correa e Robles-Medina, 2001. ³Steinberg et al, 2009.

O ciclo espermático total de *S. sciureus* dura 39 dias, sendo 30,5 dias da célula primária até a espermatide e 8,5 dias até a célula madura (BARR, 1973). O tempo de capacitação espermática *in vitro* é de 4,7 ± 2,6 horas (DUKELOW, 1983). Biopsias testiculares revelaram maior atividade espermatogênica durante a estação de acasalamentos e uma acentuada regressão fora da estação (Du MOND; HUTCHINSON, 1967).

Foram observadas variações sazonais na concentração e motilidade espermáticas, porém foi possível obter sêmen com espermatozóides capazes de fertilizar um óvulo *in vitro*, ao longo de todo o ano, e a condição de “*fattening*” não foi

necessária para manutenção da capacidade de fertilização (DUKELOW, 1983), tanto *in vivo* quanto *in vitro* (DUKELOW, 1985).

Chen *et al.* (1981) também observaram a produção de espermatozoides ao longo de todo o ano. Os autores demonstraram não haver diferenças na concentração e motilidade espermática nas diferentes épocas do ano, embora tenha ocorrido aumento no volume do ejaculado, no peso corporal e nos níveis de testosterona circulante, na estação reprodutiva.

2.2 SISTEMAS DE ACASALAMENTO, SELEÇÃO SEXUAL E COÁGULO SEMINAL

Em primatas são descritos cinco sistemas de acasalamentos, sendo que três deles envolvem acasalamentos com múltiplos parceiros e dois com parceiro único (DIXSON; ANDERSON, 2001):

- **Multimachos-multifêmeas**, no qual tanto machos quanto fêmeas copulam com vários parceiros. Nesse sistema, a relação sexual é rápida, não exclusiva e gregária. Ex.: gêneros *Macaca*, *Pan*, *Saimiri*, maioria do *Papio*.
- **Disperso**, no qual machos e fêmeas também copulam com vários parceiros, porém ocorre em espécies que não vivem em grupos sociais, resultando em relação sexual rápida, não exclusiva e não gregária. Presente na maioria dos primatas noturnos como os prossímios. Ex.: *Microcebus*, *Daubentonia*, *Perodictus* e maioria dos *Galago*.
- **Poliândrico**, raro entre os primatas, uma fêmea copula com dois ou mais machos, numa relação sexual duradoura e exclusiva. Ex: *Saguinus fuscicollis*, *Mico humeralifer*.
- **Monogâmico**, no qual uma fêmea copula com um único macho, numa relação sexual exclusiva e duradoura. Não ocorre de maneira necessariamente exclusiva nas espécies em que está presente, mas é predominante. Ex: *Indri*, *Aotus*, *Callicebus*, *Symphalangus*, *Hylobates*.

- **Poligínico**, onde um macho copula com várias fêmeas em um único grupo social ou em várias subunidades dentro de um grupo maior. Nesse sistema, a relação sexual também é duradoura, mas outras fêmeas podem acasalar-se com o macho residente. Ex: *Theropithecus*, *Papio hamadryas*, *Nasalis*, *Gorilla*.

Nos sistemas em que as fêmeas acasalam-se com vários machos (multimachos-multifêmeas, disperso e poliândrico), a seleção sexual via competição espermática ocorre de maneira mais intensa do que nos sistemas em que se acasalam com único parceiro (DIXSON; ANDERSON, 2001). A competição espermática consiste na competição entre os gametas de dois ou mais machos pela fertilização de um único óvulo (PARKER, 1998² *apud* DIXSON; ANDERSON, 2001).

A pressão de seleção sexual via competição espermática promoveu o desenvolvimento de testículos maiores em relação ao peso corporal, favorecendo uma maior capacidade de produção espermática devido à maior quantidade de túbulos seminíferos, em relação ao tecido intertubular (DIXSON; ANDERSON, 2001). Essa pressão de seleção resultou ainda em machos com vesículas seminais maiores, nos sistemas com múltiplos parceiros, em relação aos machos em que a competição espermática não é tão marcante (sistemas de parceiro único). O líquido seminal, produzido pelas vesículas, contém proteínas, frutose e outros numerosos compostos bioquímicos que, ao reagirem com as enzimas prostáticas, resultam na formação do coágulo seminal, imediatamente após a ejaculação (DIXSON; ANDERSON, 2001, 2002).

O coágulo seminal está presente em todas as espécies de primatas já estudadas, inclusive no homem, porém com viscosidade e consistência bastante variáveis (DUKELOW, 1971; NAGLE; DENARI, 1983; WILDT, 1986; HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2002; VALLE, 2002). Assim, o sêmen de primatas não humanos consiste de duas frações: líquida e coagulada (WILDT, 1986).

Várias teorias foram propostas para explicar a ocorrência do coágulo seminal ou formação do ‘*plug*’ copulatório: 1) promover a sobrevivência do espermatozóide, protegendo-o do meio vaginal extremamente ácido (SETTLAGE; HENDRICKX,

² PARKER, G. A. *Sperm competition and the evolution of ejaculates: Towards a theory base*. In: BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, A. P. **Sperm competition and sexual selection**. San Diego: CA Academic Press, 1998. p.3-54

1974; DIXSON; ANDERSON, 2001, 2002); 2) auxiliar na retenção e transporte do esperma dentro do trato reprodutor feminino (SETTLAGE; HENDRICKX, 1974; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2002); 3) evitar a retroversão do ejaculado (DIXSON; ANDERSON, 2001, 2002) e 4) barreira física para evitar inseminação por outros machos (DIXSON, 1998; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2002).

2.3 COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

O sêmen de primatas não humanos pode ser colhido por diversos métodos, tais como masturbação, lavagem do canal vaginal após a cópula, uso de vagina artificial, eletroejaculação por via retal (EE), vibroestimulação peniana (VE) ou punção direta do epidídimo (DUKELOW, 1971; GOULD; MARTIN, 1986; WILDT, 1986, 1996; MORREL; HODGES, 1998; MORREL; HODGES, 2001; VALLE, 2007).

As primeiras colheitas por eletroestimulação em primatas não humanos foram realizadas em *M. mulatta* por Mastroianni e Manson (1963)³ *apud* Bennett (1967), com a utilização de corrente alternada monofásica na superfície de dois eletrodos, sendo um colocado na base do pênis e outro ventral à glândula, próximo ao *frenulum*. Em 1965, Weisbroth e Young, adaptaram o método para um estímulo via retal em várias espécies de primatas do Velho Mundo (BENNETT, 1967). E esse se tornou o método mais comumente utilizado para colheita de sêmen em primatas não humanos.

No entanto, devido ao desconforto causado pelos estímulos elétricos, torna-se necessária realizar a sedação, o que se constitui em importante fator de risco para o animal, principalmente em primatas de pequeno porte (YEOMAN et al., 1998).

Em *Saimiri* as primeiras colheitas de sêmen foram realizadas por Bennett (1967) por meio de probe retal bipolar, com 12,5 cm de comprimento x 0,6 cm de diâmetro. Em média, os ejaculados foram obtidos após 5 minutos, com estimulação de 5 a 8 volts. O peso médio dos ejaculados foi 155,69 mg e a concentração média $40,13 \times 10^6$ spz/ mL. Em seguida, Ackerman e Roussel (1968) também utilizaram a

³ MOSTROIANNI, L.; MANSON, W. A. Collection of monkey sêmen by eletroejaculation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v.112, p.1025, 1963

eletroejaculação retal para colheita de sêmen de várias espécies de primatas não humanos, incluindo *S. sciureus*.

Em 1997 e 1998, Yeoman et al. aplicaram a vibroestimulação peniana (VE) para colheita de sêmen de *S. boliviensis*. Essa técnica foi desenvolvida para homens com injúria na medula espinhal abaixo da região torácica inferior (SONKSEN; BIERING-SORENSEN; KRISTENSEN, 1994; BRACKETT; PADRON; LYNNE, 1997). Na VE um vibrador é posicionado contra o pênis e a ejaculação é induzida por uma estimulação mecânica (BRACKETT, 1999). A estimulação no homem é feita abaixo da glândula, no frênulo ou na superfície dorsal do pênis (BRACKETT, 1999; SONKSEN; OHL, 2002).

No sêmen colhido por VE há menor quantidade de coágulos quando comparado ao obtido por eletroejaculação retal (EE) e uma grande vantagem do método é não necessitar de sedação (YEOMAN et al., 1998). Por esse motivo também pode ser empregada com maior frequência no mesmo animal e o tempo total de manipulação é menor, pois não necessita indução nem recuperação anestésica (YEOMAN et al., 1997).

O sêmen colhido por VE teve maiores concentração ($77,1 \pm 20,4$ vs $2,8 \pm 1,7 \times 10^6$ spz/mL), volume (436 ± 90 vs $205 \pm 25 \mu\text{L}$), porcentagem e grau de motilidade ($80,6 \pm 4,3$ vs $44,1 \pm 11,4\%$; $3,8 \pm 0,2$ vs $2,8 \pm 0,4$, respectivamente), bem como concentração de espermatozóides móveis ($28,3 \pm 9,2$ vs $0,4 \pm 0,2 \times 10^6$ spz/ejaculado) do que o obtido por EE. Na análise bioquímica a colheita por VE também apresentou maiores concentrações de frutose ($2,88 \pm 0,67$ vs $1,22 \pm 0,32$ mg/ejaculado) e ácido cítrico ($0,46 \pm 0,14$ vs $0,24 \pm 0,04$ mg/ejaculado), indicando maior participação da vesícula seminal e próstata, respectivamente (YEOMAN et al., 1998).

A VE também é empregada com sucesso para a colheita de sêmen em *Callithrix jacchus*, outro primata neotropical de pequeno porte (KUEDERLING et al., 2000; SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004; VALLE, 2007; VALLE et al., 2008).

O sêmen deve ter boa qualidade para ser utilizado em programas de reprodução assistida e formação de banco de sêmen (MORRELL; HODGES, 1998). A qualidade do sêmen varia conforme o método de colheita empregado para sua obtenção (BRACKETT; PADRON; LYNNE, 1997). Tanto no homem (BRACKETT; PADRON; LYNNE, 1997; BRACKETT, 1999) quanto em *Callithrix* (SCHNEIDERS;

SONKEN; HODGES, 2004) e *Saimiri* (YEOMAN et al., 1997, 1998) o sêmen obtido por VE foi de melhor qualidade quando comparado ao obtido por EE, principalmente quanto à motilidade espermática. Assim, para colheita de sêmen em homens com lesão na medula espinhal a VE tornou-se o método de eleição e a EE é utilizada somente quando a VE falha (BRACKETT, 1999; SONKSEN; OHL, 2002).

Por simular uma ejaculação mais próxima do natural e resultar em um sêmen colhido de melhor qualidade (YEOMAN et al., 1998), a VE representa um importante método a ser empregado e difundido em centros de criação e reprodução de primatas não humanos (WOLF, 2009).

2.3.1 Métodos de contenção física e condicionamento

Para a contenção dos animais de um recinto coletivo ou individual são utilizadas redes ou puças, luvas de couro ou caixas de transporte (LANG, 1968; ABEE, 1985; DUKELOW, 1985). As redes devem ser utilizadas com cuidado, pois oferecem mais riscos de injúria ao animal (LANG, 1968; ABEE, 1985). O método mais empregado é o treinamento dos animais para entrar em caixa de transporte (LANG, 1968; ABEE, 1985; MENDOZA, 1999). Quando contidos manualmente com luva de couro o contendor segura com uma mão o animal pelo tórax de maneira firme, porém não com muita força para não o sufocar e, com a outra mão, as pernas.

Para uma contenção física mais segura alguns dispositivos foram desenvolvidos. Para colheita de sangue e fluidoterapia os animais foram mantidos em calhas de madeira, posicionadas a 40º, com o tórax preso por um pedaço de madeira forrado com espuma a fim de proporcionar maior conforto ao animal (LANG, 1968). Esse dispositivo foi aprimorado e utilizado para colheita de sêmen de *S. sciureus* por vibroestimulação peniana (LAVERDE-CORREA; ROBLES-MEDINA, 2001).

Em estudos farmacológicos foram utilizadas cadeiras de contenção primeiramente desenvolvidas em ferro ou aço, onde os animais permaneciam com o pescoço, tórax e membros posteriores presos (HANSON, 1968). Posteriormente, as cadeiras foram aperfeiçoadas e confeccionadas em acrílico onde os animais eram

contidos apenas na cintura (BARRET, 1983). Dispositivos semelhantes são atualmente disponíveis comercialmente ("*Primate Restraîner*", UNO Roestvaststaal BV).

Para colheita de sêmen por eletroejaculação retal normalmente os animais são sedados e mantidos em posição ventral sobre um suporte com tipóia de pano (DUKELOW, 1971; VALLE et al., 2004). O mesmo método foi utilizado para colheita de sêmen de *S. boliviensis* por vibroestimulação peniana (YEOMAN et al., 1997; 1998). A fim de reduzir o estresse, os animais foram mantidos em recinto com redução de luz.

Em *Callithrix jacchus* utilizou-se um suporte em "L" coberto com pano. Os animais permaneceram contidos manualmente apoiados no suporte, numa posição inclinada e com os braços livres (KUEDERLING et al., 2000; SCHNEIDERS; SONKEN; HODGES, 2004; VALLE, 2007).

A capacidade de aprendizado e sensorial de *Saimiri* é comparável àquela que caracteriza outros macacos e grandes primatas estudados. *Saimiri* possui uma bem-desenvolvida capacidade de aprender e resolver problemas complexos, excelente acuidade visual e visão de cores e sensibilidade auditiva que alcança uma grande variedade de espectros, alguns inaudíveis ao homem (RUMBAUGH, 1968).

A implantação de um programa de treinamento e condicionamento em biotérios de primatas não humanos (PRESCOTT, BOWELL; BUCHANAN-SMITH, 2005), facilita o manejo, com a redução dos riscos de brigas entre os animais e mordidas nos tratadores (WOLFENSOHN; HONESS, 2005). O condicionamento contribui ainda para redução do estresse e comportamentos indesejáveis (REINHARDT, 2005), como as estereotipias (MASON, 1991) e contribui para o bem-estar geral dos animais (PRESCOTT, BOWELL; BUCHANAN-SMITH, 2005). Consequentemente, os animais respondem melhor aos protocolos de pesquisa.

Os micos de cheiro podem ser facilmente treinados para uma variedade de procedimentos e a manipulação frequente facilita o seu manejo (DUKELOW, 1983; MENDOZA, 1999). Os animais devem se acostumar ao tratador ou manipulador; por isso, deve-se manter uma equipe pequena e constante (DUKELOW, 1983).

A técnica de reforço positivo por meio de recompensas alimentares pode ser utilizada com sucesso para diversos procedimentos de manejo, como entrar em caixa de transporte (REINHARDT, 2005), administração de injeções intramusculares (WOLFENSOHN; HONESS, 2005), colheita de sangue (DETTEMER et al, 1996),

saliva (TIEFENBACHER et al., 2003; CROSS; PINERS; ROGERS, 2004), urina (SMITH et al., 2004) ou sêmen (YEOMAN et al., 1997; 1998; KUEDERLING et al., 2000; SCHNEIDERS; SONKEN; HODGES, 2004; VALLE, 2007). A técnica também foi utilizada para promover o retorno da ciclicidade ovariana de uma fêmea de chimpanzé, *Pan troglodytes* (PIZZUTTO et al., 2010).

2.3.2 Dissolução do coágulo seminal

O coágulo seminal é um dos principais problemas da avaliação e processamento do sêmen para a maioria das espécies de primatas (VALLE, 2004; 2007).

No trato reprodutor feminino, os espermatozóides desprendem-se gradualmente do coágulo seminal e parecem migrar para a cavidade uterina, por meio das criptas longitudinais da endocervix, bem como pelo canal cervical (HAFEZ; JASZCZAK, 1973). No entanto, na maioria dos casos, esse processo não ocorre de maneira satisfatória *in vitro* (DUKELOW, 1971) e constitui um dos maiores entraves na análise e processamento do sêmen de primatas (VALLE, 2002).

Inicialmente, acreditava-se que parte desse coágulo se liquefazia após a ejaculação, mas estudos em macacos rhesus (*Macaca mulatta*) demonstraram que, na verdade, ocorre uma contração do coágulo e liberação de uma fração líquida adicional, rica em esperma (SETTLAGE; HENDRICKX, 1974). A quantidade de espermatozóides retidos no coágulo é variável entre as espécies. Em *M. mulatta*, por exemplo, o coágulo retém de 30 a 70% do total de espermatozóides do ejaculado (HOSKINS; PATTERSON, 1967; SETTLAGE; HENDRICKX, 1974), enquanto que em macaco aranha (*Ateles geoffroy*) essa quantidade pode chegar a 90% (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2002).

Vários métodos foram testados para dissolver o coágulo e, conseqüentemente, permitir seu processamento. Em bugio preto e dourado (*Alouatta caraya*) (VALLE, 2002; VALLE et al., 2004), a dissolução do coágulo se dá após incubação a 37° C por 30 minutos em Ringer Lactato. Já em *A. geoffroy* (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2002), macaco prego (*Cebus apella*) (GUIMARÃES et

al., 2002; BARNABE et al., 2002) e *Saimiri* sp. (BENNETT, 1967; ACKERMAN; ROUSSEL, 1968; DENIS et al., 1976; YEOMAN et al., 1998), por exemplo, o coágulo não se desfaz tão facilmente.

A dissolução do coágulo de *Saimiri* foi tentada por meio de incubação a 37° C ou em temperatura ambiente, durante 30 a 60 minutos, com (ACKERMAN; ROUSSEL, 1968) ou sem (BENNETT, 1967; DENIS et al., 1976; YEOMANN et al., 1998) a utilização de enzimas proteolíticas. Bennett (1967) observou uma diminuição na formação do coágulo seminal e peso do ejaculado (de 397,7 para 45,2 mg) após sucessivas colheitas em intervalos de cinco dias.

