

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

FERNANDA MARIA DE CARVALHO

Criopreservação de sêmen de primatas não-humanos

São Paulo
2016



FERNANDA MARIA DE CARVALHO

Criopreservação de sêmen de primatas não-humanos

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. Mario Binelli

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2016

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.3323
FMVZ

Carvalho, Fernanda Maria de
Criopreservação de sêmen de primatas não-humanos / Fernanda Maria de Carvalho.
-- 2016.
173 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mario Binelli

1. Congelação. 2. DHA. 3. Espermatozoide. 4. FIV. 5. Vitamina E. 6. Trolox.
7. Vitrificação. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Criopreservação de sêmem de primatas não-humanos”, protocolado sob o nº 2724/2012, utilizando 7 (sete) primatas, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Mario Binelli, 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 28/11/2012.

We certify that the Research “Evaluation of different cryopreservation methods and the effect of treatment with anti-oxidant agents in the post-thaw seminal characteristics of howler monkeys (*Alouatta caraya*)”, protocol number 2724/2012, utilizing 7 (seven) monkeys, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, 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 11/28/2012.

São Paulo, 7 de abril de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente



OREGON
HEALTH & SCIENCE
UNIVERSITY

George J. Haluska, Ph.D.
Research Integrity Officer
Oregon National Primate Research Center
505 NW 185th Avenue
Beaverton, OR 97006
Phone (503) 690-5289
FAX (503) 690-5532

This is a copy of the original IACUC approval letter

MEMORANDUM

Date: 9/12/2014

To: Jon Hennebold

Protocol Number: IS00003792

Protocol Name: 0095: Assisted Reproductive Technologies Support Core

Date of Approval: 9/12/2014 Expiration Date: 9/11/2017

Type of Review: 3 Year Renewal

The IACUC reviewed your protocol and considered:

1. Whether there are any alternatives to the animal usage proposed in this protocol;
2. Whether there are any alternatives to the painful procedures in this protocol;
3. Whether the research protocol unnecessarily duplicates previous research;
4. Whether all of the assurances provided by the investigator(s) conform to current OLAW regulations as stipulated in assurance number A3304-01.

This protocol includes a project titled: "Cryopreservation of spermatozoa from Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and assessment of frozen-thawed semen quality by IVF" being conducted by Fernanda De Carvalho, DVM

The new protocol has been approved.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CARVALHO, Fernanda Maria

Título: Criopreservação de sêmen de primatas não-humanos

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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

**Dedicatória
*in memoriam***

Ao querido Prof. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães



Dedico esse trabalho a uma grande pessoa, que fez parte da minha vida por um momento muito breve, mas extenso o suficiente para que criasse, em mim, um sentimento de admiração e apreço enormes. O Prof. Marcelo era uma pessoa de sorriso fácil, sempre bem-humorado, mesmo nos piores momentos. Era um orientador preocupado não só com o cumprimento das normas e regras, mas também com o crescimento pessoal e profissional do aluno. Não havia como dar só uma “passadinha” em sua sala. Toda vez que o encontrava, tínhamos longas conversas sobre assuntos diversos. Sentirei muita falta dessas nossas enriquecedoras conversas. Sentirei muita falta dessa pessoa maravilhosa que ele era. Agradeço a ele pelo privilégio de ter sido sua orientada, pelos ensinamentos e pela confiança que ele depositou em mim, durante nossa breve convivência. Que ele esteja em paz onde quer que esteja.

Abaixo, transcrevo dois poemas. O primeiro acredito que reflita o sentimento de todos os que ficaram, enquanto o segundo, acredito refletir o que ele nos diria, se pudesse nos dar o último conselho.

HORÁRIO DO FIM

morre-se nada

quando chega a vez

é só um solavanco

na estrada por onde já não vamos

morre-se tudo

quando não é o justo momento

e não é nunca

esse momento

Mia Couto (1999) - "Raiz de Orvalho e Outros Poemas"

A MORTE NÃO É NADA

A morte não é nada.

Eu somente passei

para o outro lado do Caminho.

Eu sou eu, vocês são vocês.

O que eu era para vocês,

eu continuarei sendo.

Me dêem o nome

que vocês sempre me deram,

falem comigo

como vocês sempre fizeram.

Vocês continuam vivendo

no mundo das criaturas,

eu estou vivendo

no mundo do Criador.

Não utilizem um tom solene

ou triste, continuem a rir

daquilo que nos fazia rir juntos.

Rezem, sorriam, pensem em mim.

Rezem por mim.

Que meu nome seja pronunciado

como sempre foi,

sem ênfase de nenhum tipo.

Sem nenhum traço de sombra

ou tristeza.

A vida significa tudo

o que ela sempre significou,

o fio não foi cortado.

Porque eu estaria fora

de seus pensamentos,

agora que estou apenas fora

de suas vistas?

Eu não estou longe,

apenas estou

do outro lado do Caminho...

Você que aí ficou, siga em frente,

a vida continua, linda e bela

como sempre foi.

Henry Scott Holland (1910), Poema extraído de um sermão do autor

Agradecimentos

Aos Profissionais, Amigos e Familiares

Agradeço a todos aqueles que me ajudaram a alcançar mais essa vitória na minha vida profissional. E não foram poucos...

Aos meus pais, Luiz Fernando e Marileda, por sempre me apoiarem, mesmo quando escolhi o caminho mais difícil.

Aos meus irmãos, Mateus e Paulo, pelos conselhos e por sempre “estarem lá”

À minha grande família, incluindo tios, tias, primos e primas, pelo apoio incondicional e reuniões descontraídas.

Aos meus amigos e amigas que, de longe ou de perto, sempre fizeram a diferença.

Ao meu coorientador e amigo, Prof. Rodrigo R. Valle, por ter me incentivado e me ajudado a entrar na pós-graduação; por ter me introduzido à área de Reprodução de Primatas Não-Humanos e intermediado o contato com muitos profissionais da área, viabilizando a realização das minhas pesquisas, desde o Mestrado; pelos ensinamentos e pela amizade que começaram há mais de oito anos.

Ao meu novo orientador, Prof. Mario Binelli, que me aceitou de braços abertos, em um momento difícil.

Ao pesquisador e amigo, Prof. Marcílio Nichi, pelos ensinamentos, conselhos e apoio desde o Mestrado; pela participação decisiva na elaboração e execução do meu projeto de Doutorado e pelas análises estatísticas.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP que contribuíram para minha formação, seja por meio de disciplinas, estágio de docência, conversas ou sugestões.

Aos pesquisadores e amigos, Dr. José Augusto P. C. Muniz (CENP), Prof. Frederico Ozanan Barros Monteiro (UFRA) e Dr. Paulo Castro (CENP) por todo o apoio que ofereceram sempre que precisei.

Aos funcionários do CENP que me apoiaram ou ajudaram durante a realização do meu trabalho.

À equipe do Laboratório de Andrologia pelo apoio e ajuda durante às análises das minhas amostras.

Ao Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal, incluindo os responsáveis, Profa. Mayra E. O. A. Assumpção e Prof. José Antonio Visintin, e a técnica, Dra. Camilla M. Mendes, pela realização do SCSA.

Ao pesquisador, Dr. Jon Hennebold, supervisor no exterior, pelo apoio profissional para realização do meu projeto da BEPE, que me recebeu de braços abertos desde o primeiro contato.

À técnica e amiga Cathy Ramsey, do ART Core, que me ajudou durante toda a realização do meu projeto da BEPE.

À pesquisadora, Dra. Carol Hanna, que atuou como co-supervisora do meu projeto da BEPE, contribuindo tanto na elaboração como na execução do projeto.

Aos demais integrantes do Hennebold Lab, Melinda, Nathan, Jill e Alison, pela ajuda e convivência.

À pesquisadora e amiga, Dra. Naida Loskutoff (*in memoriam*) do Omaha's Henry Doorly Zoo, que também nos deixou precocemente no último ano, pelo fornecimento do corante eosina-*fast green*.