A adição de enzima proteolítica ao meio diluidor para dissolução do coágulo seminal foi testada em diversas espécies. Em *Macaca mulatta* testou-se a fosfodiasterase (300 UI/ mL), a α -amilase (0,2 a 2%) e a α -quimotripsina (0,1 a 2%). Nenhum dos métodos resultou em 100% de dissolução do coágulo seminal, porém o melhor efeito foi obtido com a α -quimotripsina a 2% (HOSKINS; PATTERSON, 1967). Concentrações acima de 2% com longo período de incubação podem aumentar a incidência de anormalidades (SETTLAGE; HENDRICKX, 1974).

Em *Cebus apella*, o uso de solução salina associada à incisão do coágulo apresentou o melhor resultado em relação à preservação da motilidade espermática, porém foi eficaz na dissolução do coágulo em apenas 40% das tentativas. A α -quimotripsina a 2% foi eficaz em 100% das tentativas para dissolução do coágulo em menos de 5 minutos de incubação e resultou em 80% de espermatozóides móveis (NAGLE; DENARI, 1985). No mesmo estudo, também foram testadas a α -quimotripsina a 1 e 3% e a tripsina a 1 e 2%, com a mesma taxa de dissolução do coágulo, porém com motilidade média de 70%.

Na mesma espécie, a hialuronidase ou a tripsina, ambas a 25%, adicionadas ao meio diluidor com 15 minutos de incubação, não foram efetivas na eliminação completa do coágulo seminal, além de reduzirem a motilidade e o vigor espermático, quando comparado à fração líquida do sêmen. Por outro lado, a integridade do acrossoma foi mantida em ambos os casos (PAZ et al., 2006).

Já a associação de fragmentação mecânica com adição de água ao meio diluidor (50% de água de coco + 25% de citrato de sódio a 5% + 25% de água destilada) resultou em completa liquefação da fração coagulada, após uma a duas horas de incubação em *Cebus apella* (ARAÚJO e tal., 2009).

Em *A. geoffroy*, comparou-se a dissolução do coágulo seminal por dois métodos: fragmentação manual e tripsina a 0,25%, 2:3 (solução de tripsina: sêmen). Em ambos os casos, as amostras permaneceram em banho-maria durante 10 minutos. A digestão pela tripsina aumentou significativamente a concentração de espermatozóides na fração líquida, bem como a porcentagem de movimentos progressivos lentos e espermatozóides viáveis. Houve diminuição da porcentagem de espermatozóides imóveis, enquanto que as proporções de movimentos não lineares ou espermatozóides anormais não foram afetadas (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2002).

No sêmen humano o uso de tripsina 1mg/ mL em meio diluidor (SpermSolute) aumentou o índice de motilidade e a concentração de ATP, aferidos após a técnica de 'swim-up' (FIGENSCHAU; BERTHEUSSEN, 1999).

O uso de enzimas proteolíticas para dissolução do coágulo seminal ainda é bastante controverso, pois, apesar de aumentar o volume da amostra e o número de espermatozóides presentes na fração líquida do sêmen, tais enzimas podem lesar a membrana do espermatozóide, o que tem relação direta com a capacidade de fertilização. Em vista disso, alguns autores desaconselham o emprego dessas enzimas nos protocolos de congelamento (MORREL; HODGES, 1998; 2001).

Assim, embora seja possível, a dissolução enzimática do coágulo seminal carece de estudos que avaliem criteriosamente as lesões físicas e as alterações funcionais causadas nos espermatozoides, que possam comprometer sua viabilidade e capacidade de fertilização.

2.3.3 Avaliação do sêmen

A avaliação espermática é de extrema importância, uma vez que a qualidade do espermatozóide é essencial para a ocorrência da fertilização, seja ela natural ou artificial. Dessa maneira, o objetivo da análise do sêmen é determinar o potencial de fertilização da amostra seminal, seja fresco, resfriado ou descongelado, por meio de um método rápido e de custo acessível (MOCÉ; GRAHAM, 2008). No entanto, os mesmos autores consideram que, o desenvolvimento de sistemas computadorizados para análise do sêmen (*Computer-Assisted Sperm Analysis – CASA*), a

determinação da real capacidade de fertilização de determinada amostra é limitada, pois diversos fatores influenciam essa capacidade e nenhum ensaio laboratorial reproduz todas as condições do trato reprodutor feminino. Adicionalmente, segundo Wildt (1986), há considerável variação interespecies e interindividuais nas características seminais. Assim, para a avaliação da fertilidade no macho, é importante acumular dados de várias colheitas durante um intervalo de tempo (WILDT, 1986).

A avaliação do sêmen abrange testes físicos, morfológicos e funcionais.

2.3.3.1 Testes físicos

Os testes físicos são realizados imediatamente após a colheita e consistem na avaliação da aparência do ejaculado, pH, volume, concentração espermática, movimento de massa, motilidade, vigor e movimentos progressivos retilíneos (WILDT, 1986; VALLE, 2007; MOCÉ; GRAHAM, 2008). A motilidade espermática tem sido frequentemente correlacionada com a capacidade de fertilização do sêmen (GOULD; MARTIN, 1986; MOCÉ; GRAHAM, 2008).

2.3.3.2 Avaliação morfológica

A morfologia espermática pode ser avaliada visualmente com ou sem a utilização de corantes ou por meio de morfometria automatizada (MOCÉ; GRAHAM, 2008), para a determinação de espermatozóides normais e anormais (KHOLKUTE; GOPALKRISHNAN; PURI, 2000). As células anormais podem ser, ainda, classificadas em defeitos maiores e menores (CBRA, 1998). Ejaculados com elevada porcentagem de espermatozóides anormais têm sido relacionados com fertilidade reduzida (MOCÉ; GRAHAM, 2008).

A morfometria dos espermatozóides é importante e de grande interesse para estudos comparativos dos gametas, do ponto de vista filogenético, bem como para estudos da função e fisiologia espermática, potencial reprodutivo, defeitos genéticos

(KUGELMEIER; VALLE; MONTEIRO, 2010) e desenvolvimento de novas biotecnologias para avaliação do sêmen e reprodução assistida, por exemplo, a sexagem de espermatozóides.

A microscopia eletrônica tem-se mostrado importante ferramenta auxiliar na avaliação mais aprofundada da integridade da célula espermática por permitir o acesso às alterações que ocorrem em proporções sub-celulares do espermatozóide (CRESPILO et al., 2006).

2.3.3.3 Testes funcionais

Os testes funcionais incluem a avaliação da integridade da membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial. A avaliação da integridade genética do espermatozóide (fragmentação do DNA), a capacitação e reação acrossômica, bem como, a ligação ao oócito e capacidade de fertilização são de fundamental importância na avaliação seminal em protocolos de congelamento.

A integridade da membrana espermática é fundamental para a manutenção da sua capacidade de fertilização (ANDRADE et al., 2007). Os ensaios que avaliam essa integridade fornecem valiosa informação sobre a permeabilidade da membrana e consequente viabilidade da célula (WILDT, 1996). No entanto, para uma completa avaliação dessa viabilidade, devem-se considerar três compartimentos: um recobrindo o acrossoma, outro para a porção posterior da cabeça e um terceiro para a peça intermediária. Portanto, são necessários diferentes ensaios de viabilidade para acessar a integridade dos diferentes compartimentos (MOCÉ; GRAHAM, 2008).

✓ *Integridade de membrana plasmática:* a membrana plasmática é responsável pela manutenção da homeostase celular. Nesse sentido, a integridade da membrana plasmática exerce um papel vital na sobrevivência do espermatozóide no interior do trato reprodutor feminino e na preservação da capacidade de fertilização (ANDRADE et al., 2007). Membranas plasmáticas íntegras impedem a entrada de moléculas grandes, como corantes, na célula (GRAHAM, 2008). Assim, os espermatozóides não corados são íntegros e considerados “vivos”; já os espermatozóides corados demonstram perda da integridade da membrana plasmática e são considerados

“mortos” (MOCÉ; GRAHAM, 2008). Exemplos de colorações para a avaliação da membrana plasmática são: eosina Y (KUEDERLING et al., 2000;), eosina-nigrosina (VALLE et al., 2008), eosina B (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 1998) e azul anilina nigrosina (MOCÉ; GRAHAM, 2008).

Entretanto, as colorações fluorescentes têm atraído cada vez mais pesquisadores pela eficácia e relativa praticidade na avaliação simultânea dos compartimentos de membrana, como a associação de três colorações PI (propidium iodide), FITC–PSA (*Fluorescein isothiocyanate - Pisum sativum agglutinin*) JC-1, que avaliam as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial numa única lâmina (ANDRADE et al., 2007).

Por ser de fácil realização, o teste hiposmótico também é uma alternativa interessante para avaliação da integridade de membrana (MOCÉ; GRAHAM, 2008). No entanto, o limitante é a quantidade de sêmen necessária, o que dificulta seu emprego em primatas.

✓ *Integridade do acrossoma:* é fundamental no processo de fertilização, uma vez que o espermatozóide depende da reação acrossômica para a penetração na zona pelúcida e fusão à membrana plasmática do oócito (ANDRADE et al., 2007). Algumas colorações não fluorescentes utilizadas para avaliação do acrossoma são: coloração simples do acrossoma (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991), Giemsa (BRAVO et al., 2000) e um kit comercial Spermac[®], utilizado em *C. jacchus* (VALLE, 2007).

✓ *Potencial de membrana e atividade mitocondrial:* as mitocôndrias são responsáveis pela produção de ATP e por isso estão diretamente relacionadas ao movimento flagelar e motilidade do espermatozóide (ANDRADE et al., 2007). Assim, a redução do potencial da membrana mitocondrial com consequente diminuição da produção energética pode levar à perda da motilidade (VALLE, 2007). Por isso, alguns estudos relacionam diretamente a motilidade com a capacidade de fertilização do espermatozóide (GOULD; MARTIN, 1986; MOCÉ; GRAHAM, 2008).

Segundo Hrudka (1987), a análise da atividade citoquímica mitocondrial avalia a respiração celular e o metabolismo energético da célula por meio da enzima citocromo c oxidase. Essa enzima foi altamente correlacionada com o citocromo c, produto da cadeia respiratória. A oxidação da 3,3' diaminobenzidina (DAB) pelo complexo citocromo c, incluindo a citocromo c oxidase, demonstrou ser uma reação em cadeia que resulta na polimerização do reagente com consequente deposição

nos locais da reação (membrana mitocondrial interna). Essa deposição pode ser identificada pela visualização de uma cor castanha na região da peça intermediária do espermatozóide, evidenciando as mitocôndrias ativas. Assim, quanto maior o número de mitocôndrias intactas, mais uniforme e intensa será a coloração da peça intermediária.

2.4 DOSAGEM DE CORTISOL COMO FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO DO ESTRESSE

Em vertebrados, as condições ambientais não são estáticas e os animais adaptaram-se a prever as situações por meio de modificações fisiológicas, morfológicas e comportamentais. Os componentes socioambientais não previsíveis levam a um estado de alerta ou emergência que resulta em mudanças no metabolismo endócrino e metabólico do animal (MÖSTL; PALME, 2002).

Em cativeiro essas mudanças e as consequências para o organismo são debatidas no âmbito do bem-estar animal. Um potencial indicador de bem-estar é a ausência de estresse (MÖSTL; PALME, 2002), o que, por sua vez é um indicador multifatorial, dificilmente medido por um único método analítico.

Vários hormônios estão envolvidos na resposta ao estresse, como o ACTH, glicorticóides, catecolaminas, prolactinas, entre outros (MÖSTL; PALME, 2002). A atividade do eixo hipotálamo hipófise adrenal também pode ser avaliada por meio da dosagem de glicorticóides nas fezes, urina ou saliva (MÖSTL; PALME, 2002; TIEFENBACHER et al., 2003; CROSS; PINERS; ROGERS, 2004; HEISTERMANN; PALME; GANSWINDT, 2006; KUGELMEIER et al., 2008). Dentre eles, o cortisol é o principal glicorticóide secretado glândula adrenal frente a situações estressantes e a aferição de sua concentração no sangue tem sido amplamente utilizada como indicador de estresse (MÖSTL; PALME, 2002). Esse hormônio está envolvido na adaptação ao estresse por meio de várias expressões fenotípicas celulares; na elevação do glicogênio hepático; captação de sódio no epitélio luminal; elevação da pressão sanguínea e em altas doses tem efeito letal em certas células T (LITWACK; SCHMIDT, 1997).

Primatas de laboratório são frequentemente submetidos a uma série de situações estressantes, que envolvem a contenção física e/ou química para colheita de sangue, avaliações clínicas, pesagens e biometrias, injeções e inoculações, cirurgias. Como mencionado anteriormente o emprego de técnicas de condicionamento e treinamento como ferramentas para reduzir o nível de estresse crônico nesses animais é de suma importância. A dosagem de cortisol torna-se então em ferramenta auxiliar no monitoramento da eficácia dos programas de treinamento e do bem-estar desses modelos tão valiosos para a pesquisa.

Diferentes métodos de contenção física para colheita de sangue de macacos rhesus (*Macaca mulata*) resultaram na dosagem de diferentes concentrações de cortisol plasmático. Os níveis de cortisol foram mais elevados após contenção em caixa de transporte durante 5 minutos do que na contenção manual durante 15 minutos (LINE; CLARKE; MARKOWITZ, 1987).

Em macacos prego (*Cebus apella*) submetidos a treinamento para colheita de sangue houve aumento dos níveis de cortisol em todos os animais, porém nos animais não condicionados os níveis permaneceram elevados após 60 minutos do procedimento. Em geral, os níveis de cortisol sérico igualaram-se aos iniciais após sete semanas de treinamento (DETTMER et al., 1996).

O sistema endócrino de *Saimiri* é extremamente sensível a perturbações ambientais e psicológicas. As condições de alojamento e relações sociais exercem forte efeito nos níveis hormonais e essas mudanças por sua vez podem afetar a resposta ao estresse (COE; SMITH; LEVINE, 1985).

Os autores verificaram níveis mais elevados de cortisol em machos alojados em grupos heterossexuais do que quando alojados apenas com outros machos e, por sua vez, também foram mais elevados nessas condições do que quando os animais permaneceram alojados individualmente. Em geral, em todos as condições o macho dominante exibiu níveis hormonais mais elevados.

A média basal de cortisol plasmático em *Saimiri* variou bastante entre os indivíduos e foi mais elevada nos machos (67 a 322 µg/ dL, 181 µg/ dL em média) do que nas fêmeas (37 a 220 µg/ dL, 103 µg/ dL em média) (COE et al., 1978). Apesar dessa diferença, tanto os machos quanto as fêmeas responderam de forma similar ao estresse causado por uma leve sedação com éter. Os níveis de cortisol foram significativamente mais elevados 30 minutos após o evento estressante, tanto nos machos (248 µg/ dL) quanto nas fêmeas (174 µg/ dL). Após duas horas, a elevação

já não era mais significativa e, com quatro horas, os níveis hormonais já haviam retornado aos níveis basais (COE et al., 1978). Ao comparar os níveis de cortisol entre os machos dominantes e subordinados, a resposta em 30 minutos após o estímulo estressor foi mais pronunciada nos animais subordinados (COE; SMITH; LEVINE, 1985).

As condições de alojamento também podem influenciar no bem-estar dos animais. A concentração média de cortisol em macacos de cheiro alojados individualmente foi quase duas vezes mais elevada ($170,1 \pm 7,7 \mu\text{g/ dL}$) do que nos animais mantidos em recintos coletivos ($92,7 \pm 4,3 \mu\text{g/ dL}$) (WILSON; BROWN; WILSON, 1978). Ao comparar machos alojados em recintos coletivos heterossexuais, unissexuais ou individuais, os níveis de cortisol foram mais elevados de cortisol nos animais alojados em grupos heterossexuais do que nas outras condições (COE; SMITH; LEVINE, 1985).

A dosagem de cortisol plasmático em *Saimiri* demonstrou um ritmo diurno de secreção independente do gênero ou condição de alojamento dos animais (recintos individuais ou coletivos). A secreção de cortisol foi mais elevada entre 4:00 e 8:00 horas com redução da concentração ao longo do dia (WILSON; BROWN; WILSON, 1978; COE; LEVINE, 1995).

Quanto ao ritmo anual de secreção de cortisol, os níveis basais dentro e fora da estação de acasalamento não variaram para as fêmeas de macacos de cheiro, porém os machos tenderam a ter níveis mais elevados na estação reprodutiva, principalmente à noite (COE; LEVINE, 1995). Quando o cortisol foi medido após rápida contenção física e anestesia, a resposta foi estável ao longo do ano, porém os incrementos nos níveis de cortisol foram ligeiramente mais elevados na estação não reprodutiva. Logo após o estresse, os níveis de cortisol foram, em geral, compatíveis com os níveis basais (COE; LEVINE, 1995).

3 OBJETIVOS

- Avaliar o condicionamento de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) machos ao método de estimulação e colheita de sêmen por vibroestimulação peniana por meio de observações comportamentais e dosagem de cortisol sérico.
- Colher o sêmen de *Saimiri sciureus* pelo método de vibroestimulação peniana.
- Analisar o sêmen de *S. sciureus* com o emprego de testes físicos, morfológicos e funcionais.
- Avaliar o efeito da adição de tripsina em três diferentes doses e dois tempos de incubação sobre a dissolução do coágulo seminal por meio da análise física e funcional do sêmen.

4 MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado entre novembro de 2010 e abril de 2011, no Serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim), Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro/ RJ e no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

No Cecal, os animais são criados e mantidos segundo as orientações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 1996; 2006) e os procedimentos de manejo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Fiocruz, registro nº LW-24/09, “Criação, Produção e Manutenção de Primatas não Humanos no Centro de Criação de Animais de Laboratório/ Cecal para Atender aos Programas e Projetos Desenvolvidos na Fiocruz”).

O projeto foi submetido e aprovado pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz, sob o protocolo nº P-73/10 e licença nº LW-9/10 e da FMVZ/ USP, protocolo nº 1926/2010. Foram seguidas as recomendações para manutenção de *Saimiri* em ambientes fechados (DUKELOW, 1983; ABEE, 1985; NRC, 1996; MENDOZA, 1999; NRC, 2003; IPS, 2007).

4.1 ANIMAIS

O estudo foi realizado com 12 machos adultos da espécie *Saimiri sciureus*, com idade entre seis a 12 anos. Todos os animais eram nascidos em cativeiro e pertencentes ao Cecal/ Fiocruz.