Às instituições

Agradeço a todas as instituições que tornaram possível a realização dos meus estudos e pesquisas.

No Brasil

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) por fornecer toda a estrutura técnico-científica para realização do meu Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa do Programa de Demanda Social (DS) no início do Doutorado e pela bolsa do Programa de Aprimoramento de Ensino (PAE).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro por meio da Bolsa de Doutorado (Processo FAPESP no. 2012/24709-6) e da Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE (Processo FAPESP no. 2014/15847-1).

Ao Centro Nacional de Primatas (CENP) por permitir que realizasse minhas pesquisas, desde o Mestrado e agora no Doutorado.

À CRV Lagoa que, mais uma vez, apoiou o meu projeto, fornecendo os meios para que pudesse transportar as minhas amostras de Ananindeua, PA para São Paulo, SP.

No Exterior

À Oregon Health & Science University (OHSU) por me aceitar como Visiting Scholar e fornecer todo o apoio necessário para obtenção do visto.

Ao Assisted Reproductive Technologies (ART) Core do Oregon National Primate Research Center (OHSU) por fornecer toda a estrutura e apoio técnico e financeiro para realização do meu projeto de pesquisa no exterior.

Aos Animais

Agradeço também, aos primatas não-humanos, nossos passivos e inocentes parceiros dessa jornada.

RESUMO

CARVALHO, F. M. de. **Criopreservação de sêmen de primatas não-humanos.** [Cryopreservation of non-human primate sperm]. 2016. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O presente trabalho foi composto de dois estudos distintos. O Estudo I, com um foco conservacionista, teve como objetivo a avaliação e comparação de diferentes métodos de criopreservação de sêmen de bugio-preto (*Alouatta caraya*). Para tanto, o estudo foi dividido em dois experimentos: Experimento I – composto de dois ensaios – no primeiro ensaio foram comparados dois diluidores comerciais – BotuBOV e Test-yolk buffer (TYB) e no segundo ensaio foram comparados dois métodos de criopreservação de sêmen – congelação lenta e vitrificação; Experimento II – avaliação dos efeitos da adição de DHA e de Trolox (análogo da vitamina E) ao diluidor para criopreservação de sêmen. O diluidor TYB apresentou melhores resultados quando comparados ao BotuBOV. A congelação lenta apresentou melhores resultados quando comparada à vitrificação. Não houve diferença entre o diluidor controle e os diluidores com Trolox, DHA ou combinação dos dois (DHAT), com exceção da integridade de acrossoma, que foi significativamente menor para o diluidor DHAT. Conclui-se que são necessários mais estudos, com utilização de outras doses de DHA e Trolox, além de outros antioxidantes. O Estudo II, com foco em pesquisa biomédica, teve como objetivo a criopreservação de sêmen de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) e avaliação da qualidade pós-descongelação por meio de fecundação *in vitro* (FIV). Para tanto, o estudo foi dividido em três experimentos: Experimento I – avaliação e comparação de dois métodos de criopreservação de sêmen – congelação lenta e vitrificação; Experimento II – avaliação e comparação de quatro métodos de preparação do sêmen pós-descongelação – lavagem simples (LS), *swim-up* (SU), separação por gradiente de densidade (SGD) e filtragem em lã de vidro (FLV); Experimento III – avaliação da qualidade seminal pós-descongelação por meio de FIV. A congelação lenta apresentou melhores resultados que a vitrificação ($p < 0,05$). LS apresentou os melhores resultados, seguido por SGD e SU, enquanto FLV apresentou os piores resultados. LS e SGD foram utilizados para avaliação da qualidade seminal por meio de FIV, utilizando sêmen fresco como controle. As taxas de fecundação

(média±EPM%) para oócitos MI inseminados com sêmen fresco (43.5±16.4) foram significativamente maiores ($p<0,05$) que LS (2.0±2.0), mas não diferiram de SGD (25.1±14.2). Não houve diferença na taxa de blastocistos (média±EPM%) entre os tratamentos (variação de 0 a 11.9±7.9). As taxas de fecundação para oócitos MII inseminados com sêmen fresco (41.4±3.6) também foram significativamente maiores que SGD e LS (18.4±6.9 e 12.7±7.7, respectivamente), assim como a taxa de blastocistos (64.7±13.6; 4.7±4.7; 30.9±13.8, respectivamente). Conclui-se que, espermatozoides criopreservados foram capazes de fertilizar oócitos e os embriões atingiram o estágio de blastocisto. A SGD selecionou espermatozoides pós-descongelamento de melhor qualidade para FIV em macacos-rhesus, quando comparada à LS.

Palavras-chave: Congelamento. DHA. Espermatozoide. FIV. Vitamina E. Trolox
Vitrificação.

ABSTRACT

CARVALHO, F. M. de. **Cryopreservation of non-human primate sperm.** [Criopreservação de sêmen de primatas não-humanos]. 2016. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

This work was divided in two studies. The objective of Study I was to test and compare different cryopreservation methods for sperm from black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*), with a focus on species conservation. The study was divided in two experiments. Experiment I – composed of two trials – the first trial compared two commercial extenders – BotuBOV and Test-yolk buffer (TYB), and the second trial compared two cryopreservation methods – slow freezing and vitrification; Experiment II – evaluation of the effects of DHA and Trolox (vitamin E analog) as additives to the freezing extender. TYB had better results when compared to BotuBOV. Slow freezing had better results when compared to vitrification. There was no difference between control extender (TYB) and extender containing Trolox, DHA or a combination of both (DHAT), except for acrosome integrity, which was significantly lower for DHAT. In conclusion, more studies are necessary, using other doses of DHA and Trolox, as well as other antioxidants. The objective of Study II was to assess the quality of frozen-thawed sperm from rhesus macaques (*Macaca mulatta*) by *in vitro* fertilization (IVF). The study was divided in three experiments. Experiment I – evaluation and comparison of two cryopreservation methods – slow freezing and vitrification; Experiment II – evaluation and comparison of four preparation methods for frozen-thawed sperm – simple wash (SW), swim-up (SU), density gradient centrifugation (DGC), and glass wool filtration (GWF); and Experiment III – evaluation of frozen-thawed sperm quality by IVF. Slow freezing had better results when compared to vitrification ($p < 0,05$). SW had better results, followed by DGC and SU, while GWF had the worse results. SW and DGC were further evaluated by IVF. Fertilization rates (mean \pm SEM%) with MI oocytes using fresh sperm were significantly higher (43.5 ± 16.4) than with SW (2.0 ± 2.0) and did not differ from DGC (25.1 ± 14.2). There was no difference in blastocyst rates between treatments (range 0 to 11.9 ± 7.9). Fertilization rates with MII ova were also significantly higher with fresh sperm (41.4 ± 3.6) than DGC and SW (18.4 ± 6.9 and 12.7 ± 7.7 , respectively), and more blastocysts developed from MIIs fertilized with

fresh sperm (64.7 ± 13.6) than SW and DGC (4.7 ± 4.7 and 30.9 ± 13.8 , respectively). In conclusion, frozen-thawed sperm were able to fertilize oocytes and embryos reached the blastocyst stage. DGC yielded better frozen-thawed sperm for IVF in rhesus macaques, when compared with SW.

Keywords: DHA. Freezing. IVF. Spermatozoa. Vitamin E. Trolox. Vitrification.