A seleção dos animais consistiu na avaliação clínica geral e especial e exames complementares. As observações foram registradas em fichas de avaliação individuais (Apêndice A).

O exame clínico geral consistiu em pesagem, avaliação da condição corporal e pelagem, aferição da temperatura, ausculta cardiopulmonar, palpação abdominal,

avaliação oral e biometria corporal. O exame clínico especial consistiu na avaliação do pênis, prepúcio, bolsa e inserção do ligamento escrotal, consistência, mobilidade, simetria e biometria dos testículos. Os exames complementares consistiram em exames laboratoriais e ultrassonográficos.

Os exames laboratoriais incluíram hemograma completo e análise bioquímica dos seguintes parâmetros: uréia, creatinina, colesterol, proteína total e hepatograma. O exame ultrassonográfico consistiu na avaliação da cavidade abdominal e testículos.

Foi realizada a pesquisa e montagem do cariótipo de todos os animais no Laboratório de Citogenética do SCPrim/ Cecal. Para isso, utilizou-se a técnica descrita por Moorhead et al. (1960), que consistiu na colheita de 1 mL de sangue da veia femoral, com seringas heparinizadas, após a contenção física do animal, conforme descrito no item 4.2.1 “Contenção e colheita de sêmen”. Aproximadamente oito gotas de sangue total de cada animal foram semeadas em frascos contendo 6 mL de meio de cultura RPMI 1640 com penicilina e estreptomicina, acrescido de 1,5 mL de soro fetal bovino e 0,2 mL de fitohemaglutinina. O material foi incubado em estufa a 37° C, por 72 horas. Com 71 horas de incubação foram colocados 0,2 mL de solução de colchicina a 200 ug/ mL e mantido por mais uma hora, a 37° C.

O material dos frascos foi vertido para tubos cônicos e centrifugado a 1000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionados 10 mL de solução de KCl 0,075N incubando-se por 15 minutos, a 37° C. O material foi novamente centrifugado e ao precipitado se adicionou uma solução fixadora de metanol e ácido acético 3:1. Esta fixação foi repetida por mais duas vezes. O material foi diluído em uma pequena quantidade de fixador e gotejado com pipeta Pasteur sobre lâmina previamente lavada e com uma película de água. As lâminas foram secas ao ar para posterior coloração com solução de Giemsa a 3 % em tampão fosfato (pH 6,8).

Os critérios adotados para exclusão de algum animal foram: presença de alterações na morfometria e desenvolvimento testiculares, como hipoplasia ou monorquidia, alterações fenotípicas, quebra de hígidez, condição corporal deficiente, alterações hematológicas e/ou bioquímicas acompanhadas de sintomatologia, alterações ultrassonográficas, alteração do cariótipo.

4.1.1 Condições experimentais de alojamento e manejo

Antes do início do estudo, os animais encontravam-se alojados em recintos coletivos, em ambiente externo, sob condições ambientais naturais e em grupos unissexuais (MOURA et al., 2010). Nesses recintos era mantido o contato visual e olfativo com outros machos e fêmeas em grupos sociais próximos (Figura 2A e B).

Durante todo o estudo, os animais foram mantidos em ambiente fechado, em sala com 3,30 m de largura x 3,40 m de profundidade (11 m² de área) e 2,95 m de pé direito. Foi adotado o regime de iluminação artificial, por meio de lâmpadas fluorescentes, com 12 horas de claro e 12 de escuro (CE 12:12), controlados por meio de timer. Para visualização dos animais no escuro foi aplicado um filme plástico vermelho⁴ sobre uma lâmpada comum de sete watts, instalada no centro da sala. A lâmpada foi mantida acesa 24 horas por dia, durante todo o estudo, de forma a manter uma condição constante, pois como *Saimiri* é capaz de enxergar o vermelho (JACOBS, 1985). O ambiente era equipado com dois aparelhos de ar condicionado tipo split⁵ (18.000 BTUs), ligados de forma alternada, um ventilador/ exaustor, uma tomada de ar externo e um termohigrômetro (Figuras 3A e B).

Nesse macro ambiente, os animais foram alojados em dupla, em recintos de aço inox com dimensões aproximadas de 65 cm de largura x 65 cm de profundidade (0,42 m² de área) x 70 cm de altura. Cada recinto foi equipado com uma plataforma confeccionada em PVC, um item de enriquecimento ambiental, uma mamadeira de água e dois comedouros, um para ração extrusada comercial⁶, (ração seca) e outro para frutas (ração úmida) (Figura 3C). A ração comercial possuía 24% de proteína e 7 % de extrato etéreo. Abaixo de cada recinto situava-se uma bandeja em aço inox, para recolhimento de dejetos e restos alimentares, coberta com uma fina camada de maravalha.

⁴ Letravisión LV207 PAF-7, da Esselte®

⁵ Hi Wall Diamond Springer Carrier®, Canoas/ RS

⁶ Nuvilab Primatas, Nuvital®, Colombo/ PR

Figura 2 – (A) Distribuição dos recintos coletivos de *Saimiri sciureus* em ambiente externo, sob condições ambientais naturais, proporcionando o contato visual e olfativo com outros machos e fêmeas em grupos sociais próximos. (B) Detalhe aproximado do recinto coletivo, evidenciando-se o enriquecimento ambiental e plataformas para alimentação e locomoção - Rio de Janeiro - 2010/11

Figura 3 – Alojamento dos animais (*Saimiri sciureus*) em estudo. (A) Sistema de iluminação com lâmpadas fluorescentes e uma lâmpada comum, com filme plástico vermelho (círculo). (B) Sistemas de ar condicionado, exaustão, tomada de ar externo e controle de luz por timer (seta). (C) Recinto composto por uma plataforma de PVC e polietileno, um poleiro de PVC, um ninho de PVC, piso móvel de polipropileno, uma mamadeira de água, um comedouro para ração extrusada e um para frutas (alto) - Rio de Janeiro - 2010/11

O manejo geral foi o mesmo rotineiramente empregado no SCPrim, com algumas modificações, em decorrência das características do experimento.

A lavagem completa dos recintos foi realizada em dias alternados, a fim de minimizar o estresse e evitar o excesso de umidade no ambiente. A lavagem dos recintos e seus constituintes foi realizada com água sob pressão⁷ e detergente neutro. Nos dias em que não havia lavagem completa dos recintos, realizava-se a troca ou lavagem sistemática dos itens que constituíam o recinto, como grades móveis do piso, plataformas, brinquedos e maravalha na bandeja de recolhimento. Todos os recintos e itens foram secos antes do retorno dos animais, com o intuito de reduzir o risco de pododermatite.

A dieta consistiu em oferta de ração extrusada comercial para primatas de pequeno porte (ração seca), hortifrutigranjeiros (ração úmida) e água *ad libitum*. A ração extrusada era a base da alimentação dos animais e a quantidade ofertada era de 40 g/ kg de peso vivo animal. A ração seca foi ofertada duas vezes ao dia, pela manhã e final do dia. As frutas foram oferecidas no início da tarde e atuaram como complemento alimentar. Os itens ofertados foram: banana, maçã, manga, jiló, pimentão, vagem, cenoura, couve, ovos de codorna. Outros itens foram ofertados como enriquecimento alimentar: frutas da estação, tenébrios, pipoca; e olfativo: ervas aromáticas.

A fim de minimizar o estresse causado pela mudança de ambiente e condições de alojamento e, conseqüentemente, proporcionar-lhes bem-estar, os animais receberam ainda itens de enriquecimento ambiental e comportamental, conforme descrito por (GONÇALVES et al., 2008; CAFARO et al., 2009). Os itens foram escolhidos de forma a respeitar as características biológicas, fisiológicas e comportamentais da espécie e proporcionar estímulos visuais, táteis, auditivos e olfativos. Durante o dia, foram mantidos com música clássica ambiente ou sons que mimetizam os da natureza, como barulho de água, cachoeira, pássaros e insetos. Diariamente, receberam enriquecimento alimentar, tais como capim limão, hortelã, erva cidreira, menta, poejo, flores de hibisco ou pipoca. Os brinquedos ofertados foram balanço de PVC, bambu com tenébrios, ervas, frutas ou castanhas. O ambiente ainda foi enriquecido com plataformas de PVC e polietileno, poleiros de PVC, pisos de polietileno. Todos os itens foram previamente higienizados e a oferta

⁷ Lavadora de alta pressão Tekna® HLX 95V Nordtech, Curitiba/ PR

seguiu um cronograma elaborado de forma a manter o interesse dos animais pelos itens de enriquecimento.

4.1.2 Adaptação e condicionamento

Durante o primeiro mês de estudo, os animais foram adaptados às novas condições de alojamento e condicionados aos procedimentos de manejo diário e colheita de sêmen.

Os animais foram condicionados a entrar em caixa de contenção e transporte (LANG, 1968; ABEE, 1985; MENDOZA, 1999), idealizada especificamente para esse estudo. A caixa era confeccionada em compensado de madeira envernizado, com 40 cm de comprimento x 30 cm de largura x 30 cm de altura. As portas frontal e superior eram deslizantes e a caixa possuía pequenas aberturas circulares nas laterais, fundos, portas e divisórias, visando minimizar a sensação de confinamento, enquanto o animal permanecia em seu interior. Possuía uma divisória móvel na metade do comprimento, a fim de realizar a contenção de dois animais ao mesmo tempo. Um piso móvel de plástico com grade e bandeja coletora era colocado sobre o piso fixo da caixa. Dessa maneira, a caixa também poderia ser empregada para colheita de amostras biológicas, como fezes e urina (Figuras 4A a D).

O condicionamento do animal para entrar na caixa foi realizado por meio de reforço positivo com recompensa alimentar (REINHARDT, 2005; WOLFENSOHN; HONESS, 2005). As recompensas alimentares ofertadas foram: larvas de besouros (tenébrios), baratas, frutas secas ou glaceadas, barra de cereais, balas jujubas, geléia de mocotó, banana, manga e maçã. Esse procedimento foi realizado para a retirada dos animais dos recintos, tanto para a lavagem quanto para o transporte para a sala de colheita de sêmen. Após a soltura os animais foram novamente recompensados.

No condicionamento para as colheitas de sêmen, o mesmo princípio de reforço positivo foi adotado, sendo que os animais receberam a recompensa durante todo o procedimento. Os comportamentos indicativos de estresse observados durante o condicionamento foram: defecação, vocalização, comportamento agressivo

direcionado aos técnicos, fuga e tentativa de fuga, rejeição a vibroestimulação, parada cardiorrespiratória transitória, andar repetitivo de um lado ao outro do recinto.

Figura 4 – Caixa de contenção e transporte utilizada para *Saimiri sciureus*. (A) Vista lateral. (B) Vista frontal evidenciando-se as alças para transporte e fixação no recinto (setas). (C) Encaixe da caixa no recinto. (D) Animal dentro da caixa - Rio de Janeiro - 2010/11

4.2 CONTENÇÃO, COLHEITA E AVALIAÇÃO SEMINAL

As estimulações para colheita de sêmen ocorreram três vezes por semana, estimulando-se dois animais por dia. Dessa forma, cada animal foi estimulado com intervalo médio de 15 dias. Todos os dados referentes à estimulação e colheita eram

anotados em fichas específicas individuais (Apêndice B). Em cada dia de estimulação, os animais eram pesados dentro da caixa de contenção.

4.2.1 Contenção e colheita de sêmen

Para as estimulações e colheita de sêmen a sala foi mantida com pouca iluminação e redução de ruídos, a fim de minimizar os estímulos estressantes para os animais.

Os animais, contidos em dupla nas caixas de transporte, foram manipulados individualmente. Cada animal foi cuidadosamente retirado da caixa de transporte por manipulador experiente, equipado com luvas de malha de aço e de raspa de couro (Figura 5A e B). As luvas de couro receberam uma adaptação com velcro para auxiliar na contenção do tórax e pernas do animal. Imediatamente após a retirada da caixa, o animal foi levado a um suporte para a colheita de sêmen, onde foi posicionado em estação, ligeiramente inclinado para frente (Figura 5C). Os animais permaneceram com as mãos livres para manipular os alimentos ofertados (descritos no item 4.1.2) sobre a lona, durante a estimulação (Figura 5D).

A estrutura do suporte foi confeccionada com cano de PVC em formato de “L” e lona de caminhão, no sentido de delimitar o campo de visão do animal sobre a manipulação para colheita de sêmen. O suporte foi acoplado em mesa de procedimentos, de forma que poderia ser retirado sempre que necessário (Figura 6).

Figura 5 – Sequência de contenção e preparo dos animais (*Saimiri sciureus*) para a estimulação e colheita de sêmen. (A) Luvas de aço e de couro utilizados para a contenção. (B) Retirada do animal da caixa de transporte. (C) Posicionamento do animal no suporte. (D) Recompensa alimentar - Rio de Janeiro - 2010/11

Figura 6 – Suporte em “L” acoplado na mesa de procedimentos para colheita de sêmen de *Saimiri sciureus* e preparo da sala de colheita - Rio de Janeiro - 2010/11

Com o animal devidamente contido e posicionado, foi realizada a biometria testicular com paquímetro manual para aferição dos diâmetros maior e menor dos testículos (Figura 7A).

Em seguida, realizou-se a higienização da região genital com água destilada morna, mantida em banho maria⁸ a 37° C e secagem com gaze estéril. Nesse procedimento, o prepúcio foi delicadamente retraído com os dedos polegar e indicador, para uma correta limpeza do pênis.

A estimulação para colheita de sêmen foi realizada pelo método de vibroestimulação peniana (YEOMAN et al., 1997; 1998; KUEDERLING et al., 2000; SCHNEIDERS; SONKEN; HODGES, 2004; VALLE, 2007; VALLE et al., 2008). O disco de estimulação original do aparelho⁹ foi retirado para encaixe de um parafuso de ferro, no qual foi acoplada uma mangueira de silicone (aproximadamente 2 cm de comprimento) e um tubo coletor de vidro com 50 mm de comprimento e 12 mm de diâmetro. O tubo foi adaptado de um tubo de ensaio padrão de 75 mm de comprimento por 12 mm de diâmetro (Figuras 7B e C). Na tentativa de aumentar a taxa de sucesso nas colheitas foi confeccionada um tipo de vagina artificial por meio da colocação de água destilada até a metade do tubo. Em seguida colocou-se uma camisinha sem lubrificante, lavada e autoclavada dentro do tubo, a qual foi cortada e amarrada na boca do mesmo. O conjunto foi mantido aquecido em banho maria, a 37° C, até colheita (Figura 7D e E).

⁸ Quimis®, MOD. 334.28, Diadema/ SP

⁹ FertiCare® Personnal Penile Vibrator, Multicept, Copenhagen, Dinamarca

Figura 7 – Biometria e estimulação para colheita de sêmen de *Saimiri sciureus* por vibroestimulação peniana. (A) Biometria testicular com paquímetro manual. (B) e (C) Aparelho com adaptação para tubo de colheita. (D) Possibilidades de posicionamentos do tubo durante a estimulação - Rio de Janeiro - 2010/11

A sequência de estimulação foi baseada em protocolos descritos para *Saimiri* (YEOMAN et al., 1998) e *Callithrix* (VALLE, 2007), com variações conforme a resposta do animal. De maneira geral, a estimulação iniciou-se com 75 Hz de frequência e 1 mm de amplitude, durante 1 a 3 minutos, podendo ser repetido até três vezes, com 30 segundos de pausa entre eles. Posteriormente, o estímulo passou para 80 Hz e 1 mm de amplitude, com as mesmas duração e número de repetições anteriores. Dependendo da resposta do animal, seguiram-se estímulos de 70 Hz e 1,5 mm, 80 Hz e 1,5 mm até no máximo 90 Hz e 1 mm (Apêndice C). Se, após 20 minutos, não se obtinha ejaculado, o animal era recompensado da mesma maneira e recolocado na caixa de transporte.

4.2.2 Avaliação do sêmen

Quando foi obtida amostra de sêmen, mediu-se imediatamente o pH com fita para medição de pH¹⁰. Devido à grande quantidade de coágulo, o volume seminal foi estimado pela diferença de volume ao acrescentar 1 mL de meio diluidor TALP-HEPES a um tubo graduado. A composição do meio encontra-se no Apêndice D.

4.2.2.1 Teste da tripsina

Após a aferição do volume, cada amostra (sêmen + meio diluidor) foi dividida em partes iguais, em dois microtubos, sendo um para o controle (C) e outro para o teste da tripsina (T). No tubo controle foram acrescentados 500 µL de meio diluidor. No tubo para o teste da tripsina foram acrescentados 450, 490 ou 495 µL e 50, 10 ou 5 µL (5, 1 e 0,5%) de tripsina¹¹ diluída a 1 mg/ mL em TALP-HEPES. Cada ejaculado obtido foi tratado com uma das três doses da enzima.

A partir da adição da tripsina, iniciou-se a contagem do tempo de incubação para ambas as subamostras (C e T) e as análises seminais foram realizadas nos tempos 0, 20 e 40 minutos (Figura 8). Dessa maneira, cada parâmetro seminal foi analisado seis vezes para um único ejaculado (C0', T0', C20', T20', C40', T40').

¹⁰ Spezial-Indikatorpapier, Machery-Nagel®

¹¹ T4799, trypsin from porcine pancreas, Sigma-Aldrich®, St Louis, Missouri, USA

Figura 8 - Fluxograma para avaliação do sêmen de *S. sciureus* e teste da tripsina - Rio de Janeiro - 2010/11

Para a avaliação do percentual de espermatozóides móveis e com movimentos retilíneos progressivos (MRP), um volume de 20 µL da amostra foi colocado entre lâmina e lamínula aquecidas¹² e avaliado em microscópio óptico¹³, aumento de 400x. A motilidade e MRP foram classificados subjetivamente, numa escala de 0 a 100 %, sendo 0 % para nenhum dos espermatozóides móveis e 100 % para todos móveis ou com MRP.