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Composição das soluções utilizadas para o SCSA adaptado.....	167
APÊNDICE B - Meio TALP-Hepes.....	168
APÊNDICE C - TEST-gema de ovo.....	170
APÊNDICE D - Meio TALP complete.....	171
APÊNDICE E - Solução ativadora para espermatozoides.....	173

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fêmea de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>).....	30
Figura 2 - Mãe e infante macho de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>).....	31
Figura 3 - Macho subadulto (à esquerda) de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>).....	31
Figura 4 - Macho (A) e fêmea (B) de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>).....	32
Figura 5 - Família de macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>).....	34
Figura 6 - Macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	36
Figura 7 - Macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	36
Figura 8 - Aparelho eletroejaculador DUBOI	69
Figura 9 - Colheita de sêmen de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>) por meio de eletroejaculação com probe retal	70
Figura 10 - Avaliação da motilidade espermática em amostra de sêmen de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>).....	73
Figura 11 - Avaliação da integridade de membrana plasmática em amostra de sêmen de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>)	74
Figura 12 - Avaliação da integridade de acrossoma em amostra de sêmen de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>).....	74
Figura 13 - Avaliação da atividade citoquímica mitocondrial em amostra de sêmen de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>)	76
Figura 14 - Colheita de sêmen de macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) por eletroejaculação peniana	101
Figura 15 - Ejaculado de macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) já coagulado no recipiente de coleta	102
Figura 16 - Avaliação da integridade de membrana plasmática e de acrossoma...	103
Figura 17 - Oócito fecundado	112
Figura 18 - Exemplo de desenvolvimento embrionário do primeiro ensaio de fecundação <i>in vitro</i> (FIV). Os oócitos foram inseminados utilizando sêmen fresco (controle) ou criopreservado preparado por lavagem simples (LS) ou separação por gradiente de densidade (SGD).	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Espécies de Primatas Neotropicais cujo sêmen foi estudado com relação à caracterização, processamento e conservação.....	37
Quadro 2 - Espécies de Primatas do Velho Mundo cujo sêmen foi estudado com relação à caracterização, processamento e conservação.....	39
Quadro 3 - Composição dos diluidores utilizados para criopreservação de sêmen de macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>).....	56
Quadro 4 - Curvas de congelação utilizadas para criopreservação de sêmen de macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	60
Quadro 5 - Experimentos de criopreservação do sêmen de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>) realizados no Estudo I.....	67
Quadro 6 - Características dos machos de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>) utilizados no Estudo I]	69
Quadro 7 - Características dos machos de macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) utilizados no Estudo II	97
Quadro 8 - Características das fêmeas de macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) utilizadas no Estudo II	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados (média \pm erro padrão) da análise descritiva do sêmen fresco (n=33 amostras) de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i> ; n=8) colhido por eletroejaculação com probe retal, com intervalo de 15 dias entre as colheitas.....	85
Tabela 2 - Resultados (média \pm erro padrão da média) da análise do sêmen de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>) fresco versus criopreservado com diferentes diluidores	87
Tabela 3 - Resultados (média \pm erro padrão da média) da análise pós-descongelamento do sêmen de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>), criopreservado com diferentes diluidores.....	87
Tabela 4 - Resultados (média \pm erro padrão da média) obtidos para sêmen de <i>Alouatta caraya</i> fresco ou criopreservado com diferentes diluidores	91
Tabela 5 - Resultados (média \pm erro padrão da média) obtidos para sêmen de <i>Alouatta caraya</i> criopreservado com diferentes diluidores	93
Tabela 6 - Resultados (média \pm EPM) da análise do sêmen fresco de macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) colhido por eletroejaculação peniana.....	115
Tabela 7 - Comparação da qualidade do sêmen fresco versus criopreservado por congelamento lento ou vitrificação e taxa de recuperação de espermatozoides de acordo com o método de criopreservação	117
Tabela 8 - Desempenho pós-descongelamento de espermatozoides congelados por congelamento lento versus vitrificação.....	117
Tabela 9 - Porcentagem de espermatozoides (média \pm erro padrão da média) com cada característica observados na amostra inicial (pool) e após passar pelos diferentes métodos de preparo.....	121
Tabela 10 - Número de espermatozoides (média \pm erro padrão da média) obtidos por meio dos diferentes métodos de preparo dos espermatozoides, a partir do pool inicial de amostras descongeladas	121
Tabela 11 - Porcentagem de espermatozoides recuperados (média \pm erro padrão da média) por meio dos diferentes métodos de preparo dos espermatozoides, a partir do pool inicial de amostras descongeladas	122
Tabela 12 - Avaliação do efeito do método (sêmen fresco, gradiente de densidade ou lavagem simples) e do estágio de maturação do oócito do momento da inseminação, nas variáveis relacionadas a fertilização in vitro (FIV).....	124
Tabela 13 - Resultados da avaliação da qualidade seminal do sêmen criopreservado por meio da fecundação in vitro (FIV). O sêmen criopreservado foi preparado por separação por gradiente de densidade ou por lavagem simples. O sêmen fresco foi utilizado como controle.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AOT	Teste de laranja de acridina
ART	<i>Assisted Reproductive Technology</i>
ATP	Adenosina trifosfato
α -MEM	Meio Mínimo Essencial Modificado Alfa
BID	Duas vezes ao dia
BWW	Meio Biggers, Whitten e Whittingham's
CaMKII	Proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina
CCO	Citocromo c oxidase
CENP	Centro Nacional de Primatas
CO ₂	Gás carbônico
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
DAB	3,3' – diaminobenzidina
dbcAMP	Dibutilil adenosina monofosfato cíclico
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DHAT	DHA + Trolox
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EGA	Ativação do genoma embrionário
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína Conjugado
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FLV	Filtragem em lâ de vidro
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropinas
hCG	Gonadotropina coriônica humana
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HTF	<i>Human Tubal Fluid</i>
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
IA	Integridade de acrossoma
ICSI	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>
IFD	Índice de Fragmentação de DNA
IM	Intramuscular
IMP	Integridade de membrana plasmática
IP ₃ R	Receptor de inositol trifosfato
ITIS	<i>Integrated Taxonomic Information System</i>
IUCN	<i>International Union for the Conservation of Nature</i>
LA	Laboratório de Andrologia
LDL	Lipoproteínas de densidade baixa
LH	Hormônio luteinizante
LN ₂	Nitrogênio líquido
LSD	<i>Least Significant Difference</i>
LS	Lavagem simples
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MDA	Malondialdeído
NT	<i>Nick Translation in situ</i>
OHSU	Oregon Health & Science University
ONPRC	Oregon National Primate Research Center
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PN	Primatas Neotropicais
PNA	Aglutinina de Amendoim
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>

PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
PVM	Primatas do Velho Mundo
RM-TYB	<i>Refrigeration Medium with Gentamicin Test Yolk Buffer</i>
rhFSH	Hormônio folículo-estimulante humano recombinante
rhLH	Hormônio luteinizante humano recombinante
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SC	Subcutâneo
SCSA	<i>Sperm Chromatin Structure Assay</i>
SGD	Separação por gradiente de densidade
SPS	<i>Straw Packaging System</i>
sptz	Espermatozoides
SSC	<i>Species Survival Commission</i>
SU	<i>Swim-up</i>
SWM	<i>Sperm Washing Medium</i>
TALP	Meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TEST	Tes-Tris
TGO	Test-gema de ovo
TNE	Solução tampão de Tris-HCl, NaCl e EDTA
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling</i>
TYB	<i>Freezing Medium with Gentamicin Test Yolk Buffer</i>
UI	Unidade Internacional
USA	<i>United States of America</i>
USP	Universidade de São Paulo
VG	Vesícula germinativa
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	BUGIO-PRETO (<i>Alouatta caraya</i>)	29
2.2	MACACO-RHESUS (<i>Macaca mulatta</i>)	33
2.3	ESTUDO DO SÊMEN DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS.....	37
2.3.1	Métodos de colheita de sêmen em primatas não-humanos	40
2.3.2	Particularidades do sêmen de primatas não-humanos e implicações técnicas	41
2.3.2.1	Teoria evolutiva para formação do coágulo seminal	41
2.3.2.2	Processamento do sêmen.....	43
2.3.3	Estudo do sêmen de <i>Alouatta caraya</i>	43
2.3.4	Estudo do sêmen de <i>Macaca mulatta</i>	46
2.4	TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DO SÊMEN	47
2.4.1	Integridade de membrana plasmática	48
2.4.2	Integridade de acrossoma	49
2.4.3	Atividade mitocondrial	50
2.4.4	Estresse oxidativo	50
2.4.5	Fragmentação de DNA	51
2.5	CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS	52
2.5.1	Criopreservação de sêmen de <i>Alouatta caraya</i>	53
2.5.2	Criopreservação de sêmen de <i>Macaca mulatta</i>	54
2.6	USO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS E ANTIOXIDANTES NO MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO	62
2.7	FOLICULOGÊNESE E MATURAÇÃO OOCITÁRIA	63
3	ESTUDO I - AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E DO EFEITO DO TRATAMENTO COM DHA E TROLOX™ NAS CARACTERÍSTICAS PÓS-DESCONGELAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE BUGIO-PRETO (<i>Alouatta caraya</i>)	65
3.1	OBJETIVOS	66
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	66