Além do percentual, as amostras também foram classificadas numa escala de 0 a 5, a fim de avaliar a qualidade do movimento ou o grau de motilidade (WILDT, 1986, 1996; YEOMAN et al., 1998), sendo:

0 = sem movimento;

1 = os espermatozóides se mexem, mas sem progressão retilínea;

2 = MRP lento;

3 = MRP bom;

4 = MRP rápido;

¹² Chapa aquecedora, MOD. NT338D, Novatécnica®, Piracicaba/ SP

¹³ EasyPath Vision®, São Paulo/ SP

5 = hiperativação dos espermatozóides, caracterizada por movimentos rápidos da cauda e de amplitude alta, sem progressão retilínea.

A concentração espermática foi determinada em câmara de hematimetria (Neubauer[®]), utilizando-se as recomendações usuais para contagem de células sanguíneas. Para tanto, uma alíquota de 10 μL da amostra foi transferida para um microtubo de polipropileno, contendo 90 μL de solução formol salino 10% tamponado a 37° C (diluição 1:10). Os tubos foram armazenados em geladeira de 2 a 8° C até a análise.

Para avaliação da morfologia espermática, foi utilizada a técnica da preparação úmida, a qual consiste na deposição de uma alíquota de 5 a 10 μL da amostra diluída em formol salino tamponado. Uma alíquota dessa solução foi depositada entre lâmina e lamínula e avaliadas 200 células em microscopia de contraste de fase em campo claro¹⁴.

Para a avaliação da integridade de membrana plasmática, foi utilizada a coloração convencional por eosina e nigrosina (Figura 9) e a integridade do acrossomo foi analisada pela coloração simples do acrossomo (POPE et al., 1991) (Figura 10). Em cada avaliação as células foram classificadas como íntegras ou não íntegras.

Figura 9 - Fluxograma para coloração por eosina e nigrosina para avaliação da integridade de membrana plasmática - Rio de Janeiro - 2010/11

¹⁴ Olympus BX50, Olympus Optical CO, LTD., Japão

Figura 10 – Fluxograma para a coloração simples do acrossoma para avaliação da membrana acrossomal - Rio de Janeiro - 2010/11

A atividade mitocondrial foi avaliada pela DAB (3,3' diaminobenzidina) (HUDRKA, 1987) (Figura 11) e as células classificadas em:

- ✓ Classe I: quase todas as mitocôndrias estão ativas, ou seja, apresentam-se com coloração castanha, dando à bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente.
- ✓ Classe II: a bainha mitocondrial aparece fragmentada, com segmentos ativos (corados) e inativos (não corados), porém com predominância de segmentos corados.
- ✓ Classe III: apresentam menos da metade da bainha mitocondrial ativa e corada, com poucos segmentos corados e dispersos.
- ✓ Classe IV: apresentam bainha mitocondrial completamente inativa, totalmente não corada.

¹⁵ Microscópio óptico Nikon® Eclipse 50i, Nikon Corporation, Japão

Figura 11 – Fluxograma para coloração para avaliação de potencial mitocondrial (DAB) – Rio de Janeiro – 2010/11

4.3 COLHEITA DE SANGUE E DOSAGEM DE CORTISOL SÉRICO

Para a colheita de sangue os animais foram contidos fisicamente pelo mesmo método descrito para a colheita de sêmen. Foram colhidos 0,5 mL de sangue da veia femoral e as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 15 minutos. O soro, cerca de 50 a 200 µL, foi armazenado em microtubos de polipropileno com capacidade de 0,5 mL. Os tubos foram devidamente identificados com o número do animal, data e hora da colheita e armazenados em freezer – 70° C até o transporte para o Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH), FMVZ/ USP, São Paulo/ SP.

O método empregado foi o radioimunoensaio (RIE), com a utilização de conjunto diagnóstico comercial em fase sólida¹⁶ para dosagem de cortisol no soro, plasma e urina em humanos e o ensaio hormonal foi realizado de acordo com o

¹⁶ Cortisol Coat-a-Count®, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles/ USA.
http://www.medical.siemens.com/siemens/en_GLOBAL/gg_diag_FBAs/files/package_inserts/ria/adrenal_pituitary_n/pitkco-6_siemens.pdf

protocolo fornecido pelo fabricante. O conjunto é altamente específico para o cortisol, com uma reatividade cruzada extremamente baixa a outros esteroides. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/dL}$.

Foram realizados dois estudos hormonais. No primeiro estudo foi avaliado o perfil de cortisol sérico antes e após a estimulação dos animais para a colheita de sêmen.

Dessa maneira, uma dupla foi contida por dia, três vezes por semana, conforme protocolo descrito para as colheitas de sêmen. Para cada animal procedeu-se um único ciclo de colheita de sangue em quatro tempos:

- ✓ Tempo 0 = 0 h – a colheita foi realizada logo após a contenção dos animais na gaiola de transporte.
- ✓ Tempo 1 = 30 minutos a 1 h – a colheita foi realizada logo após a estimulação dos animais para colheita de sêmen.
- ✓ Tempo 2 = 6 h – colheita do sangue 6 horas após a primeira colheita.
- ✓ Tempo 3 = 12 h – colheita 12 horas após o tempo 0.

No segundo estudo, os animais foram divididos em dois grupos aleatoriamente de seis animais, sendo um grupo controle e um desafiado. Esse estudo ocorreu com intervalo mínimo de 15 dias após o primeiro. No grupo desafiado foi administrado acetato de tetracosactida¹⁷, análogo sintético do ACTH, no intuito de simular uma real situação de estresse agudo no animal. Por meio da atuação na glândula adrenal o hormônio estimula a liberação de glicocorticoides, de forma a elevar seus níveis séricos, com posterior retorno aos níveis basais (KEAY, 2006). A dose de ACTH foi estimada baseada em estudos com outras espécies de primatas (TIEFENBACHER et al., 2003; HEISTERMANN et al., 2006) e na dose recomendada pelo fabricante para crianças menores de seis anos de idade. Assim, a dose administrada foi de 0,3 mg/ animal ou 0,3 mL do medicamento cuja concentração é de 1 mg/mL, em única administração pela via intramuscular.

O grupo controle recebeu o mesmo volume de água destilada, também em dose única pela via intramuscular.

Todos os animais foram manipulados no mesmo dia e as amostras de sangue foram novamente colhidas em quatro tempos, em um único ciclo de colheitas:

¹⁷ Synacthen® Depot Retard de liberação prolongada, Biofutura Pharma, Roma/ Itália

- ✓ Tempo 0 = 0 hora após a aplicação do ACTH ou água destilada.
- ✓ Tempo 1 = 6 horas após a aplicação de ACTH ou água.
- ✓ Tempo 2 = 12 horas
- ✓ Tempo 3 = 24 horas

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do programa *SAS System for Windows* (SAS, 1999-2001).

Os dados referentes às variáveis espermáticas foram tratados pelo aplicativo *Guided Data Analysis* e foram primeiramente testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 - $\log_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e, quando a normalidade não foi obtida, empregou-se então, o teste Kruskal Wallis de análise de variância não paramétrica e o teste de Wilcoxon para as comparações dois a dois. Para as variáveis paramétricas foi utilizado o PROC GLM e o teste t LSD como teste pós-hoc de comparações múltiplas.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedeceram às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedeceram às premissas e não houvesse 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 para uma determinada variável resposta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo os animais foram condicionados às estimulações, porém a taxa de obtenção de ejaculados foi baixa. Contudo, a análise dos parâmetros físicos e morfofuncionais dos ejaculados obtidos mostrou altas porcentagens de espermatozóides móveis e com movimentos progressivos retilíneos com progressão boa à rápida. Somente os parâmetros concentração e espermatozóides com membrana plasmática íntegra foram menores do que o descrito para o gênero. A integridade do acrossomo e grau de atividade mitocondrial foram descritos pela primeira vez para a espécie e apresentaram alta porcentagem de integridade. O tratamento com a tripsina não foi eficaz na dissolução do coágulo nas três concentrações utilizadas, mas também não causou danos significativos aos espermatozóides.

5.1 ANIMAIS E CONDICIONAMENTO

Durante o processo de seleção foram avaliados 18 animais, dos quais 12 foram selecionados para o projeto. A tabela 3 mostra os resultados da idade, peso e biometria testicular dos animais selecionados. Os dados representam, as médias, erro padrão e valores mínimo e máximo das medidas tomadas nos dias de estimulação para colheita de sêmen.

Tabela 3 - Identificação, idade, peso e biometria testicular dos 12 *Saimiri sciureus* utilizados no estudo - Rio de Janeiro - 2010/ 11

Animal	Idade (anos)	Peso (g)	Biometria testicular (mm)			
			Testículo Esquerdo		Testículo Direito	
			Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
7	6	890	21,5	13,0	19,9	13,3
19	8	850	19,2	11,2	18,5	11,4
35	6	840	20,2	13,1	19,0	12,9
41	10	980	20,0	12,9	19,3	13,2
53	6	1020	18,6	11,8	17,7	11,8
55	6	1050	18,1	12,2	18,5	11,7
63	6	1000	18,3	11,4	17,5	11,0
65	6	860	17,6	11,8	17,8	11,8
69	12	890	19,4	13,6	19,9	12,7
71	10	980	17,9	11,7	17,4	10,5
89	12	940	21,8	14,0	20,9	14,0
95	10	930	17,1	11,0	16,3	10,2
Médias	8,2	935,8	19,1	12,3	18,6	12,0
EPM	0,7	20,4	0,4	0,3	0,4	0,3
Mín.	6,0	840,0	17,1	11,0	16,3	10,2
Máx.	12,0	1050,0	21,8	14,0	20,9	14,0

EPM = Erro Padrão da Média; Mín. = Valor Mínimo; Máx. = Valor Máximo

O peso corporal médio de *S. sciureus* foi de $780,45 \pm 101,67$ g segundo Laverde-Correa e Robles-Medina (2001) e 851 ± 119 g segundo Andrade et al. (2004). Portanto, o peso corporal dos animais no presente estudo manteve-se acima da média descrita para a espécie. Laverde-Correa e Robles-Medina (2001) descreveram diâmetros testiculares de $15,03 \pm 2,13$ e $9,95 \pm 1,51$ mm para o testículo direito e $15,47 \pm 10,06$ mm para o testículo esquerdo. Esses diâmetros foram menos do que os encontrados no presente estudo. Essa diferença provavelmente se explica pelas diferentes origens geográficas dos animais em cada estudo. No estudo de Andrade et al. (2004) os animais eram procedentes da região amazônica brasileira, os de Laverde-Correa e Robles-Medina (2001) eram colombianos e os deste estudo vieram da Guiana Francesa.

Na análise dos cariótipos evidenciou-se sete pares de cromossomos acrocêntricos, do 15 ao 21 (Figura 12), de forma semelhante ao descrito por Dutrillaux e Couturier (1981). Essa análise confirma que os animais utilizados no estudo pertenciam à espécie *Saimiri sciureus*.

Figura 12 – Cariótipo de *Saimiri sciureus* montado no Laboratório de Citogenética/ Cecal/ Fiocruz. (A) Metáfase. (B) Organização dos pares cromossômicos, evidenciando os 7 pares de cromossomos acrocêntricos (15 ao 21) - Rio de Janeiro - 2010/ 11

Desde o primeiro dia de transferência e ao longo do estudo, os animais apresentaram-se bem ativos, explorando o ambiente e interagindo com os itens de enriquecimento. Adicionalmente, observou-se ausência de comportamentos estereotipados durante quase todo o estudo, com exceção de um animal (71) que, em alguns momentos, exibiu andar repetitivo de um lado ao outro do recinto - “*passing*”. A expressão desse comportamento diminuiu com o emprego de itens de enriquecimento, tais como inclusão de novos poleiros e bambu com frutas ou tenébrios. A ingestão de água e alimento mostrou-se dentro do esperado para a espécie (DUKELOW, 1983; MOURA et al., 2010). A consistência das fezes e a urina apresentaram-se normais durante no decorrer do experimento. Em conjunto, essas informações sugerem que as condições de alojamento e manejo dos animais conferiram-lhes saúde e bem-estar.

No primeiro dia de condicionamento para entrar na caixa de transporte, nove animais já entraram espontaneamente com a oferta da recompensa alimentar. A agilidade e interesse pelo procedimento variaram entre os animais. Devido ao atraso na execução do cronograma do estudo, esse condicionamento foi feito concomitante ao condicionamento para a colheita de sêmen. Assim, alguns animais que, em princípio, entravam na caixa espontaneamente, passaram a não entrar, provavelmente por relacionar com o procedimento seguinte. Sendo assim, passamos a incentivá-los com a introdução de uma mão com luva de couro no

recinto e gentilmente direcionando-os para a caixa. Mesmo assim, não se obteve 100% de sucesso. Iniciou-se então o uso do 'squeeze' da gaiola, o qual foi movido lentamente, sempre com cuidado para não estressar os animais. Esse procedimento também foi utilizado por Dettmer et al. (1996) para o condicionamento de *Cebus apella*. Independente das adaptações ao método, o reforço positivo por meio de recompensa alimentar sempre foi empregado. Assim, após duas semanas de estudo, todos os animais estavam condicionados na caixa.

O condicionamento de *Macaca mulatta* a injeções intramusculares ocorreu em apenas uma semana após treinamentos diários (REINHARDT, 2005; WOLFENSOHN; HONESS, 2005). Já em *Cebus apella* submetidos ao condicionamento para entrar em caixa de transporte e venopunção, apenas quatro dos oito animais aceitaram os procedimentos após 19 dias de treinamento (DETTMER et al., 1996).

Dessa maneira, o condicionamento dos animais nesse estudo foi bem sucedido e confirma a afirmação de que *Saimiri* podem ser facilmente condicionados a entrar em caixa de contenção (LANG, 1968; DUKELOW, 1983; ABEE, 1985). Ao contrário do preconizado por outros autores (DUKELOW, 1983; REINHARDT, 2005; WOLFENSOHN; HONESS, 2005) o sucesso no método foi obtido mesmo ocorrendo concomitante ao condicionamento para as colheitas de sêmen.

O condicionamento para a estimulação e colheita de sêmen também foi bem sucedido de uma forma geral, porém os animais apresentaram resposta comportamental variável ao longo do estudo. Dentre os 12 animais treinados seis animais mostraram-se aparentemente calmos durante os procedimentos ao longo do estudo e um deles ejaculou. Apresentaram-se bastante agitados três animais, exibindo um ou mais dos seguintes comportamentos: emitiam vocalizações altas, defecavam com frequência, direcionavam comportamento agressivo para o tratador ou não aceitavam as estimulações. Esses comportamentos foram exibidos mesmo com todos os esforços de redução de ruídos e iluminação, recompensas alimentares e manutenção da mesma equipe de trabalho. Os outros três animais apresentaram comportamento variável do calmo ao agitado nos diferentes dias de estudo e um deles ejaculou.

Essa variedade de resposta era esperada, inclusive animais que não se condicionariam mesmo após meses de treinamento (DETTMER et al., 1996;

KUEDERLING et al., 2000; REINHARDT, 2005; WOLFENSOHN; HONESS, 2005), fato este reiterado pelo presente estudo.

Curiosamente os itens de maior preferência foram a banana e tenébrios. Os demais itens que não fazem parte da dieta desses animais não tiveram igual aceitabilidade e atratividade.

A escolha do suporte utilizado nesse estudo baseou-se no descrito para colheita de sêmen por vibroestimulação peniana em *Callithrix* (KUEDERLING et al., 2000; SCHNEIDERS; SONKEN; HODGES, 2004; VALLE, 2007), o qual proporcionava um posicionamento mais natural do animal, próximo a posição de cópula. No homem um dos fatores que contribuem para o sucesso da colheita de sêmen por VE é o posicionamento do paciente, com um ângulo ideal de inclinação por volta de 45° (BRACKETT, 1999), porém a posição pode variar de decúbito dorsal (posição supina) a completamente sentado (90°) (BRACKETT, 1999; SONKSEN; OHL, 2002).

Os outros trabalhos com VE em *Saimiri* utilizaram o decúbito ventral (YEOMAN et al., 1997; 1998) ou dorsal (LAVERDE-CORREA E ROBLES-MEDINA, 2001). Ambos tiveram taxas de sucesso na obtenção de ejaculados superiores ao obtido nesse estudo. As possíveis explicações para isso serão discutidas adiante, mas não parecem estar relacionadas ao suporte de colheita como fator principal.

Assim, o suporte adotado pode ser aprimorado na tentativa de contribuir para aumentar o sucesso de colheita de sêmen de *Saimiri*, uma vez que são animais muito agitados e altamente sensíveis a perturbações do ambiente (COE; SMITH; LEVINE, 1985). Esse aprimoramento deve contemplar uma adaptação para eliminar a necessidade de contenção por um técnico durante a estimulação, de forma a permitir: (1) a realização da colheita de sêmen por apenas uma pessoa; (2) a redução do risco de acidentes por mordidas tanto no técnico que está contendo o animal quanto no que desempenha as estimulações; (3) redução da interferência do contato muito próximo entre o técnico e o animal, como estado de humor, disposição ou alerta do técnico.

Cada animal foi estimulado em média 11 vezes. Entre os 12 animais do estudo, apenas dois não apresentaram resposta alguma à estimulação. Para os demais foram observadas respostas que variaram entre ereção do pênis, intumescimento da glândula, contrações da glândula e testículos, movimentos da pelve e ejaculação. Para os dois animais que ejacularam (41 e 63) foi obtido um total de

dezesesseis ejaculados, sendo dez para o animal 41 e seis para o 63. O animal 41 começou a ejacular a partir do 3º dia de estimulação e o 63 a partir do 6º dia.

A taxa de sucesso do estudo calculada sobre o total de estimulações (138) foi de apenas 11,5%. No entanto, os dois animais que ejacularam, apresentaram uma resposta constante ao longo do estudo, com 83,3% de sucesso para o animal 41 e 46,2% para o 63, já que esse começou a ejacular depois.

Em *Saimiri boliviensis* essa taxa de sucesso foi de 90% (9 em 10 animais) (YEOMAN et al., 1997) e 80% (8 em 10 animais) (YEOMAN et al., 1998). Em *S. sciureus* a taxa de sucesso em relação ao número de estimulações foi de 31% (19 ejaculados em 61), porém 63% em relação ao número de animais que ejacularam (7) no total de animais do estudo (11). No entanto, somente dois animais ejacularam em todas as estimulações (LAVERDE-CORREA E ROBLES-MEDINA, 2001).

A taxa de sucesso foi de 49,8% (211 pacientes e 653 tentativas) na colheita de sêmen por VE em homens com lesão em medula espinhal (BRACKETT, 1999).

Em *Callithrix jacchus* a taxa de sucesso na obtenção de ejaculados por VE foi de 35,2% (KUEDERLING et al., 2000) e, após adaptações na técnica empregada, aumentou para 89,2% (SCHNEIDERS; SONKEN; HODGES, 2004). As adaptações realizadas foram incrementos mais rápidos na intensidade do estímulo dependendo da resposta do animal e diminuição do diâmetro do tubo utilizado para a estimulação. Valle (2007) também obteve taxa elevada, 83,3% em animais que nunca haviam participado de colheita de sêmen por técnica artificial.

No presente estudo os incrementos na intensidade dos estímulos também acompanharam a resposta do animal e o diâmetro do tubo de colheita foi planejado conforme o diâmetro estimado da glândula intumescida. Nem todas as ejaculações obtidas foram precedidas de intumescimento completo da glândula, mas quando ele ocorreu, sobrou pouco espaço entre a glândula e a parede do tubo. Assim o diâmetro do tubo de colheita poderia ser reduzido apenas em cerca de 2 ou 3 mm. Outra possibilidade seria diminuir a área do disco estimulador que já vem no aparelho, como realizado por Laverde-Correa e Robles-Medina (2001).

O sucesso da VE também está relacionado à experiência do manipulador (SONKSEN; OHL, 2002) e nesse estudo a experiência foi adquirida ao longo das colheitas.

A ejaculação retrógrada ou retroejaculação é comumente observada na colheita de sêmen por métodos artificiais e influencia na taxa de obtenção de

ejaculados (BRACKETT, 1999; SONKSEN; OHL, 2002). Conforme exposto, a maioria dos animais respondeu bem à estimulação em uma ou mais tentativas de colheita. Em duas ocasiões de suspeita de retroejaculação foram colhidas amostras de urina após as estimulações, porém não foram encontradas células espermáticas na avaliação microscópica.

Assim, além dos ajustes nos métodos de contenção e estimulação dos animais, a baixa taxa de sucesso na obtenção de ejaculados por vibroestimulação peniana observada nesse estudo pode ser atribuída a três principais fatores: (1) variabilidade individual de resposta (já citada anteriormente); (2) sazonalidade; (3) total isolamento dos machos de qualquer forma de contato com fêmeas.

A estação de cópulas da colônia estudada inicia-se em abril/maio indo até outubro/ novembro, baseada numa estimativa em relação à estação de parição. Assim, o estudo foi conduzido justamente durante a estação não reprodutiva.

Yeoman e colaboradores (1997; 1998) realizaram todas as colheitas de sêmen por VE durante a estação reprodutiva dos animais mantidos no Alabama/EUA. No entanto, baseado em estudos anteriores com colheita de sêmen por eletroejaculação em *S. sciureus* esperava-se uma taxa de sucesso mais elevada, mesmo fora da estação reprodutiva (CHEN et al., 1981; DUKELOW, 1983; COE; SMITH; LEVINE, 1985). Nesses estudos foi possível obter ejaculados dentro e fora da estação reprodutiva, porém fora da estação houve redução do volume e aumento do tempo de latência de ejaculação. Latta, Hopf e Ploog (1967) observaram motivação sexual dos machos o ano todo, mas não das fêmeas em ambiente seminatural nos EUA.

Pela análise das médias e desvios padrões expostos no estudo de Chen et al. (1981) alguns valores de volume de ejaculado ficaram muito próximo de zero, por volta de 10 μ L. Em nosso estudo, em duas ocasiões os animais ejacularam volumes semelhantes, mas a avaliação microscópica revelou ausência de espermatozoides.

As condições de luminosidade constantes nas quais os animais foram mantidos ao longo do estudo dificilmente influenciaram inibindo a ejaculação dos animais, pois a sazonalidade reprodutiva é um ritmo endógeno do organismo (COE; ROSEMBLUM, 1978). Indivíduos selvagens transferidos da América do Sul para o hemisfério norte mantiveram a sazonalidade reprodutiva, mesmo em condições ambientais controladas (DUKELOW, 1983).

No momento do ganho de peso anual dos machos também há um aumento na luta pela dominância e agressividade, mesmo na ausência de fêmeas (COE; SMITH; LEVINE, 1985). Segundo os autores, o momento de exibição dessas mudanças direciona para o fato de que ao menos em parte são reguladas endogenamente.

Os fatores ambientais parecem ter mais efeito sobre a sazonalidade reprodutiva nas fêmeas. Nos machos a atividade reprodutiva é, ao menos em parte, estimulada e sincronizada por sinais olfatórios ou de outra natureza vindos das fêmeas (WILSON; BROWN; WILSON, 1978; BALDWIN, 1985; COE; SMITH; LEVINE, 1985). No início da estação de acasalamento o macho aproxima-se das fêmeas adultas com frequência crescente. Esse odor é tão característico que permite ao macho distinguir entre as receptivas e não receptivas.

No estudo de Chen et al. (1981) os animais foram alojados separados das fêmeas, porém não informam se havia contato visual ou olfativo. Nos trabalhos de Yeoman e colaboradores (1997; 1998) os animais estavam alojados em grupos sociais de um macho para oito a 10 fêmeas, grupos isossexuais com dois a cinco machos ou individualmente. Os autores não descrevem se os machos alojados em grupos isossexuais ou individualmente tinham algum contato olfativo com as fêmeas. No estudo de Laverde-Correa e Robles-Medina (2001) os animais foram mantidos em grupos sociais e foram separados apenas no momento das colheitas ou em até 24 horas antes.

Em machos alojados individualmente o padrão anual de secreção de testosterona e ganho de peso diferiu dos animais mantidos em grupos sociais (SCHIMMEL et al., 1999). Os autores acreditam que o contato físico com as fêmeas não é necessário para manifestação da sazonalidade, porém é importante para a sincronização da estação reprodutiva.

A retomada da atividade reprodutiva pode ocorrer rapidamente após a formação de um novo grupo social, mesmo após uma longa fase de quiescência independente da estação do ano (COE; SMITH; LEVINE, 1985). Nas primeiras 24 horas após a formação de um novo grupo tanto macho-macho quanto macho-fêmea houve uma brusca mudança na resposta ejaculatória tornando-a mais próxima a observada na estação de acasalamentos. Segundo os autores, esses resultados indicam que a fisiologia testicular pode modificar-se rapidamente com a formação de um novo grupo, saindo de um estado de relativa inatividade para uma potencial

fertilidade reprodutiva. Essas mudanças foram observadas mesmo nos machos que não apresentaram aumento dos níveis de testosterona, indicando o envolvimento de outros mecanismos hormonais e neurais. Nesse estudo algumas fêmeas conceberam nos primeiros dias após a formação do grupo, indicando que os ciclos ovulatórios podem ser rapidamente retomados pela interação social.

Em momento anterior ao início do presente estudo e durante a estação de acasalamentos foram estimulados 19 animais que nunca haviam sido submetidos a colheita de sêmen por método artificial. Os animais estavam alojados nos grupos coletivos unissexuais, porém com contato visual e olfativo com os indivíduos em recintos heterossexuais próximos. Na ocasião, foram obtidos quatro ejaculados em única estimulação para cada animal (21%), o que representa o dobro da taxa de sucesso obtida ao longo dos seis meses de estudo.

Diante o exposto e considerando que o estímulo para a ejaculação por VE é mais próximo da ejaculação natural (YEOMAN et al., 1998), a manutenção dos machos com algum contato pelo menos olfativo com as fêmeas poderia melhorar a taxa de obtenção de ejaculados.

Fragaszy (1985) observaram que os macacos de cheiro demonstraram reação a fotografias de outros indivíduos da mesma espécie compatível com a observada no grupo social. Na mostra de slides, os animais estudados interessaram-se principalmente por fotografias do gênero oposto. Dessa maneira, uma alternativa seria ainda a mostra de vídeos dos animais nos grupos sociais, incluindo cópulas. Além de uma tentativa de estímulo reprodutivo, seria uma forma de enriquecimento ambiental. Adicionalmente, durante as colheitas, poderiam ser colocados chumaços de algodão embebidos com urina de fêmeas durante a estação de cópulas ou após a administração de estrógeno.

5.2 AVALIAÇÃO DO SÊMEN

A maior parte dos ejaculados foi entre 30 segundos a até cinco minutos de estimulação (média de 1,5 minutos), na combinação de 75 Hz de frequência e 1 mm de amplitude. Essa amplitude é bem menor do que para humanos, onde foi

observada melhor resposta quando empregado amplitudes altas, ou seja 2,5 mm (SONKSEN; BIERING-SORENSEN; KRISTENSEN, 1994; BRACKETT, 1999).

As interações sexuais de *Saimiri* em ambiente seminatural duraram de 5 a 90 minutos, mas as investidas são rápidas e duram de 4 a 22 segundos (BALDWIN; BALDWIN, 1981). O tempo requerido para obtenção do ejaculado no homem variou de 10 segundos a 45 minutos (SONKSEN; OHL, 2002).

O pH variou entre 6,6 e 7,2 e foi menor do que o encontrado por Laverde-Correa e Robles-Medina (2001) com valores entre 7,5 e 9. Todas as amostras coagularam completamente imediatamente após a ejaculação, sem a presença de fração líquida cujo volume pudesse ser medido (Figura 11). O volume foi então estimado pela diferença de volume após a adição de 1 mL de meio diluidor, em tubo graduado. Dessa maneira, o volume dos ejaculados obtidos variou entre 250 e 1100 μL , média de 454,55 μL e foi semelhante ao encontrado por Roussel e Austin (1968) para o sêmen colhido por eletroejaculação. O aspecto do coágulo foi constante nas diferentes amostras, apresentando-se com uma coloração branca amarelada.

Figura 13 – Ejaculado totalmente coagulado, obtido por vibroestimulação peniana em *Saimiri sciureus* - Rio de Janeiro - 2010

Para as análises estatísticas do sêmen entre os 16 ejaculados obtidos foram excluídos os quatro primeiros, pois foram obtidos durante o treinamento das técnicas

e ajustes nos tempos de incubação e avaliação das amostras com e sem a adição de tripsina. Assim, foram analisados sete ejaculados do animal 41 e cinco do 63.

Primeiramente os dados foram avaliados quanto à interação animal e tratamento para cada uma das variáveis analisadas (motilidade, grau de motilidade, movimento retilíneo progressivo, concentração, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e atividade mitocondrial). Visto que não houve interação entre tratamento e animal, ou seja, ambos responderam da mesma forma aos diferentes tratamentos, consideraram-se os dois animais como parte de um mesmo grupo (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise do efeito da interação entre animal e tratamento sobre os parâmetros seminais de *Saimiri sciureus*. Os valores indicam o índice de significância (p) – Rio de Janeiro e São Paulo – 2010/11

Parâmetro	Tratamento	Animal	Tratamento*Animal
Motilidade (%)	0,24	0,44	0,25
Grau de motilidade	0,45	0,33	0,39
Motilidade progressiva (%)	0,52	0,61	0,34
Concentração (x 10 ⁶ spz/ mL)	0,15	<0,0001	0,45
Membrana plasmática íntegra (%)	0,45	0,37	0,14
Acrossomo íntegro (%)	0,16	0,29	0,53
DAB I (%)	0,46	0,41	0,67
DAB II (%)	0,41	0,98	0,79
DAB III (%)	0,97	0	0,48
DAB IV (%)	0,63	0,02	0,49

Índice de significância – p < 0,05

Em seguida, avaliou-se o efeito de cada tratamento nos diferentes tempos de incubação (Tabelas 5 a 7). Foram analisados quatro tratamentos: controle, tripsina 0,5 %, 1 % e 5% e três tempos: 0, 20 e 40 minutos de incubação.

Tabela 5 – Efeito dos tratamentos (controle ou tripsina) sobre os parâmetros analisados do sêmen de *Saimiri sciureus* no tempo 0 de incubação - Rio de Janeiro e São Paulo - 2010/11

Tempo 0 de incubação (médias ± EPM)				
Parâmetro	Controle	Tripsina 0,5%	Tripsina 1%	Tripsina 5%
Motilidade (%)	82,91 ± 2,17	85,00 ± 2,89	88,75 ± 1,25	82,50 ± 2,50
Grau de motilidade	3,50 ± 0,15	3,75 ± 0,25	3,50 ± 0,29	3,25 ± 0,48
Motilidade progressiva (%)	76,25 ± 2,54	75,00 ± 3,53	82,50 ± 1,44	76,25 ± 2,40
Concentração (x 10 ⁶ spz/ mL)	15,08 ± 3,10	17,79 ± 4,92	15,67 ± 5,05	18,15 ± 9,81
Membrana plasmática íntegra (%)	61,80 ± 8,48	71,67 ± 13,64	72,25 ± 4,78	50,00 ± 17,36
Acrossomo íntegro (%)	98,0 ± 0,69	98,25 ± 1,18	99,50 ± 0,29	97,75 ± 0,75
DAB I (%)	72,17 ± 4,02	68,50 ± 12,59	69,75 ± 9,63	67,75 ± 2,80
DAB II (%)	25,33 ± 3,63	28,75 ± 12,38	25,00 ± 7,34	28,25 ± 2,01
DAB III (%)	2,08 ± 0,63	2,75 ± 0,75	4 ± 1,73	3,25 ± 1,43
DAB IV (%)	0,50 ± 0,33	0,00	1,25 ± 0,75	0,75 ± 0,48

Tabela 6 – Efeito dos tratamentos (controle ou tripsina) sobre os parâmetros analisados do sêmen de *Saimiri sciureus* com 20 minutos de incubação - Rio de Janeiro e São Paulo - 2010/11

Tempo 20 minutos de incubação (médias ± EPM)				
Parâmetro	Controle	Tripsina 0,5%	Tripsina 1%	Tripsina 5%
Motilidade (%)	78,37 ± 3,02	75,00 ± 2,89	81,67 ± 1,67	76,25 ± 2,39
Grau de motilidade	3,37 ± 0,20	3,50 ± 0,50	3,67 ± 0,33	3,25 ± 0,48
Motilidade progressiva (%)	67,72 ± 5,37	66,25 ± 5,54	73,33 ± 3,33	70 ± 2,04
Concentração (x 10 ⁶ spz/ mL)	14,57 ± 3,28	17,75 ± 2,50	18,77 ± 6,04	17,47 ± 9,88
Membrana plasmática íntegra (%)	59,37 ± 5,60	66,00 ± 4,35	47,25 ± 14,45	51,00 ± 13,22
Acrossomo íntegro (%)	97,90 ± 0,75 ^{ab}	96,00 ± 0,70^b	99,25 ± 0,48^a	97,50 ± 0,64 ^{ab}
DAB I (%)	68,75 ± 4,47	65,00 ± 15,43	67,50 ± 3,12	62,75 ± 4,17
DAB II (%)	26,91 ± 3,89	34,25 ± 15,44	27,00 ± 2,74	33 ± 2,45
DAB III (%)	4,00 ± 1,30	0,75 ± 0,48	3,25 ± 2,62	2,75 ± 1,55
DAB IV (%)	0,33 ± 0,33 ^{ab}	0,00^b	2,25 ± 1,60^a	1,50 ± 0,87 ^{ab}

Letras diferentes indicam diferença significativa.

Tabela 7 – Efeito dos tratamentos (controle ou tripsina) sobre os parâmetros analisados do sêmen de *Saimiri sciureus* com 40 minutos de incubação - Rio de Janeiro e São Paulo - 2010/11

Tempo 40 minutos de incubação (médias $\pm$ EPM)				
Parâmetro	Controle	Tripsina 0,5%	Tripsina 1%	Tripsina 5%
Motilidade (%)	72,5 $\pm$ 3,23	76,25 $\pm$ 3,75	77,50 $\pm$ 4,79	68,75 $\pm$ 6,58
Grau de motilidade	3,00 $\pm$ 0,25	3,00 $\pm$ 0,41	3,25 $\pm$ 0,25	2,75 $\pm$ 0,62
Motilidade progressiva (%)	62,00 $\pm$ 4,59	71,20 $\pm$ 6,58	68,75 $\pm$ 5,90	65,00 $\pm$ 5,40
Concentração ($\times 10^6$ spz/ mL)	15,36 $\pm$ 3,36	16,50 $\pm$ 3,38	8,08 $\pm$ 1,46	15,68 $\pm$ 5,79
Membrana plasmática íntegra (%)	58,27 $\pm$ 7,31	37,67 $\pm$ 16,41	56,25 $\pm$ 10,99	46,50 $\pm$ 10,99
Acrossomo íntegro (%)	97,25 $\pm$ 0,96	97,00 $\pm$ 1,69	98,00 $\pm$ 1,00	94,50 $\pm$ 2,10
DAB I (%)	69,42 $\pm$ 0,94	56,25 $\pm$ 7,09	51,50 $\pm$ 9,48	65,50 $\pm$ 8,85
DAB II (%)	27,17 $\pm$ 4,22	41,50 $\pm$ 7,55	43,00 $\pm$ 7,50	30,25 $\pm$ 7,67
DAB III (%)	2,58 $\pm$ 0,88	1,25 $\pm$ 0,62	5,50 $\pm$ 3,09	3,50 $\pm$ 1,70
DAB IV (%)	0,83 $\pm$ 0,32	1,00 $\pm$ 0,58	1,50 $\pm$ 1,50	0,75 $\pm$ 0,48

O efeito dos tratamentos foi verificado para tripsina a 0,5 e 1% somente com 20 minutos de incubação e sobre as variáveis integridade do acrossoma e atividade mitocondrial.

A porcentagem média de espermatozoides com acrossomo íntegro foi maior na tripsina a 1% (99,25%) do que com a tripsina a 0,5 % (96%). Essa diferença não tem significado biológico, uma vez que a média de espermatozoides com acrossoma íntegro foi bem elevada, nunca menos do que 90% para todos os tratamentos e tempos de incubação e não houve diferença estatística em qualquer outro momento. E esse constitui um dado importante, pois pode refletir a manutenção da funcionalidade do espermatozoide e sua capacidade de penetração no oócito (PAZ et al., 2006).