3.2.1	Delineamento experimental	67
3.2.1.1	Experimento I – Comparação de diluidores e métodos de congelamento.....	67
3.2.1.2	Experimento II – Avaliação dos efeitos da adição de DHA e de Trolox™ ao sêmen	68
3.2.2	Animais e obtenção da amostra	68
3.2.3	Processamento e análise do sêmen	70
3.2.3.1	Experimento I	71
3.2.3.2	Experimento II	72
3.2.3.3	Motilidade espermática	72
3.2.3.4	Concentração	72
3.2.3.5	Integridade de membrana plasmática	73
3.2.3.6	Integridade de acrossoma.....	73
3.2.3.7	Atividade citoquímica mitocondrial	74
3.2.3.8	Avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo (TBARS)	76
3.2.3.8.1	<i>Protocolo de indução para o sêmen fresco</i>	77
3.2.3.8.2	<i>Protocolo de indução para o sêmen criopreservado</i>	77
3.2.3.8.3	<i>Protocolo para quantificação de TBARS</i>	77
3.2.3.9	Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) adaptado	78
3.2.3.10	Tratamentos	79
3.2.3.10.1	<i>Experimento I – Comparação de diluidores e métodos de congelamento</i>	79
3.2.3.10.2	<i>Experimento II – Avaliação dos efeitos da adição de DHA e de Trolox™ ao sêmen</i>	82
3.2.4	Análise estatística	83
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.3.1	Análise descritiva do sêmen fresco de bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>)	84
3.3.2	Experimento I – Comparação de diluidores e métodos de congelamento	86
3.3.3	Experimento II – Avaliação dos efeitos da adição de DHA e de Trolox™ ao sêmen	90
3.4	CONCLUSÕES	94

4	ESTUDO II – CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE MACACO-RHESUS (<i>Macaca mulatta</i>) E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PÓS-DESCONGELAÇÃO POR MEIO DE FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	95
4.1	OBJETIVOS	95
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
4.2.1	Delineamento experimental	96
4.2.1.1	Experimento I – Comparação de métodos de criopreservação.....	96
4.2.1.2	Experimento II – Comparação de métodos de preparo pós-descongelação dos espermatozoides	97
4.2.1.3	Experimento III – Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	97
4.2.2	Animais	97
4.2.3	Experimento I – Comparação de métodos de criopreservação	98
4.2.3.1	Colheita e avaliação do sêmen	98
4.2.3.2	Protocolos de congelação do sêmen	104
4.2.3.2.1	<i>Congelação lenta</i>	104
4.2.3.2.2	<i>Vitrificação</i>	105
4.2.4	Experimento II – Comparação de métodos de preparo pós-descongelação dos espermatozoides	105
4.2.4.1	Lavagem simples	106
4.2.4.2	Direct Swim-up	105
4.2.4.3	Separação por gradiente de densidade	106
4.2.4.3.1	<i>Comparação Percoll versus ISolate</i>	106
4.2.4.4	Filtragem em lã de vidro	107
4.2.5	Experimento III – Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	108
4.2.5.1	Colheita, avaliação e preparo dos oócitos.....	108
4.2.5.2	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	110
4.2.5.2.1	<i>Processamento do sêmen fresco para FIV</i>	110
4.2.5.2.1	<i>Processamento do sêmen criopreservado para FIV</i>	111
4.2.6	Análise estatística	112
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	113
4.3.1	Análise descritiva do sêmen fresco de macaco-rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	113

4.3.2	Experimento I – Comparação de métodos de criopreservação	116
4.3.3	Experimento II – Comparação de métodos de preparo pós-descongelação dos espermatozoides	119
4.3.4	Experimento III – Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	123
4.4	CONCLUSÕES	129
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	130
	REFERÊNCIAS	132
	APÊNDICES	166

1 INTRODUÇÃO

Primatas são mamíferos arborícolas ou não, que habitam principalmente as regiões tropicais, mas que podem também ocupar algumas regiões temperadas ou subtropicais (WOLFENSOHN; HONESS, 2005). Os primatas fazem parte da Ordem Primates, a qual é dividida em duas Subordens, Strepsirrhini e Haplorrhini. A primeira compreende as Infraordens Lemuriformes (lêmures), Chiromyiformes (aie-aie) e Lorisiformes (lóris e galagos). A segunda compreende as Infraordens Tarsiiformes (társios) e Simiiformes (símios ou macacos). O presente trabalho irá abordar alguns aspectos da reprodução de primatas pertencentes à Infraordem Simiiformes.

A Infraordem Simiiformes é dividida em duas Parvordens, Catarrhini e Platyrrhini (GROVES, 2005). A primeira compreende as espécies de macacos conhecidas como Primatas do Velho Mundo (PVM), as quais habitam regiões da África e Ásia, enquanto a segunda compreende as espécies conhecidas como Primatas do Novo Mundo ou Primatas Neotropicais (PN), que habitam regiões do México e das Américas Central e do Sul. Atualmente, são conhecidas 17 famílias, 76 gêneros e 695 espécies e subespécies de primatas no mundo todo (PRIMATE SPECIALIST GROUP, 2014).

Essa grande diversidade de primatas não-humanos que habita nosso planeta, vem sofrendo diversas ameaças que levam à diminuição das populações, com risco cada vez maior de extinção. Aproximadamente 50,4% das espécies de primatas no mundo estão classificadas sob algum tipo de ameaça de extinção, de acordo com a classificação proposta pela *International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened Species* (2014) (PRIMATE SPECIALIST GROUP, 2014). As principais ameaças à sobrevivência de primatas não-humanos em vida livre são a perda de *habitat* e a caça, tanto para alimento como para tráfico (MITTERMEIER et al., 2009).

Somando-se a isso, os primatas não-humanos são importantes modelos para pesquisas biomédicas devido à similaridade com os seres humanos (WOLF, 2009). Consequentemente, tanto sob o ponto de vista conservacionista (MORRELL; HODGES, 1998), como sob o ponto de vista prático (WOLF et al., 2004), existe uma

crescente necessidade de estudos na área de tecnologias de reprodução assistida (ARTs, do inglês *Assisted Reproductive Technologies*) em primatas não-humanos. Esses estudos se fazem necessários para garantir a propagação, tanto de indivíduos de espécies ameaçadas, visando à conservação das mesmas, como de indivíduos essenciais para o desenvolvimento de pesquisas biomédicas. Dentre as ARTs, incluem-se criopreservação de gametas, inseminação artificial, fecundação *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI, do inglês, *Intracytoplasmic Sperm Injection*).

A criopreservação de gametas é uma técnica importantíssima, pois, a partir do domínio da mesma, torna-se mais viável e prático o estudo e a execução das demais técnicas, tanto em termos de pesquisa, como em termos práticos. Tendo isso em vista, os objetivos deste trabalho foram desenvolver (no caso dos bugios) e aprimorar (no caso dos macacos-rhesus) técnicas de criopreservação de espermatozoides de duas espécies de primatas não-humanos, o bugio-preto (*Alouatta caraya*) e o macaco-rhesus (*Macaca mulatta*).

Mais especificamente, o Estudo I, com um foco conservacionista, teve como objetivo desenvolver um protocolo efetivo de criopreservação de sêmen, que possa, no futuro, servir como base para o desenvolvimento de protocolos de criopreservação de sêmen em outras espécies de bugios ameaçadas de extinção. Isso seria apenas um primeiro passo para a aplicação de ARTs nessas espécies. Dessa forma, o Estudo I consistiu, inicialmente, na avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de bugio-preto e, posteriormente, na avaliação do efeito da adição de ácido docosaheptaenoico (DHA) e Trolox™ (análogo da vitamina E) ao meio de criopreservação, na qualidade pós-descongelamento dos espermatozoides.

Já o Estudo II, com um foco de pesquisa biomédica, teve como objetivo o aprimoramento da criopreservação e preparo pós-descongelamento dos espermatozoides de macacos-rhesus, o que traria um grande avanço para a realização da FIV, visto que apesar desta técnica estar bem desenvolvida na espécie, ainda se faz necessário o uso de sêmen recém-colhido. Isso requer a manutenção de vários machos treinados e a presença de pessoal treinado para colheita do sêmen imediatamente antes da FIV. A manutenção de um banco de sêmen com amostras viáveis, permitiria o acesso imediato a amostras de sêmen de

qualidade sempre que necessário, o que seria um grande avanço em termos de logística. Dessa forma, o Estudo II consistiu na comparação de protocolos de criopreservação e preparo dos espermatozoides pós-descongelamento para realização de FIV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Por se tratarem de espécies de animais selvagens, inicialmente, será feita a apresentação de cada espécie. Em seguida, será apresentada uma revisão, na qual serão abordados tópicos que incluem (1) quais espécies de primatas não-humanos já foram estudadas com relação à caracterização, processamento e conservação de sêmen; (2) quais os métodos de colheita de sêmen utilizados em primatas não-humanos; (3) particularidades do sêmen de primatas não-humanos e implicações técnicas; (4) qual a situação atual do conhecimento em relação à colheita, análise e criopreservação do sêmen das duas espécies envolvidas no presente trabalho; (5) técnicas para avaliação da qualidade seminal utilizadas no presente trabalho e (6) uso de ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes no meio de criopreservação.

2.1 BUGIO-PRETO (*Alouatta caraya*)

O Brasil possui exemplares das cinco famílias de PN descritas por Rylands e Mittermeier (2009), com um total de 19 gêneros, 119 espécies e 139 espécies e subespécies (RYLANDS; MITTERMEIER; SILVA, 2012; CPB-ICMBio, 2014). Dentre os 19 gêneros, encontra-se o *Alouatta*, único gênero da subfamília Alouattinae, a qual pertence à família Atelidae. O gênero *Alouatta* é composto por 19 espécies e subespécies (RYLANDS; MITTERMEIER, 2009), das quais 11 têm ocorrência no Brasil, onde é conhecido popularmente por guariba ou bugio (GREGORIN; KUGELMEIER; VALLE, 2008). Conforme a classificação de acordo com o risco de ameaça de extinção proposta pela IUCN (2014), das 19 espécies e subespécies de bugio, nove estão sob algum tipo de ameaça, conforme segue. *Alouatta belzebul*, *A. discolor*, *A. palliata equatorialis* e *A. p. coibensis* são consideradas “Vulneráveis”; *A. ululata* e *A. pigra* são consideradas “Ameaçadas”; e *A. guariba guariba*, *A. p. mexicana* e *A. p. trabeata* são consideradas “Criticamente Ameaçadas”. As demais espécies estão classificadas como “Pouco Preocupante”.

Os bugios são animais robustos, com peso corporal entre 5 e 12 kg, o que os coloca entre os maiores primatas das Américas. Como todos atelídeos, possuem cauda preênsil, ou seja, a cauda atua como um quinto membro, com habilidade para “agarrar” galhos e objetos (Figuras 1 e 3). Apesar de também serem braquiadores, possuem braços proporcionalmente mais curtos e cabeça grande, quando comparados aos outros braquiadores da mesma família, *Ateles* e *Brachyteles*. Todas as espécies de bugios apresentam dimorfismo sexual quanto ao tamanho – machos maiores que as fêmeas – e algumas espécies – *Alouatta clamitans*, *A. caraya*, *A. puruensis* e *A. ululata* – apresentam dimorfismo sexual quanto à cor da pelagem (dicromatismo sexual). Nestas, a coloração de cada sexo difere de acordo com a espécie, mas, invariavelmente, os jovens de ambos os sexos têm a mesma coloração da fêmea (Figura 2) e os machos mudam de coloração (Figura 3) ao atingirem maturidade sexual. O gênero *Alouatta* apresenta osso hioide bem desenvolvido, o que possibilita vocalização audível a uma distância de até 5 km. Com relação à dieta, são considerados folívoros-frugívoros (AURICCHIO, 1995; GREGORIN; KUGELMEIER; VALLE, 2008).

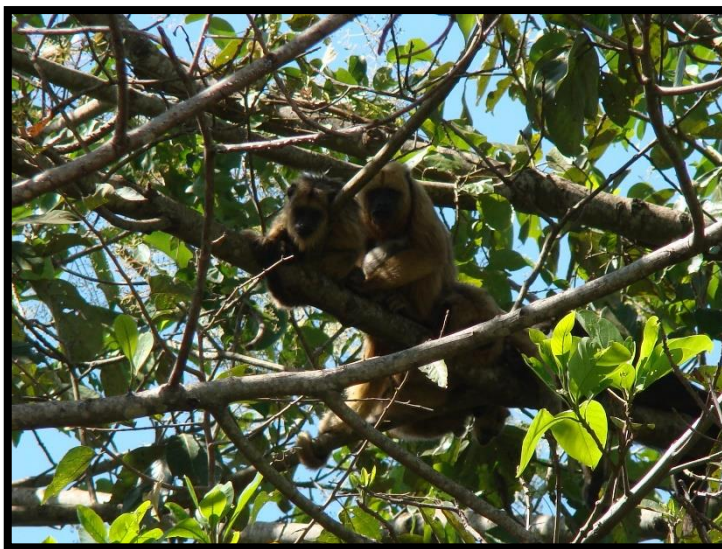
Figura 1 - Fêmea de bugio-preto (*Alouatta caraya*)



Fonte: (CARVALHO, F. M., 2009).

Legenda: Notar a cauda preênsil (seta) enrolada no galho.

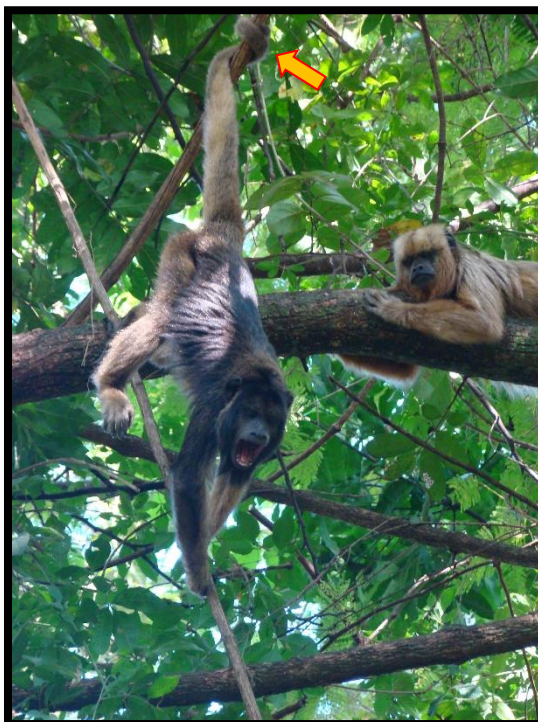
Figura 2 - Mãe e infante macho de bugio-preto (*Alouatta caraya*)



Fonte: (CARVALHO, F. M., 2009).

Legenda: Notar que, mesmo sendo macho, possui a mesma coloração da mãe.