O tratamento com tripsina a 1 % também apresentou o maior valor médio, com 2,23 % contra 0 % na tripsina a 0,5 %, para os espermatozoides classificados com grau IV de atividade mitocondrial. Novamente esse dado tem pouca implicação prática em relação ao efeito do tempo e tratamentos sobre essa variável.

Tanto as quantidades de espermatozoides com acrossomos não íntegros quanto classificados em atividade mitocondrial grau IV foram muito baixas. Assim, uma diferença de dois ou três espermatozoides encontrados a mais ou a menos em

determinado esfregaço pode refletir em diferença estatística quando o número total de amostras é pequeno, como no caso desse estudo.

Por último avaliou-se o efeito do tempo de incubação a 37° C em cada tratamento (Tabelas 8 a 11). Foram analisados três tempos: 0, 20 e 40 minutos de incubação e quatro tratamentos: controle, tripsina 0,5 %, 1 % e 5%.

Tabela 8 – Efeito dos tempos de incubação sobre os parâmetros analisados do sêmen de *Saimiri sciureus* sem adição de tripsina (tratamento controle) - Rio de Janeiro e São Paulo - 2010/11

Amostras controle (médias ± EPM)			
Parâmetro	Tempo 0	Tempo 20 min	Tempo 40 min
Motilidade (%)	82,91 ± 2,18^a	78,63 ± 3,02 ^{ab}	72,50 ± 3,22^b
Grau de motilidade	3,50 ± 0,15	3,37 ± 0,20	3,00 ± 0,24
Motilidade progressiva (%)	76,25 ± 2,54^a	67,72 ± 5,37 ^{ab}	62,50 ± 4,60^b
Concentração (x 10 ⁶ spz/ mL)	15,08 ± 3,10	14,57 ± 3,27	15,35 ± 3,36
Membrana plasmática íntegra (%)	61,8 ± 8,50	59,37 ± 5,60	58,28 ± 7,31
Acrossomo íntegro (%)	98,50 ± 0,60	97,90 ± 0,75	97,25 ± 0,96
DAB I (%)	72,17 ± 4,02	68,75 ± 4,47	69,41 ± 4,93
DAB II (%)	25,33 ± 3,63	26,91 ± 3,90	27,17 ± 4,22
DAB III (%)	2,08 ± 0,63	4,00 ± 1,30	2,60 ± 0,88
DAB IV (%)	0,50 ± 0,38	0,33 ± 0,33	0,84 ± 0,32

Letras diferentes indicam diferença significativa.

Tabela 9 – Efeito dos tempos de incubação sobre os parâmetros analisados do sêmen de *Saimiri sciureus* com adição de tripsina a 0,5% - Rio de Janeiro e São Paulo - 2010/11

Amostras Tripsina 0,5% (médias ± EPM)			
Parâmetro	Tempo 0	Tempo 20 min	Tempo 40 min
Motilidade (%)	85,00 ± 2,89	75,00 ± 2,89	76,25 ± 3,75
Grau de motilidade	3,75 ± 0,25	3,50 ± 0,50	3,00 ± 0,40
Motilidade progressiva (%)	75,00 ± 3,53	66,25 ± 5,54	71,25 ± 6,58
Concentração (x 10 ⁶ spz/ mL)	17,79 ± 4,92	17,75 ± 2,50	16,50 ± 3,38
Membrana plasmática íntegra (%)	71,67 ± 13,64	66,00 ± 4,35	37,67 ± 16,41
Acrossomo íntegro (%)	98,25 ± 1,19	96,00 ± 0,70	97,00 ± 1,69
DAB I (%)	68,50 ± 12,59	65,00 ± 15,43	56,25 ± 7,09
DAB II (%)	28,75 ± 12,38	34,25 ± 15,44	41,50 ± 7,55
DAB III (%)	2,75 ± 0,75	0,75 ± 0,48	1,25 ± 0,62
DAB IV (%)	0,00	0,00	1,00 ± 0,58

Tabela 10 – Efeito dos tempos de incubação sobre os parâmetros analisados do sêmen de *Saimiri sciureus* com adição de tripsina a 1% - Rio de Janeiro e São Paulo - 2010/11

Amostras Tripsina 1% (médias ± EPM)			
Parâmetro	Tempo 0	Tempo 20 min	Tempo 40 min
Motilidade (%)	88,75 ± 1,25^a	81,67 ± 1,67 ^{ab}	77,0 ± 4,79^b
Grau de motilidade	3,50 ± 0,29	3,67 ± 0,33	3,25 ± 0,25
Motilidade progressiva (%)	82,50 ± 1,44^a	73,33 ± 3,33 ^{ab}	68,75 ± 5,90^b
Concentração (x 10 ⁶ spz/ mL)	15,68 ± 5,06	18,77 ± 6,03	8,08 ± 1,47
Membrana plasmática íntegra (%)	72,25 ± 4,77	47,25 ± 14,45	56,25 ± 10,98
Acrossomo íntegro (%)	99,50 ± 0,289	99,25 ± 0,48	98,00 ± 1,00
DAB I (%)	69,75 ± 9,62	67,50 ± 3,12	51,50 ± 9,48
DAB II (%)	25,00 ± 7,34	27,00 ± 2,73	43,00 ± 7,49
DAB III (%)	4,00 ± 1,73	3,25 ± 2,62	5,50 ± 3,09
DAB IV (%)	1,25 ± 0,75	2,25 ± 1,60	1,50 ± 1,50

Letras diferentes indicam diferença significativa.

Tabela 11 – Efeito dos tempos de incubação sobre os parâmetros analisados do sêmen de *Saimiri sciureus* com adição de tripsina a 5% - Rio de Janeiro e São Paulo - 2010/11

Amostras Tripsina 5% (médias ± EPM)			
Parâmetro	Tempo 0	Tempo 20 min	Tempo 40 min
Motilidade (%)	82,50 ± 2,50^a	76,25 ± 2,39 ^{ab}	68,75 ± 6,58^b
Grau de motilidade	3,25 ± 0,48	3,25 ± 0,48	2,75 ± 0,62
Motilidade progressiva (%)	76,25 ± 2,39	70,00 ± 0,41	65,00 ± 5,40
Concentração (x 10 ⁶ spz/ mL)	18,15 ± 9,81	17,46 ± 9,88	15,68 ± 5,79
Membrana plasmática íntegra (%)	50,00 ± 17,37	51,00 ± 13,23	46,50 ± 10,10
Acrossomo íntegro (%)	97,75 ± 0,75	97,50 ± 0,64	94,50 ± 2,10
DAB I (%)	67,75 ± 2,80	62,75 ± 4,17	65,50 ± 8,85
DAB II (%)	28,25 ± 2,01	33,00 ± 2,44	30,25 ± 7,66
DAB III (%)	3,25 ± 1,43	2,75 ± 1,54	3,50 ± 1,71
DAB IV (%)	0,75 ± 0,48	1,50 ± 0,87	0,75 ± 0,48

Letras diferentes indicam diferença significativa.

Houve efeito do tempo de incubação apenas para as variáveis motilidade e movimentos progressivos nos diferentes tratamentos, com exceção do tratamento com tripsina a 0,5%. Nos tratamentos controle e tripsina a 1% tanto a variável

motilidade quanto movimentos progressivos foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no tempo 0 do que com 40 minutos de incubação (Tabelas 8 e 10). Para o tratamento com tripsina a 5% somente a motilidade foi significativamente maior em 0 minuto do que com 40 minutos (Tabela 11).

O efeito observado sobre a motilidade e movimentos progressivos parece ter sido provocado apenas pelo tempo de incubação, independentemente do tratamento com tripsina, uma vez que as amostras controle também apresentaram redução desses parâmetros.

Apesar de restrita devido ao reduzido número de amostras, a análise dos resultados em conjunto mostrou não haver efeito da tripsina sobre a dissolução do coágulo seminal. Os tratamentos com a enzima também não provocaram lesões significativas no sêmen pelos parâmetros avaliados, ao contrário do preconizado por outros autores (MORRELL; HODGES, 1998; 2001). Infelizmente o único trabalho que relata o uso de tripsina em *Saimiri* não detalha os efeitos do tratamento as características seminais (ACKERMAN; ROUSSEL, 1968).

Hernández-Lopez et al. (2002) compararam a dissolução mecânica do coágulo e o tratamento com tripsina sobre os parâmetros seminais de *Ateles geoffroy* (macaco aranha). A enzima foi preparada em solução salina tamponada com 0,25% da mesma variedade de tripsina utilizada nesse estudo. A solução foi acrescentada ao sêmen na proporção de 2:3 e as amostras incubadas em banho maria a 37° C, por 10 minutos. A digestão do coágulo pela tripsina mostrou melhores efeitos sobre o sêmen quando comparada à ação mecânica. Houve aumento significativo na concentração dos espermatozóides/mL, porcentagem de espermatozóides íntegros e de espermatozóides com movimento progressivo lento. A porcentagem de movimentos progressivos rápidos mostrou uma tendência ao aumento. A porcentagem de movimentos não progressivos e espermatozóides anormais não foram afetadas.

Em *Cebus apella* (macaco prego) a associação da fragmentação mecânica e meio diluidor contendo água de coco resultou em completa liquefação do coágulo seminal após incubação por 10 minutos (ARAÚJO et al., 2009). No entanto, não foi possível afirmar qual método foi responsável pela diluição do coágulo (fragmentação mecânica ou água de coco) uma vez que ambos foram testados apenas em conjunto. A incisão do coágulo em solução salina já havia se mostrado parcialmente eficiente para o sêmen de *C. apella* (NAGLE; DENARI, 1983). No estudo, o melhor

resultado obtido foi com a utilização de α -quimotripsina a 2%. Paz et al. (2006) verificaram redução na motilidade e vigor espermático em amostras seminais de macaco prego tratadas com tripsina e hialuronidase. No entanto, a utilização dessas enzimas não determinou alteração significativa na integridade do acrossoma, mesmo em dose bem mais elevada (25%) do que a utilizada nesse estudo e recomendada por Nagle e Denari (1983).

Para o maior sucesso na dissolução do coágulo seminal em *Saimiri* deveriam ser conduzidas investigações para caracterização do ambiente vaginal, cervical e uterino, tanto microbiológica quanto bioquímica. Igualmente importante é a caracterização bioquímica desse coágulo.

Assim, enquanto os mecanismos responsáveis pela dissolução do coágulo seminal no trato reprodutor feminino não são totalmente conhecidos, o sucesso da dissolução *in vitro* do coágulo para *Saimiri* parece estar relacionado a um conjunto de ações que envolvem a fragmentação mecânica associada à utilização de enzimas proteolíticas tais como a tripsina ou α -quimotripsina, à semelhança do realizado em outras espécies. As concentrações das enzimas e tempos de incubação ideais carecem de mais estudos, com maior número de ejaculados para uma investigação sistemática do efeito das diferentes combinações sobre as características seminais da espécie.

Os valores de concentração espermática encontrados nesse estudo (de $8,08 \pm 1,46$ a $18,77 \pm 6,04 \times 10^6$ spz/ mL) foram bem menores do que todos os valores descritos anteriormente para a espécie (Tabela 1, Capítulo “REVISÃO DE LITERATURA”). No entanto, foram maiores do que os valores encontrados para *S. boliviensis* para o sêmen obtido por eletroejaculação (YEOMAN et al., 1998). Esse resultado pode ser explicado pela sazonalidade, pois fora da estação de acasalamentos, observou-se diminuição da concentração e motilidade espermáticas em macacos de cheiro (DUKELOW, 1983).

Apesar de estarem fora da estação reprodutiva, os valores de motilidade ($68,75 \pm 6,58$ a $88,75 \pm 1,25$ %), grau de motilidade ($2,75 \pm 0,62$ a $3,75 \pm 0,25$) e movimentos progressivos retilíneos ($62,00 \pm 4,59$ a $82,50 \pm 1,44$ %) foram semelhantes aos observados para os ejaculados obtidos por VE em *S. sciureus* (LAVERDE-CORREA; ROBLES-MEDINA, 2001) e *S. boliviensis* (YEOMAN et al., 1998). Adicionalmente, essas características foram superiores ao encontrado para

Saimiri após estimulação por eletroejaculação (Tabela 1, Seção “REVISÃO DE LITERATURA”).

Em *S. sciureus*, Lang (1968) observaram 79 ± 2 % de espermatozóides com membrana plasmática íntegra e Laverde-Correa e Robles-Medina (2001) $74,99 \pm 17,54$ %. No presente estudo foram encontrados valores um pouco menores $37,67 \pm 16,41$ a $72,25 \pm 4,78$ % e, mais uma vez, pode refletir características seminais obtidas fora da estação de cópulas. Na figura 14A, podem-se observar exemplos de espermatozóides corados pelo método de eosina-nigrosina para avaliação da integridade de membrana plasmática.

Não foram encontradas referências na literatura sobre a integridade do acrossomo e atividade mitocondrial em *Saimiri*.

Apesar da menor porcentagem encontrada para integridade de membrana plasmática, a porcentagem de espermatozóides com o acrossomo íntegro ($94,5 \pm 2,10$ a $99,5 \pm 0,29$) foi elevada e um pouco maior do que o encontrado para *Callithrix jacchus* ($87,12 \pm 7,75\%$) (VALLE, 2007). Essa porcentagem elevada pode refletir uma resistência do acrossomo nos animais estudados, como mencionado anteriormente, tem implicação direta na funcionalidade do espermatozóide e capacidade de ligação ao oócito. Exemplos de espermatozóides corados pelo método descrito por Pope et al. (1996) podem ser observados na figura 14 B.

Figura 14 – Fotomicrografia de espermatozoides de *Saimiri sciureus* corados pelo método de: (A) eosina nigrosina para avaliação de integridade de membrana plasmática, em objetiva 40x e (B) coloração simples para acrossomo, em objetiva 100x, em imersão em óleo. I = íntegro; NI = não íntegro - Rio de Janeiro - 2010/11

As características de morfologia espermática foram avaliadas imediatamente após a colheita e as patologias encontradas estão expostas na tabela 12.

Tabela 12 – Características de morfologia espermática de *Saimiri sciureus* - Rio de Janeiro e São Paulo - 2010/11

Característica	Média (%)
Cabeça subdesenvolvida	0,14
Estreitamento de base	0,29
Grânulo no acrossoma	0,14
Cauda fortemente dobrada	8,43
Cauda fortemente enrolada	1,57
Gota citoplasmática proximal	0,43
Cauda enrolada	1,57
Cabeça isolada	5,43
Cabeça delgada	0,57
Cabeça + peça intermediária	0,57
Cauda dobrada	45,71
Cauda enrolada	1,57
Gota citoplasmática distal	0,14
Defeitos menores	55,56
Defeitos maiores	11

A porcentagem de espermatozóides anormais (66,56%) foi maior do que o reportado para a espécie (3 a 51%) (ACKERMAN; ROUSSEL, 1968; DUKELOW, 1983; LAVERDE-CORREA; ROBLES-MEDINA, 2001). Os defeitos menores foram a maioria (55,56%) e o principal foi cauda dobrada (45,71%). Laverde-Correa e Robles-Medina (2001) também encontraram maior porcentagem de defeitos na cauda ($16 \pm 18\%$), principalmente enrolamentos (8,75%) e ausência de cauda (6,58%). A grande quantidade de cauda dobrada encontrada em no presente estudo deve ter maior relação com o choque térmico nos espermatozóides durante os procedimentos de colheita e avaliação do sêmen do que a uma patologia dos ejaculados avaliados.

5.3 DOSAGENS HORMONAIS

Todas as amostras séricas foram dosadas em um único ensaio, cuja sensibilidade foi de 0,05 µg/ dL (96% B/B0). O coeficiente de variação intra- ensaio baixo foi de 6,53% e alto 1,76% (Tabela 5).

Tabela 13 – Parâmetros de qualidade do ensaio realizado para dosagem de cortisol sérico de *Saimiri sciureus* por radioimunoensaio - São Paulo - 2011

CPM total	Cap. Lig. (B/ B0)	L.N.E (%)	Sensibilidade % (dose ug/dL)	CV intra baixo	CV intra alto
66289	56 %	0,36	96 (0,05)	6,53 %	1,76 %

O perfil das concentrações de cortisol sérico está exposto no gráfico 1. Houve diferença significativa entre as concentrações aferidas em todos os tempos e as concentrações elevaram-se apenas no tempo de 30 a 60 (agrupados no tempo “1 hora”) minutos após o início da contenção para a estimulação e colheita de sêmen. Nas aferições posteriores (6 e 12 horas) as concentrações do hormônio foram abaixo das observadas no tempo 0.

Após a administração intramuscular de ACTH não foi observado pico de secreção de cortisol, mas foi possível verificar uma elevação significativa nas concentrações dos tempos seis e 12 horas após a aplicação do hormônio. Com 24 horas os níveis hormonais ainda eram significativamente maiores do que os mensurados para os animais que receberam a injeção intramuscular com água destilada (Gráfico 2).

Gráfico 1 – Perfil de cortisol sérico de 12 animais da espécie *Saimiri sciureus* em 12 horas monitoramento após o início da contenção física para a estimulação e colheita de sêmen por vibroestimulação peniana. Letras diferentes indicam diferença significativa nas concentrações de cortisol – Rio de Janeiro e São Paulo - 2011

Gráfico 2 – Perfil de cortisol sérico de *Saimiri sciureus* em 24 horas monitoramento após a administração de ACTH sintético (6 animais) ou água destilada (controle, 6 animais). Os asteriscos indicam as concentrações de cortisol no grupo do ACTH significativamente mais elevadas em relação ao grupo controle – Rio de Janeiro e São Paulo – 2010/11

Ao comparar as concentrações do grupo controle com as concentrações dos mesmos animais, aferidas nos mesmos horários, porém nos dias das estimulações para colheita de sêmen, não houve diferença estatística entre os grupos (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Comparação entre as médias das concentrações de cortisol sérico entre os animais da espécie *Saimiri sciureus* utilizados como controle do ensaio hormonal e as concentrações dos mesmos animais antes (tempo 0) e após a contenção para colheita de sêmen – Rio de Janeiro e São Paulo - 2011

O tempo total de contenção dos animais foi de pelo menos uma hora, desde a transferência dos animais para a caixa de contenção, o transporte para a sala de colheita de sêmen, a contenção manual para a vibroestimulação, todo o processo de estimulação em si, até o retorno do animal ao recinto de origem. Todo esse procedimento provocou um estresse agudo nos animais e que interferiu pontualmente no padrão diurno de secreção do hormônio, conforme observado no gráfico 1. O perfil hormonal observado representa uma validação biológica do ensaio hormonal realizado (HEISTERMANN; PALME; GANSWINDT, 2006).