Figura 3 - Macho subadulto (à esquerda) de bugio-preto (*Alouatta caraya*)

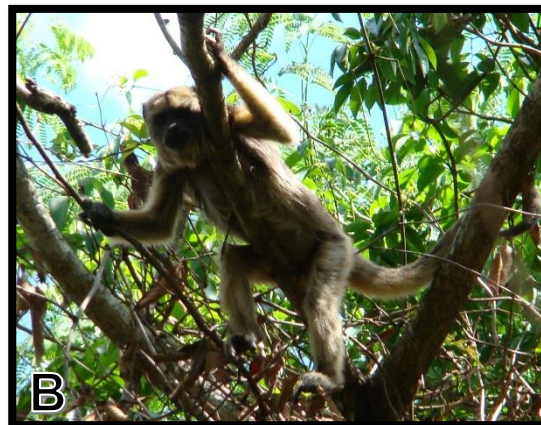


Fonte: (CARVALHO, F. M., 2009).

Legenda: Notar início da mudança de coloração para coloração de adulto. Notar também a cauda preênsil (seta).

Como citado anteriormente, *Alouatta caraya* possui dicromatismo sexual, sendo o macho adulto de coloração negra (Figura 4a) e a fêmea de coloração castanho-amarelado claro (Figura 4b), tendendo ao palha (AURICCHIO, 1995; GREGORIN; KUGELMEIER; VALLE, 2008).

Figura 4 - Macho (A) e fêmea (B) de bugio-preto (*Alouatta caraya*)



Fonte: (CARVALHO, F. M., 2009).

Legenda: Observar o dicromatismo sexual, característico da espécie.

Com relação à reprodução, esta espécie apresenta maturidade sexual aos 24 a 37 meses para machos e 35 a 42 meses para fêmeas (CROCKETT; EISENBERG, 1987). Acredita-se que as fêmeas tenham um ciclo ovariano do tipo menstrual (KUGELMEIER et al., 2011). A gestação dura cerca de seis meses e o filhote é amamentado por um período de 9 a 12 meses. Com relação à sazonalidade reprodutiva, os bugios de vida-livre não apresentam sazonalidade estrita, devido à flexibilidade alimentar desse gênero, o que permite que ajustem a atividade reprodutiva de acordo com a oferta de alimento (CROCKETT; RUDRAN, 1987; DI BITETTI; JANSON, 2000; STRIER; MENDES; SANTOS, 2001; KOWALEWSKI; ZUNINO, 2004). Além disso, dados reprodutivos de cativeiro obtidos ao longo de sete anos, indicam que bugios-pretos mantidos em cativeiro na região da Amazônia se reproduzem durante o ano todo (VALLE et al., 2004). A espécie vive em grupos de dois até 21 indivíduos, geralmente compostos por um ou mais machos adultos, uma ou mais fêmeas adultas e seus filhotes jovens e infantis (GREGORIN; KUGELMEIER; VALLE, 2008; OKLANDER; KOWALEWSKI; CORACH, 2014). Um

trabalho recente sugere que, apesar de haver um macho alfa que é responsável pela maior parte das cópulas, ocorrem cópulas tanto com outros machos residentes, como com machos de outros grupos (OKLANDER; KOWALEWSKI; CORACH, 2014). Isso sugere um sistema de acasalamento do tipo poligínico-poliândrico.

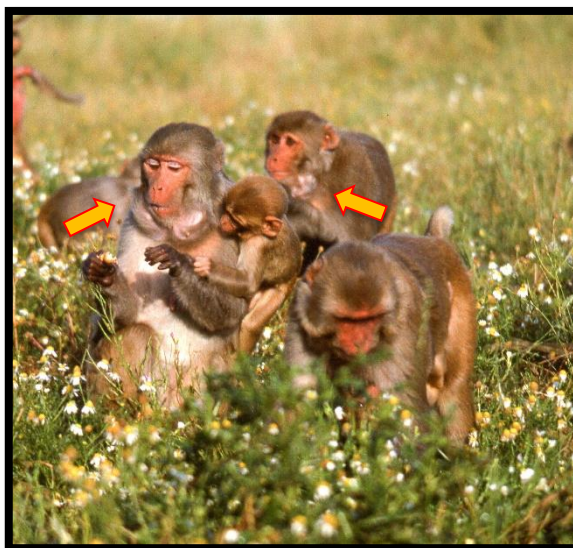
De acordo com as listas regionais da fauna ameaçada de extinção, *Alouatta caraya* é categorizada como “Ameaçada” no estado do Paraná (MIKICH; BÉRNILS, 2004) e “Vulnerável” nos estados de São Paulo (PERCEQUILLO; KIERULFF, 2009) e Rio Grande do Sul (MARQUES et al., 2002). Embora esteja ameaçada nestes estados, a espécie apresenta ampla distribuição, habitando regiões do Brasil, Argentina, Paraguai, leste da Bolívia e norte do Uruguai. No Brasil, ocorre nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Tocantins, Maranhão, Bahia e Pará. Sua ampla distribuição associada ao fato de apresentar algum tipo de ameaça somente em três listas estaduais, fazem com que não conste no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008) e seja considerada “Pouco Preocupante” na IUCN Red List (FERNANDEZ-DUQUE; WALLACE; RYLANDS, 2008; IUCN, 2014). Devido à disponibilidade de indivíduos e sucesso reprodutivo em cativeiro, esta espécie pode ser considerada como espécie modelo no que se refere ao desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida destinadas a outras espécies de bugios sob maior risco de extinção (MORELAND et al., 2001).

2.2 MACACO-RHESUS (*Macaca mulatta*)

Os PVM são divididos em duas Superfamílias, Hominoidea e Cercopithecoidea. A primeira contém duas famílias, Hylobatidae (gibões ou “lesser apes”) e Hominidae (“great apes” e seres humanos). Enquanto a segunda contém apenas uma família, Cercopithecidae. Esta última é subdividida nas Subfamílias Cercopithecinae (gêneros *Cercopithecus*, *Miopithecus*, *Erythrocebus*, *Allenopithecus*, *Cercocebus* e *Macaca*) e Colobine (gêneros *Colobus*, *Ptilocolobus*, *Procolobus*, *Nasalis*, *Presbytis*, *Pygathrix*, *Rhinopithecus*, *Semnopithecus*, *Simias* e

Trachypithecus) (ITIS, 2015). O gênero *Macaca* é composto por cerca de 22 espécies (ITIS, 2015), sendo que o número exato varia de acordo com o taxonomista (WHITNEY, 1995). Os primatas do gênero *Macaca* são os mais amplamente distribuídos geograficamente. São animais médios a grandes, robustos, com grandes bolsas jugais (Figura 5; bolsas na parte interna das bochechas para armazenar alimentos) e calosidades isquiáticas (adaptação cutânea para sentar, localizada na região das tuberosidades isquiáticas). Além disso, possuem dimorfismo sexual de tamanho e, assim como outros PVM, apresentam os fenômenos conhecidos como “pele sexual” (tradução livre do inglês *sex skin*), caracterizada por coloração avermelhada na região perigenital e na face, tanto de fêmeas como de machos; e “intumescimento sexual” (tradução livre do inglês *sexual swelling*) caracterizado por coloração avermelhada e intumescimento da região perigenital, podendo atingir inclusive os membros pélvicos, com extensão variável, ocorrendo apenas nas fêmeas (WHITNEY, 1995; FORTMAN; HEWETT; BENNET, 2002; DIXSON; MARTIN, 2012).

Figura 5 - Família de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*)



Fonte: (WARREN, V., 2015).

Legenda: Notar bolsas jugais repletas de alimento (setas).

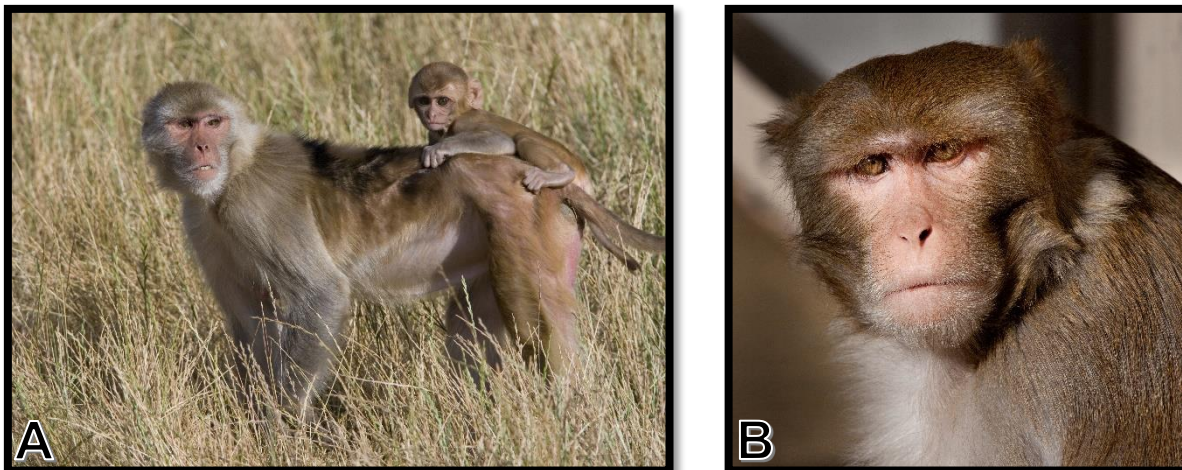
O macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) é, juntamente com o macaco-cynomolgus (*Macaca fascicularis*), um dos primatas não-humanos mais utilizados em pesquisa (WHITNEY, 1995). A coloração do pelo, tanto dos machos como das fêmeas de macacos-rhesus, varia do marrom-claro ao ruivo, sendo a face de coloração rósea-avermelhada, com pouco ou nenhum pelo (Figuras 6 e 7). A região perigenital possui a mesma coloração da face e a cauda tem tamanho médio (LANG, 2005). As fêmeas pesam de 4-9 kg e atingem maturidade sexual por volta de 2,6-3,5 anos de idade. Já os machos, pesam de 6-11 kg e atingem maturidade sexual por volta de 3-4 anos de idade.

Assim como em outros PVM, as fêmeas de macaco-rhesus possuem um ciclo ovariano do tipo menstrual. O período de gestação é de 5,5 a 6 meses e o desmame ocorre entre 7 e 14 meses de idade (FORTMAN; HEWETT; BENNET, 2002). Essa espécie é tipicamente sazonal em vida-livre, de forma que a maioria dos ciclos férteis das fêmeas ocorram nos meses de outono/inverno (outubro a dezembro), enquanto que nos meses de primavera/verão (maio a agosto), as fêmeas se tornam acíclicas ou apresentam fertilidade reduzida (HENDRICKX; DUKELOW, 1995). O mesmo ocorre com os machos de vida livre, que diminuem a resposta à eletroestimulação e, mesmo quando respondem, o sêmen apresenta volume e qualidade reduzidos fora da estação reprodutiva (ZAMBONI; CONWAY; PELT, 1974). Isso se deve a mudanças no epitélio seminífero, com diminuição significativa na população de células germinativas (BANSODE; CHOWDHURY; DHAR, 2003). Entretanto, um estudo demonstrou que animais mantidos em condições de luz controladas (12 h de luz e 12 h de escuro) por mais de quatro anos, apresentaram quebra da sazonalidade (HERNDON et al., 1985). Nesse estudo, as fêmeas mantidas em condições controladas ciclaram o ano todo, sendo que três das cinco fêmeas, ficaram prenhas fora da estação reprodutiva. Além disso, os machos mantidos nas mesmas condições controladas, mantiveram concentrações de testosterona elevadas até o início da primavera, ao contrário dos machos mantidos em recinto externo.

Os rhesus são primatas sociais e vivem em grupos multimacho-multifêmea, com tamanhos que podem variar desde 8 até 85 indivíduos (LUTZ; NOVAK, 2005). O sistema de acasalamento é do tipo poligínico-poliândrico ou multimacho-multifêmea (DIXSON; MARTIN, 2012). A espécie tem ampla distribuição geográfica,

ocorrendo em diversos países do sul asiático, incluindo Afeganistão, Bangladesh, Butão, Paquistão, Índia, China, Tailândia, Laos, Myanmar, Nepal e Vietnã. É considerada “Pouco Preocupante” pela IUCN Red List of Threatened Species (TIMMINS et al., 2008; IUCN, 2014).

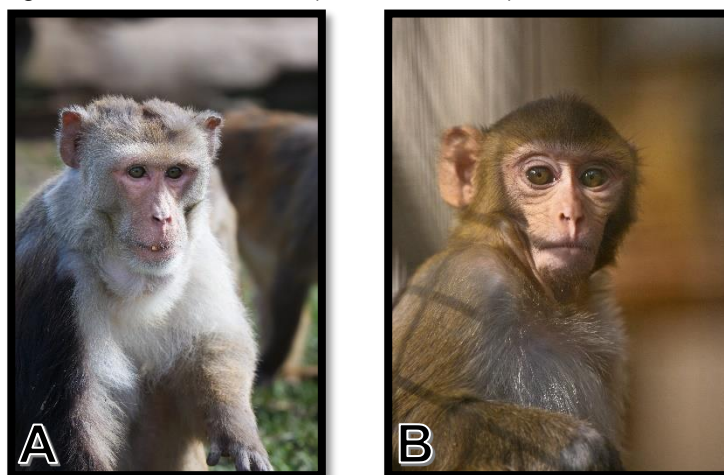
Figura 6 - Macaco-rhesus (*Macaca mulatta*)



Fonte: (ONPRC, 2015 - Foto A); (WARREN, V., 2015 - Foto B).

Legenda: A. Fêmea adulta com infante. B. Macho adulto.

Figura 7 - Macaco-rhesus (*Macaca mulatta*)



Fonte: (WARREN, V., 2015).

Legenda: A. Macho idoso. B. Juvenil.

2.3 ESTUDO DO SÊMEN DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS

Das 204 espécies e subespécies de PN reconhecidas no mundo todo (RYLANDS; MITTERMEIER; SILVA, 2012), apenas 15 (7%) foram estudadas com relação à caracterização, processamento e conservação de sêmen (Quadro 1).

Quadro 1 - Espécies de Primatas Neotropicais cujo sêmen foi estudado com relação à caracterização, processamento e conservação