Esse comportamento já havia sido observado para *Saimiri*, porém os tempos de contenção foram curtos, em torno de 15 minutos (WILSON; BROWN; WILSON, 1978; COE; SMITH; LEVINE, 1985; COE; SMITH; LEVINE, 1985).

A não observação de pico nas concentrações de cortisol após a aplicação de ACTH, não anula a validade fisiológica do ensaio, pois ocorreram elevações significativas nos níveis hormonais, mesmo com a tendência natural de queda imposta pelo ritmo diurno de secreção desse hormônio (WILSON; BROWN; WILSON, 1978; COE; LEVINE, 1995) e confirmada no grupo controle.

Para observação de pico nas concentrações hormonais no soro, as colheitas deveriam ter sido desempenhadas em intervalos de até 60 minutos durante quatro a cinco horas, de acordo com recomendações do fabricante para a espécie humana. Porém, em espécies selvagens, repetidas colheitas de sangue em intervalos curtos, por si já constitui em fator de grande estresse e altera a resposta fisiológica do animal (MÖSTL; PALME, 2002). Caso houvesse a necessidade de se detectar o pico hormonal o mais indicado seria dosar os hormônios nas fezes, saliva ou urina (TIEFENBACHER et al., 2003; CROSS; PINERS; ROGERS, 2004; KUGELMEIER et al., 2008)

Os níveis de cortisol em *Saimiri* são bem elevados, chegando a 405 µg/ 100 mL em repouso (DUKELOW, 1983). A capacidade de metabolizar o cortisol é metade da encontrada em primatas do Velho Mundo, enquanto a meia-vida do cortisol é de aproximadamente 79 minutos, similar ao homem (COE; SMITH; LEVINE, 1985). Os mesmos autores sugeriram que a adrenal de *Saimiri* apresenta adaptações morfológicas e enzimáticas para a produção de níveis tão altos de cortisol. Nesse contexto, a glândula é particularmente sensível ao estímulo do ACTH e a pituitária é relativamente insensível ao “*feedback*” negativo do cortisol, uma vez que são necessárias altas doses de dexametasona a fim de inibir a liberação de cortisol por meio da supressão do ACTH.

O comportamento característico do eixo hipotálamo hipófise adrenal em *Saimiri*, aliado a baixa capacidade de ligação dos receptores de cortisol (COE; SMITH; LEVINE, 1985, pode explicar a manutenção dos níveis hormonais acima dos níveis basais observados após 24 horas da administração de ACTH. No grupo controle os níveis hormonais nos tempos 0 e 24 horas não apresentaram diferença significativa.

Quando as concentrações de cortisol do grupo controle foram comparadas com as concentrações dos mesmos animais nos dias de estimulação, a validade do ensaio foi novamente atestada, pois verificou-se que em ambos os grupos o perfil

hormonal foi compatível ao ritmo de secreção esperado para a espécie, nos momentos estudados.

Esse monitoramento hormonal é de fundamental importância para a implantação de programas de treinamento de *Saimiri* para procedimentos de pesquisa e rotina como os realizados nesse estudo, uma vez que são tidos como primatas extremamente susceptíveis ao estresse (DUKELOW, 1983).

Chatterton (1990) e Dettmer et al. (1996) sugerem que o estresse gerado pela contenção para múltiplas colheitas de sangue pode alterar os parâmetros reprodutivos estudados devido à ação dos níveis aumentados de glucorticóides sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. No estudo com *Cebus apella* os níveis de cortisol diminuíram somente após cinco semanas de colheitas de sangue (DETTMER et al., 1996).

Os níveis de cortisol plasmático elevaram-se ao longo das semanas de condicionamento de *Saimiri* após exposições repetidas a sedação com éter e colheita de sangue (COE et al., 1978). Segundo os autores, esses resultados podem indicar uma dificuldade em estabelecer valores basais reais de cortisol para a espécie, bem como um problema potencial na habituação de *Saimiri* a alguns procedimentos experimentais.

Nesse estudo não foi realizado um monitoramento semanal dos níveis de cortisol. No entanto, pelos ensaios realizados em conjunto com as observações do comportamento dos animais durante o estudo e nas sessões de estimulações, pode-se sugerir que os animais, de uma forma geral, foram habituados aos procedimentos realizados.

Em suma, *S. sciureus* apresentam comportamento e fisiologia complexos. Para o sucesso da criação e manejo da espécie em cativeiro, as características endócrino-comportamentais precisam ser conhecidas e consideradas no planejamento dos recintos e condições de alojamento, bem como das atividades diárias e procedimentos experimentais com esses animais.

O maior sucesso no emprego da vibroestimulação peniana para colheita de sêmen de macacos de cheiro parece depender de ajustes nas técnicas de contenção e estimulação, sazonalidade reprodutiva e contato olfativo com as fêmeas.

6 CONCLUSÕES

De acordo com as condições em que foram conduzidas este experimento podemos inferir que:

- Os machos da espécie *Saimiri sciureus* podem ser condicionados ao método de estimulação e colheita de sêmen por vibroestimulação peniana.
- A dosagem de cortisol sérico demonstrou haver uma resposta aguda e não duradoura ao estresse logo após o procedimento de colheita
- É possível colher sêmen de *Saimiri sciureus* pelo método de vibroestimulação peniana, porém a taxa de sucesso na obtenção de ejaculados parece depender de ajustes nas técnicas de contenção e estimulação, da sazonalidade reprodutiva e do contato olfativo com as fêmeas.
- O sêmen, obtido por vibroestimulação peniana, apresentou porcentagens de espermatozóides móveis e com movimentos progressivos retilíneos acima de 60%, mesmo fora da estação de acasalamento.
- Os parâmetros integridade do acrossomo e grau de atividade mitocondrial foram descritos pela primeira vez para a espécie e apresentaram alta porcentagem de integridade.
- O tratamento com a tripsina não foi eficaz para a dissolução do coágulo seminal nas concentrações 0,5, 1 e 5%, nos tempos de incubação de 20 e 40 minutos a 37° C.

REFERÊNCIAS

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.

ABEE, C. R. Medical care and management in squirrel monkey. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 447-488.

ABEE, C. R. Squirrel monkey (*Saimiri* spp) research and resources. **ILAR Journal**, v. 41, n. 1, p. 217-226, 2000.

ADAIR, E. R. Thermoregulation in the Squirrel Monkey. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985. p. 219-252.

ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent Stain Method for the Simultaneous Determination of Mitochondrial Potential and Integrity of Plasma and Acrosomal Membranes in Boar Sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 190-194, 2007.

ANDRADE, M. C. R.; et al. Biologic data of *Macaca Mulatta*, *Macaca fascicularis*, and *Saimiri sciureus* used for research at the Fiocruz Primate Center. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 581-589, 2004.

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.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995. 168 p.

AUSMAN, L. M.; GALLINA, D. L.; NICOLOSI, R. J. Nutrition and metabolism of the squirrel monkey. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 349-378.

AYRES, J.M. On a new species of squirrel monkey, genus *Saimiri*, from Brazilian Amazonia (Primates, Cebidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 36, p. 147-164, 1985.

BALDWIN, J. D. The Behavior of Squirrel Monkeys (*Saimiri*) in Natural Environments. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 35-53.

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. 6, n. 39, p. 331-333, 2002.

BARR, A. B. Timing of spermatogenesis in four nonhuman primate species. **Fertility and Sterility**, v. 24, n. 5, p. 381-389, 1973.

BARRETT, J. E. Behavioral Pharmacology of the Squirrel Monkey. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985. p. 315-348.

BEISCHER, D. E. The squirrel monkey in aerospace medical research. In: ROSENBLUM, L.A; COOPER, R. W. **The Squirrel Monkey**. New York/London: Academic Press, 1968. p. 347-364.

BENNETT, J. P. Semen collection in the squirrel monkey. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 13, p. 353-355, 1967.

BRAVO, P. W.; CCALLO, M.; GARNICA, J. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. **Small Ruminant Research**, v. 38, p. 91-95, 2000.

BRACKETT, N. L. Semen retrieval by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injury. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 3, p. 216-222, 1999.

BRACKETT, N. L.; PADRON, O. F.; LYNNE, C. M. Semen quality of spinal cord injured men is better when obtained by vibratory stimulation versus electroejaculation. **The Journal of Urology**, v. 157, p. 151-157, 1997.

BUTI, T. E. M. ; KUGELMEIER, T. ; FURTADO, P. V. ; NEVES, D. V. D. A. ; VAN TOL, E. M. ; OLIVEIRA, C. A. Validação fisiológica da dosagem de metabólitos de cortisol em extrato fecal de bugio ruivo (*Alouatta guariba clamitans*). In:

CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO LATINOAMERICANA DE PARQUES ZOOLOGICOS, 14 e AQUÁRIOS E ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 16, 2007. São Paulo. **Anais...** São Paulo. local, 2007. p.CD-ROM.

CAFFARO, K. A.; GONCALVES, M. A. B.; BRAVIN, J. S.; GOLDSCHMIDT, B. Enriquecimento ambiental: uma alternativa de bem estar para macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) inseridos na pesquisa biomédica? CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO, 9, 2009. Porto Alegre, **Anais...** Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

CHEN, J. J.; SMITH, E. R.; GRAY, G. D.; DAVIDSON, J. M. Seasonal Changes in Plasma Testosterone and Ejaculatory Capacity in Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*). **Primates**, v. 22, n. 2, p. 253–260, 1981.

COE, C. L.; LEVINE, S. Diurnal and anual variation of adrenocortical activity in the squirrel moneky. **American Journal of Primatology**, v. 35, n. 4, p. 283-292, 1995.

COE, C. L.; MENDOZA, S. P.; DAVIDSON, J. M.; SMITH, E. R.; DALLMAN, M. F.; LEVINE, S. Hormonal response to stress in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Neuroendocrinology**, v. 26, p. 367-377, 1978.

COE, C.L.; ROSENBLUM, L. A. Annual reproductive strategy of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Folia Primatologica**, v. 29, p. 19-42, 1978.

COE, C. L.; SMITH, E. R.; LEVINE, S. The endocrine system of the squirrel monkey. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of squirrel monkey research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 191-218.

COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. The squirrel monkeys, genus *Saimiri*. In: BALDWIN, J.D.; BALDWIN, J.I. **Ecology and behavior of neotropical primates**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1981. p. 277-330.

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

COSTELLO, R.K.; DICKINSON, C.; ROSENBERGER, A. L.; BOINSKI, S.; SZALAY, F. S. Squirrel monkey (genus *Saimiri*) taxonomy: a multidisciplinary study of the biology of the species. In: KIMBEL, W.H.; MARTIN, L.B. **Species, species concepts, and aprimate evolution**. New York: Plenum Press, 1993, p. 177-210.

CRESPILHO, A. M.; LANDING-ALVARENGA, F. C.; PAPA, F.O. Infertilidade associada a defeito microtubular em jumentos (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, 2006.

CROSS, N.; PINES, M. K.; ROGERS, L. J. Saliva Sampling to Assess Cortisol Levels in Unrestrained Common Marmosets and the Effect of Behavioral Stress. **American Journal of Primatology**, v. 62, p. 107-114, 2004.

CUMMINS, J. M.; WOODALL, P. F. On Mammalian sperm dimensions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 153-175, 1985.

DENIS, L. T.; POINDEXTER, A. N.; RITTER, M. B.; SEAGER, S. W. J.; DETER, R. L.. Freeze preservation of squirrel monkey sperm for use in timed fertilization studies **Fertility and Sterility**, v. 27, n. 6, p. 723-726, 1976.

DETTMER, E. L.; PHILLIPS, K. A.; RAGER, D. R.; BERNSTEIN, I. S.; FRAGASZY, D. M. Behavioral and cortisol responses to repeated capture and venipuncture in *Cebus apella*. **American Journal of Primatology**, v. 38, p. 357-362, 1996.

DIXSON, A. F.; ANDERSON, M. J. Sexual selectin and the comparative anatomy of reproduction in monkeys, apes, and human being. **Annual Review of Sex Research**, v.12, p. 121-144, 2001.

DIXSON, A. F.; ANDERSON, M. J. Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates. **Folia Primatologica**, v. 73, n. 2-3, p. 63-69, 2002.

DUKELOW, W. R. Reproductive cyclicity and breeding in the Squirrel Monkey. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of squirrel monkey research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 169-190.

DUKELOW, W. R. Semen and artificial insemination. In: Hafez, E. S. E. **Comparative Reproduction of Nonhuman Primates**. Illinois: Charles C. Thomas Publisher, 1971. p. 115-127.

DUKELOW, W. R. The Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). In: HEARN, J. P. **Reproduction in New World Primates: New Models in Medical Science**. Lancaster: MTP Press Limited, 1983, p. 149-180.

DUMOND, F. V. The Squirrel monkey in a seminatural environment. In: ROSENBLUM, L.A. Cooper, R. W. **The Squirrel Monkey**. New York/London: Academic Press, 1968. p. 87-145.

DURRANT, B. S. Captive breeding of wildlife. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: San Diego Academic Press, 1998, v. 4, p. 458-467.

DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J. The ancestral karyotype of platyrrhini monkeys. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v.30, p.232-242, 1981

ESTRADA, A. GARBER, P. A. Comparative perspectives in the study of South American Primates: Research Priorities and Conservation Imperatives. In: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; BICCA-MARQUES, J. C.; HEYMANN, E. W.; STRIER, K. B. **South American primates: comparative perspectives in the study of behavior ecology and conservation**. New York: Springer, 2009. p. 506-531

FOGEL, T. A. Cytogenetic search for somatic segregation and nor variability in *Samiri sciureus*. **Genetics**, v. 107, p. 33, 1984.

FIGENSCHAU, Y.; BERTHEUSSEN, K. Enzymatic treatment of spermatozoa with a trypsin solution, Sperm Solute: improved motility and enhanced ATP concentration. **International Journal of Andrology**, v. 22, p. 342-344, 1999.

FRAGASZY, D. M. Cognition in Squirrel Monkeys: A Contemporary Perspective. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985. p. 55-98.

FULLER, P. J.; SMITH, B. J.; ROGERSON, F. M. Cortisol resistance in the New World revisited. **Trends in endocrinology and metabolism**, v. 15, n. 7, p. 296-299, 2004.

GAGE, M. J. G.; FRECKLETON, R.P. Relative testis size and sperm morphometry across mammals: no evidence for an association between sperm competition and sperm length. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 270, p. 625-632, 2003.

GARRAUD, O. **Contribution à la caractérisation d'effecteurs cellulaires du système immunitaire chez le singe écureuil (*Saimiri sciureus*): application à l'étude expérimentale des paludismes humains**. 1993. 403f. Tese (Doutorado) – Universidade de Paris, França, 1993

GONÇALVES, M. A. B.; CASTRO, P. H. G.; BRAVIN, J. S.; FASANO, D. M.; ANDRADE, M. C. R. Dois modelos de enriquecimento ambiental para micos-de-cheiro. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 8, 2008. Acre. **Anais...** Rio Branco: Universidade Federal do Acre, 2008.Cd-rom

GOODALL, J.; MITTERMEIER, R. **The pictorial guide to the living primates.**, Hong Kong: Pogonias Press, 1999, 263 p.

GOULD, K.G.; MARTIN, D. E. Artificial insemination of nonhuman primates. In: BENIRSCHKE, K. **Primates: The road to self-sustaining populations.** New York: Springer Verlag, 1986. p. 425-443.

GROVES, C. The taxonomy of primates in the laboratory context. In: WOLF-COOLE, S. **The Laboratory Primate.** London: Elsevier Academic Press, 2005. p. 3-15.

GUIMARÃES, M. A. B. V.; et al. Morphometry of the spermatozoa from capuchin monkey (*Cebus apella*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 88-90, 2002.

HAFEZ, E. S. E; JASZCZAK, S. Sperm transport in the female tract of nonhuman primates. **Inserm Colloque**, v. 26, p. 143-163, 1973.

HANSON, H. M. Use of squirrel monkey in pharmacology. In: ROSENBLUM, L.A. Cooper, R. W. **The Squirrel Monkey.** New York/London: Academic Press, 1968. p. 365-392.

HEISTERMANN, M.; PALME, R.; GANSWINDT, A. Comparison of different enzymeimmunoassay for assessment of adrenocortical activity on primates based on fecal analysis. **American Journal of Primatology**, v. 68, p. 257-273, 2006.

HENDRICKX, A. G.; DUKELOW, W. R. Reproductive biology. In: BENNETT, B. T. ABEE, C. R., HENRICKSON, R. **Nonhuman primates in biomedical research: biology and management.** San Diego: Academic Press, 1995, p.147-191.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; PARRA, G. C.; CERDA-MOLINA, A. L.; PÉREZ-BOLAÑOS, S. C.; CEBALOS, R. M. Digestion by trypsin enhances assessment of sperm parameters in the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **Laboratory Primate Newsletter**, v. 41, n. 3, p. 4-6, 2002.

HERSHKOVITZ, P. Taxonomy of squirrel monkeys, genus *Saimiri* (Cebidae, Platyrrhini): a preliminary report with a description of a hitherto unnamed form. **American Journal of Primatology**, v. 4, p. 209-243, 1984.

HEWITSON, L. Primates models for assisted reproductive technologists. **Reproduction**, v. 128, p. 293-299. 2004.

HILL, W. C. O. Genus *Saimiri* Voigt, 1831. In: HILL, W. C. O. **Primates: Comparative Anatomy and Taxonomy 4 Cebidae Part A**. Edinburgh: The Edinburgh University Press, 1960. p. 251-319.

HOSKINS, O. D.; PATTERSON, D. L. Prevention of coagulum formation with recovery of motile spermatozoa from rhesus monkey semen. **Journal Reproduction Fertility**, v. 13, p. 337-340, 1967.

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

INGBERMANN, B.; STONE, A.I.; CHEIDA, C.C. Gênero *Saimiri* (VOIGT, 1831). In: REVIS, N. R.; PEROECH, A.L; ANDRADE, F.R. (orgs). **Primatas do Brasil**. Londrina: Technical Book Editora, 2008. p. 41-46.

IPS International Guidelines for the Acquisition, Care and Breeding on Nonhuman Primates. 2ª edição. UK/USA: International Primatological Society, 2007, 76pp.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2009.2. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acesso em 10 mar. 2010.

JACOBS, G. Visual system of the squirrel monkey. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 219-252.

KALTER, S. S. Immunology and pathology of the squirrel monkey. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 379-445.

KHOLKUTE, S. D.; GOPALKRISHNAN, K.; PURI, C.P. Variations in seminal parameters over 12-month period in captive bonnet monkeys. **Primates**, v. 41, n. 4, p. 393-405, 2000.

KUEDERLING, 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, p. 149–154, 2000.

KUGELMEIER, T.; VALLE, R. R.; MONTEIRO, F. O. B. Biologia da reprodução. In: ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R.; MARINHO, A. M.; FILHO, J. F. **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2010. p. 57-107.

KUGELMEIER, T.; GONCALVES, M. A. B. ; ANDRADE, M. C. R.; FERNANDES, I. C.; FURTADO, P. V.; OLIVEIRA, C. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; LIMA, M. R. Mensuração dos níveis de glicorticóides em extratos fecais de macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) cativos. In: _____ **Anais...** São Paulo: FMVZ/USP, 2008. Cd-rom

LATTA, J.; HOPF, S.; PLOOG, D.W. Observation of mating behavior and sexual play in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Primates**, v. 8, p. 229-245, 1967.

LATTA, J.; HOPF, S.; PLOOG, D.W. Observation of mating behavior and sexual play in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Primates**, v. 8, p.229-245, 1967.

LAU, Y.F. ARRIGHI, F.E. Studies of the squirrel monkey *Saimiri sciureus* genome. Cytogenetical characterization chromosomal heterozigosity. **Cytogenetics cell genetics**, v.17, p. 51-60, 1976.

LAU, Y.F.; ARRIGHI, F. E.; CHUANG, C. R. Studies of the squirrel monkey *Saimiri sciureus* genome.II C-band characterization and DNA replication patterns. **Cytogenetics cell genetics**, v.19, p. 14-25, 1977

.

MENDOZA, S. P.; LOWE, E. L.; DAVIDSON, J. M.; LEVINE, S. Annual cyclicity in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): The relationship between testosterone, fattening, and sexual behavior. **Hormones and Behavior**, v. 11, p. 295-303, 1978.

MENDOZA, S. P. Squirrel monkeys. In: Poole, T. **The UFAW Hanbook on the Care and Management of the Laboratory Animals**. Oxford: Blackwell Science, 1999. p. 591-600.

MA, N. S. F.; JONES, T. C.; THORINGTON, R. W.; COOPER, R. W. Chromosome banding patterns in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Journal of Medical Primatology**, v. 3, p. 120-137, 1974.

MASON, G. Stereotypes: a critical review. **Animal Behavior**, v. 41, p. 1015-1037, 1991.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v.105, n. 1-2, p. 104-118, 2008.

MORHED, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M. HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparation of leucocytes in human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v. 20, p. 613-616, 1960.

MOORMAN, E. A.; MENDOZA, S. P.; SHIDELER, S. E.; LASLEY, B. L. Excretion and Measurement of Estradiol and Progesterone Metabolites in the Feces and Urine of Female Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*). **American Journal of Primatology**, v. 57, p. 79-90, 2002.

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

MORRELL, J. M.; HODGES, J. K. Germplasm cryopreservation of nonhuman primates. In: WATSON, P. F.; HOLT, V. V. V. **Cryobanking the Genetic Resource: Wildlife Conservation for the Future?** London: Taylor and Francis, 2001. p. 408-426.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 67-74, 2002.

MOURA, A. M. A.; VIANA, C. F.; FASANO, D. M.; BRAVIN, J. S.; NASCIMENTO, L. W F. Manutenção em cativeiro. In: ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R.; MARINHO, A. M.; FILHO, J. F. **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não-humanos na pesquisa Biomédica**. Rio de Janeiro: editora Fiocruz, 2010. p. 161-206.

NAGLE, C. A.; DENARI, J. H. The Cebus Monkey (*Cebus apella*). In: HEARN, J. **Reproduction in New World Monkeys: new models in medical sciences**. Lancaster: MTP Press Limited, 1983. p. 39-67.

NEWMAN, J. D. Squirrel monkey communication. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 99-126.

NRC (National Research Council). **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, D. C.: National Academy Press, 1996, 124pp.

NRC (National Research Council). **Nutrient Requirement of Nonhuman Primates**. 2ª ed. Revisada. Washington: The National Academies Press, 2003, 308pp.

PAZ, R. C. R.; ZOCARIOTTI, R. L.; TEIXEIRA, R. N.; GUIMARÃES, M. A. B. O efeito das enzimas hialuronidase e tripsina na liquefação do sêmen de macacos-prego (*Cebus apella*), v. 43, n. 2, p. 196-201, 2006.

PISSINATTI, A.; GOLDSCHMIDT, B.; SOUZA, I. V. Taxonomia. In: ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R.; MARINHO, A. M.; FILHO, J. F. **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2010. p. 41-55.

PIZZUTTO, C. S.; SGAI, M. G. F. G.; VIAU, P.; CHELINI, M. O. M; OLIVEIRA, C.A. ; GUIMARÃES, M. A. B. V. Validação laboratorial e fisiológica de conjunto comercial para a quantificação de corticóides fecais em chimpanzé (*Pan troglodytes*) e orangotango (*Pongo pygmaeus*), cativos e submetidos a enriquecimentos ambientais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 104-110, 2008.

PIZZUTO, C. S.; SGAI, M. G. F. G.; FURTADO, P.V.; CHELINI, M. O. M; OLIVEIRA, C. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Validação laboratorial e fisiológica de conjunto comercial para a quantificação de corticóides fecais em chimpanzé (*Pan troglodytes*) e orangotango (*Pongo pygmaeus*), cativos e submetidos a enriquecimentos ambientais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 104-110, 2008.

POPE, C. E.; ZANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

PRESCOT, M. J.; BOWELL, V. A.; BUCHANAN-SMITH, H. M. Training laboratory-housed non-human primates, part 2: Resources for developing and implementing training programmes. *Animal Technology and Welfare*, 2005. Disponível em:

<http://www.psych.stir.ac.uk/steff/hbuchanan/documents/prescottetal_trainigprimatesPart2.pdf>. Acesso em: out. 2010.

REINHARDT, V. Environmental enrichment and refinement of handling procedures. In: WOLFE-COOTE, S. **The Laboratory Primate**. London: Elsevier Academic Press, 2005. p. 209-229.

ROBINSON, J.G; JANSON, C.H. Capuchins, squirrel monkeys, and atelines: Socioecological Convergence with Old World Primates. In: B. B. SMUTS; D. L. CHENEY; R.M. SEYFARTH; R. W. WRANGHAM; T. T. STRUHSAKER. **Primate Societies**. Chicago: Chicago University Press, 1987. p. 69-82.

ROSENBLUM, L.A. Some aspects of female reproductive physiology in the squirrel monkey. In: ROSENBLUM, L.A; COOPER, R. W. **The Squirrel Monkey**. New York: Academic Press, 1968. p.147-169.

RUMBAUGH, D. M. Learning and sensory capacities of *Saimiri*. In: ROSENBLUM, L.A. COOPER, R. W. **The Squirrel Monkey**. New York/London: Academic Press, 1968. p. 255-317.

RYLANDS, A. B.; RODRIGUEZ-LUNA, E. Assessment of the diversity of New World primates. **Neotropical Primates**, v. 8, n. 2, p.61-93, 2000.

SAS. The Statistical Analyze Systems for Windows v. 8. Cary, 1999-2001.

SCAMMELL, J. G.; WESTBERRY, J. M.; SADOSKY, P. W.; HUBLER, T. R.; WILLIAMS, L. E.; GIBSON, S. V.; SINGH, R. J.; TAYLOR, R. L.; SHACKLETON, C. H. L. Cortisol metabolism in the bolivian squirrel monkey (*Saimiri boliviensis boliviensis*). *Comparative Medicine*, v. 56, n. 2, p. 128-135, 2006.

SCHIML, P. A.; MENDONZA, S.P.; SALTMAN, W.; LYONS, D.M.; MASON, W.A. Annual physiological changes in individually housed squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *American Journal of Primatology*, v. 47, p. 93-103, 1999.

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.

SETTLAGE, D. S. F.; HENDRICKX, A. G. Observations on coagulum characteristics of the Reshus monkey electroejaculate. **Biology of Reproduction**, v. 11, p. 619-623, 1974

SMITH, T. E.; MCCALLISTER, J.M.; GORDON, S. J.; WHITTICAR, M. Quantitative data on training new world primates to urinate. **American Journal of Primatology**, v. 64, p. 83-93, 2004.

SONKSEN, J.; OHL, D. A. Penile vibratory stimulation and electroejaculation in the treatment of ejaculatory dysfunction. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 324-332, 2002.

SONKSEN, J.; BIERING-SORENSEN, F.; KRISTENSEN, J. K. Ejaculation induced by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injuries. The importance of the vibratory amplitude. **Paraplegia**, v. 32, p.651-660, 1994.

STEINBERG, E.R.; NIEVES, M.; ASCUNCE, M.S.; PALERMO, A.M.; MUDRY, M.D. Morphological and genetic characterization of *Saimiri boliviensis*. **International Journal of Primatology**, v. 30, p. 29-41, 2009.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics a biometrical approach**. New York: McGraw-Hill, 1997, p. 666

STONE, A. I. Responses of squirrel monkeys to seasonal changes in food availability in an Eastern Amazonian rainforest. *American Journal of Primatology*, v. 69, p. 142-157, 2007.

STRICKLAND, H. L.; CLARKSON, T. B. Use of Squirrel Monkeys in Cardiovascular Research. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 295-313.

TAUB, O. M.; ADAMS, M. R.; AUERBACH, K. G. Reproductive performance in a breeding colony of Brazilian squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Laboratory Animal Science**, v. 28, n. 5, p. 562-566, 1978.

THOISY, B.; LOUGUET, O.; BAYART, F.; CONTAMIN, H. Behavior of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) – 16 years on an Island in French Guiana. **Neotropical Primates**, v. 10, n. 2, p. 73-76, 2002.

THORINGTON, Jr., R., W. Observation of squirrel monkeys in a colombian forest. *In*: Rosenblum, L.A. Cooper, R. W. **The Squirrel Monkey**. New York/London: Academic Press, 1968. p. 69-85.

TORRES, L. B.; ARAUJO, B. H. S.; CASTRO, P. H. G.; CABRAL, F. R.; MARRUAZ, K. S.; ARAUJO, M. S.; SILVA, S. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; CAVALHEIRO, E. A. The use of New World primates for biomedical research: an overview of the last four decades. **American Journal of Primatology**, v. 72, p. 1055–1061, 2010.

TREVINO, H. S. Seasonality of reproduction in captive squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **American Journal of Reproduction**, v. 69, p. 1001-1012, 2007.

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, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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

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

WIEBE, R. H.; WILLIAMS, L. E.; ABEE, C. R.; YEOMAN, R. R.; DIAMOND, E. J. Seasonal changes in serum dehydroepiandrosterone, androstenedione, and testosterone levels in the squirrel monkey (*S. bolivienses bolivienses*). **American Journal of Primatology**, v.14, p.285-291, 1988.

WILDT, D. E. Male reproduction: assessment, management, and control of fertility. *In*: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKIN, S. **Wild animals in captivity: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press, 1996, p. 429-450.

WILDT, D. E. Spermatozoa: collection, evaluation, metabolism, freezing, and artificial insemination. In: DUKELOW, W.R.; ERWIN, J. **Comparative Primate Biology**, v.3. Reproduction and Development. New York: Alan R. Liss, Inc, 1986. p. 171-193.

WILLIMS, L. Aging Cebidae In: ATSALIS, S.; S.W. MAGULIS, S.W. **Primate Reproductive Aging: cross-taxon perspectives**. Switzerland: Ed Karger v. 36, 2008, p.49-61.

WILSON, M. I. Characterization of the oestrus cycle and mating season of squirrel monkeys from copulatory behavior. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 57-63, 1977.

WILSON, M. I.; BROWN, G. M.; WILSON, D. Annual and diurnal changes in plasma androgen and cortisol in adult male squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) studied longitudinally. **Acta Endocrinologica**, v. 87, p. 424-433, 1978.

WOLF, D. P. Artificial insemination and the assisted reproductive technologies in non-human primates. **Theriogenology**, v. 71, p.123-129, 2009.

WOLFENSOHN, S.; HONESS, P. Training of Primates. In:____. Handbook of Primate Husbandry and Welfare. Oxford: Bookwell Publishing Ltd, 2005. p. 115-128.

YEOMAN, R. R.; SONKSEN, J.; GIBSON, S. V.; RISK, 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.

YEOMAN, R. R.; RICKER, R. B.; WILLIAMS, L. E.; SONKSEN, J.; ABEE, C. R. Vibratory stimulation of ejaculatory yields increased motile spermatozoa, compared with electroejaculation, in squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 36, n. 1, p. 62-64, 1997.

APÊNDICE A

Fiocruz

Serviço de Criação de Primatas não Humanos
SCPrim

Centro de Criação de Animais de Laboratório

FICHA DE EXAME ANDROLÓGICO			
Data: ____ / ____ / ____			
Dados do Animal			
Identificação:	Espécie:	Idade/ Nasc.:	
Micrichip:	Procedência:	Recinto:	
Histórico:			
Exame clínico geral			
Peso (kg):	Aspecto geral		
T °C:	Cond. Corporal:	Pelagem:	
Ausculta cardio-pulmonar:		Palpação e percussão abdominal:	
Avaliação oral:			
Observações:			
Biometria (cm)			
Circ. Craniana:	Outras medidas:		
Circ. Torácica:			
Corpo-cabeça:			
Exame clínico especial			
Prepúcio:		Pênis:	
Bolsa escrotal:		Inser. Lig. Escrotal:	
Testículo	Direito	Esquerdo	
Circunferência escrotal (cm)	Larg.: Comp.:	Larg.:	Comp.:
Simetria			
Comprimento (cm)			
Largura (cm)			
Consistência			
Mobilidade			
Epidídimo	Direito	Esquerdo	
Cabeça			
Corpo			
Cauda			
Observações:			
Exames complementares:			

APÊNDICE B

Fiocruz

Serviço de Criação de Primatas não Humanos

SCPrim

Centro de Criação de Animais de Laboratório

FICHA DE EXAME ANDROLÓGICO - Espermograma

Dados do Animal

Identificação:	Espécie:	Idade/ Nasc.:
----------------	----------	---------------

Micrichip:	Procedência:	Recinto:
------------	--------------	----------

Exame do sêmen - Análise geral

Colheita (método):

Data/ Hora							
Freq/ amp./ volt							
Aspecto/ coágulo							
Volume (µL)							
Cor							
pH							
[] (x 10 ⁶ / mL)							
Motilidade (%)							
MPL (%)							
IMP (%)							
IA (%)							
DAB, classes I/ II/ III/ IV							
Outros:							

Exame do sêmen - Morfologia

Cab. sub-desenv./ dupla							
Piriforme/ estreita base							
Cauda dupla/ enrolada							
Cab. isolada/ Cab. + P. I.							
Grânulo/ vacúolo acros.							
CFD/ CFE							
GCD/ GCP							
CDEG							
Cab. gigante/ delgada							
Total defeitos maiores							
Total defeitos menores							

Observações/ Conclusão:

Legenda: Freq. = frequência

Amp. = amplitude

Volt. = voltagem

[] = concentração

MPL = motilidade progressiva linear

IMP = membrana plasmática íntegra

IA = acrossoma íntegro

DAB = atividade mitocondrial

Cab. = cabeça

P. I. = peça intermediária

Acros. = acrossomo

CFD = cauda fortemente dobrada

CFE = cauda fortemente enrolada

GCD = gota citoplasmática distal

GCP = gota citoplasmática proximal

CDEG = cauda dobrada ou enrolada com gota

APÊNDICE C

Estímulos para colheita de sêmen por vibroestimulação peniana em *Saimiri sciureus*

Frequência (Hz)	Amplitude (mm)	Tempo (minutos)
75	1	2 a 3
Repetir por até 3 vezes com intervalo de 30 segundos		
80	1	2 a 3
Repetir por até 3 vezes com intervalo de 30 segundos		
75	1,5	2 a 3
Repetir por até 3 vezes com intervalo de 30 segundos		
80	1,5	2 a 3
Repetir por até 3 vezes com intervalo de 30 segundos		
90	1,0	2 a 3
Repetir por até 3 vezes com intervalo de 30 segundos		

Liberar o animal em até 20 minutos de estimulação sem ejacular.

APÊNDICE D

Meio diluidor TALP – HEPES

Componentes	Concentração (g/ 500ml)
NaCl	3,710
KCl	0,118
NaHCO ₃	0,084
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	0,021
Na Lactate	930 µl
MgCl ₂ x6H ₂ O	0,050
Glucose	0,4505
Hepes (Na-salt)	0,651
Hepes (Acid)	0,596
Phenolrot	0,0050
Bi-dest. H ₂ O	/500ml
pH	7,33

Preparo para a colheita:

TALP HEPES s/ Ca	5 mL
BSA Fraction V	15 mg (0.3 %)
Piruvato sódico	0,25 mM*

* Solução Stock de Piruvato Sódico: 0.25 mM → 0.0275 g = 27.5mg / 10 mL Bi-dest. H₂O

- a) Colocar TALP em tubo Falcon estéril.
 - b) Adicionar BSA Fraction V, não mexer, deixar diluir em repouso a 37° C.
 - d) Retirar 50 µL do TALP com BSA e adicionar 50 µL de Piruvato Stock.
 - e) Medir e pH=7,33 !!!
 - f) Filtrar em filtro estéril de 0,2 µm.
 - g) Manter em aquecimento.
- ** Após preparado, duração de 1 dia a 4°C.