Espécie	Referência
<i>Alouatta caraya</i>	MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO, 2012; CARVALHO et al., 2012; VALLE et al., 2013b; CARVALHO et al., 2014
<i>Ateles geoffroyi</i>	HERNANDÉZ-LÓPEZ et al., 2002a, 2002b, 2008; CERDA-MOLINA et al., 2009; FLORES-HERRERA et al., 2012
<i>Ateles marginatus</i>	SILVA, 2005; SILVA et al., 2013
<i>Ateles paniscus</i>	SILVA, 2005; SILVA et al., 2013
<i>Callimico goeldii</i>	ARAKAKI et al., 2011a, 2011b; ARAKAKI et al., 2012; VALLE et al. 2013a
<i>Callithrix jacchus</i>	DAVIS, 1982; CUI et al., 1991; WILTON et al., 1993; CUI, 1996; KUEDERLING; MORRELL; NAYUDU, 1996; MORRELL; KÜDERLING; HODGES, 1996; YEUNG et al., 1996; GILCHRIST; NAYUDU; HODGES, 1997; KUEDERLING et al., 2000; PUDRITZ, 2000; GRUPEN; SCOTT; GILCHRIST, 2004; SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004; HERNÁNDEZ-LOPEZ et al., 2005; O'BRIEN et al., 2003; 2005; VALTONEN-ANDRÉ et al., 2005; VALLE, 2007; VALLE et al., 2008; VERONA et al., 2009; VALLE et al., 2012; ARAKAKI et al., 2013; TAKAHASHI et al., 2014; VALLE et al., 2014
<i>Callithrix penicillata</i>	MASSAROTTO et al., 2010; ARAKAKI et al., 2013
<i>Cebus (Sapajus) apella</i>	ACKERMAN; ROUSSEL, 1968; BUSH et al., 1975; GUIMARÃES, 1994; BARNABE et al., 2002; PAZ; TEIXEIRA; GUIMARÃES, 2006, PAZ et al., 2006; ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010, 2011; LEÃO et al., 2015
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	VIDAL et al, 2007; HENRIQUE et al., 2013; HENRIQUE et al., 2014
<i>Saguinus labiatus</i>	SANKAI et al., 1997
<i>Saguinus leucopus</i>	POCHES, 2012; POUCHES; BRIEVA; JIMÉNEZ, 2013
<i>Saguinus mystax</i>	HARRISON; WOLF, 1985
<i>Saimiri boliviensis</i>	YEOMAN et al., 1997a, 1997b, 1998; ROUDEBUSH; MATHUR, 1998; STEINBERG et al., 2009
<i>Saimiri collinsi</i>	OLIVEIRA et al., 2015
<i>Saimiri sciureus</i>	BENNETT, 1967; LANG, 1967; ACKERMAN; ROUSSEL, 1968; DENIS et al., 1976; KUGELMEIER, 2011

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

Com relação aos PVM, são reconhecidas 183 espécies e subespécies de primatas asiáticos (BRANDON-JONES et al., 2004) e 174 espécies e subespécies

de primatas africanos (GRUBB et al., 2003), totalizando 357 espécies e subespécies de PVM. Dessas, apenas 25 (7%) foram estudadas quanto à caracterização, processamento ou conservação de sêmen (Quadro 2).

A porcentagem de espécies de PN e PVM estudadas (7%) é a mesma, entretanto o número de trabalhos publicados, ou seja, a quantidade de conhecimento disponível em relação às espécies de PN é bem menor quando comparada às espécies de PVM. Apesar da pouca quantidade de informação disponível, sabe-se que a fisiologia reprodutiva dos PVM difere daquela dos PN. Por exemplo, as concentrações séricas dos hormônios sexuais são bem maiores em PN, quando comparados aos PVM; poucas espécies de PN apresentam ciclo menstrual, enquanto que esse é o padrão para PVM; na maioria das espécies de PN não ocorrem alterações morfológicas externas ciclo-dependentes (sinais visuais) ou essas são imperceptíveis, ao contrário do que ocorre em PVM; em contraste, os PN dependem muito mais de sinais olfatórios, tais como glândulas de cheiro e urina, o que não ocorre em PVM (DIXSON, 2012). Por este motivo, nem sempre é possível adaptar protocolos desenvolvidos para PVM, o que gera a necessidade de desenvolvimento de protocolos e técnicas específicas para PN.

Quadro 2 - Espécies de Primatas do Velho Mundo cujo sêmen foi estudado com relação à caracterização, processamento e conservação

<i>Cercopithecus (Chlorocebus) aethiops</i>	ROUSSEL; AUSTIN, 1967a; 1967b; SEIER et al., 1989; HIYAOKA; CHO, 1990; HORST et al., 1999; SPARMAN et al., 2007; SKERGET et al., 2013
<i>Erythrocebus patas</i>	ROUSSEL; AUSTIN, 1967a, b
<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	WARNER; MARTIN; KEELING, 1974; PLATZ et al., 1980; BEEHLER et al., 1982; BADER, 1983; SCHAFFER; JEYENDRAN; BEEHLER, 1991; POPE et al., 1997; BROWN; LOSKUTOFF, 1998; O'BRIEN et al., 2005
<i>Hylobates moloch</i>	ASTUTI et al., 2008
<i>Macaca arctoides</i>	GRANADOS et al., 2014
<i>Macaca assamensis</i>	SHANGCHUAN et al., 1994; LI; GAO; JI, 2004
<i>Macaca fascicularis</i>	CROSS et al., 1989; YEUNG; WEINBAUER; NIESCHLAG, 1989; TOLLNER et al., 1990; SARASON et al., 1991; MAHONY et al., 1993; FOSTER; MCMAHON; RICE, 1996; YEUNG et al., 1996; TORII; NIGI, 1998; LUETJENS; WEINBAUER, 2012; NG et al., 2002; MAHONY et al., 1996; OKADA et al., 2001; LI et al., 2005a; LI et al., 2005b; LI et al., 2006; MORICHIKA et al., 2012
<i>Macaca fuscata</i>	TORII; NIGI, 1998; TORII et al., 2000; OKADA et al., 2001; KAWASE; CAO; XUAN, 2015
<i>Macaca fuscata yakui</i>	THOMSEN, 2014
<i>Macaca irus</i>	SCHAFFER et al., 1989b
<i>Macaca mulatta</i>	MASTROIANNI; MANSON, 1963; WEISBROTH; YOUNG, 1965; HOSKINS; PATTERSON, 1967; ROUSSEL; AUSTIN, 1967a, b; SETTLAGE; HENDRICKX, 1974; BAVISTER et al., 1984; BOATMAN; BAVISTER, 1984; WOLF et al., 1989; LANZENDORF et al., 1990; SARASON et al. 1991; SHANGCHUAN et al., 1994; SCHRAMM; BAVISTER, 1996, 1999; SCHRAMM; PAPROCKI; VANDEVOORT, 2003; VANDEVOORT, 2004; WOLF, 2004; WOLF et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2008; GOFF; LIUKKONEN; KUBISCH, 2009; WOLF, 2009; MCCARTHY et al., 2010; SITZMANN et al., 2010; SKERGET et al., 2013. Para estudos de criopreservação de sêmen, ver Tabelas 1 e 2.
<i>Macaca nemestrina</i>	REZNICHECK et al., 1968; SCHAFFER et al., 1989b
<i>Macaca nigra</i>	THOMSON et al., 1992
<i>Macaca radiata</i>	KALLA et al., 1986; KINGER et al., 1995; RAMESH et al., 1998
<i>Macaca silenus</i>	SCHAFFER et al., 1989a, b
<i>Macaca speciosa</i>	ROUSSEL; AUSTIN, 1967a, b
<i>Macaca tibetana</i>	SHANGCHUAN et al., 1994
<i>Pan troglodytes</i>	ROUSSEL; AUSTIN, 1967a, b; WARNER; MARTIN; KEELING, 1974; BADER, 1983; MARSON et al., 1988; MARSON et al., 1989; GOULD; YOUNG, 1990; YOUNG; SMITHWICK; GOULD, 1995; AGCA et al., 2005; O'BRIEN et al., 2003; 2005
<i>Pan paniscus</i>	BADER, 1983
<i>Papio anubis</i>	SCHAFFER et al., 1992; CSEH et al., 2000; AMBOKA; MWETHERA, 2003; LUIS et al.; 2009; NYACHIEO et al., 2010
<i>Papio hamadryas hamadryas</i>	O'BRIEN et al., 2003; 2005; MATSON; KAPELLE; MALECKI, 2009
<i>Papio sp.</i>	KRAEMER; VERA-CRUZ, 1969
<i>Papio ursinus</i>	BORNMAN et al., 1988
<i>Pongo pygmaeus</i>	WARNER; MARTIN; KEELING, 1974; VANDEVOORT et al., 1993
<i>Presbytis entellus entellus</i> Dufresene	LOHIYA; ANSARI; BARCELLONA, 1991; LOHIYA; MANIVANNAN; MISHRA, 1998; MISHRA et al., 2003; LOHIYA et al., 2008; SRIVASTAVA, 2014

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

2.3.1 Métodos de colheita de sêmen em primatas não-humanos

Existem diversos métodos de colheita de sêmen descritos para primatas não-humanos, incluindo eletroejaculação (várias espécies – FUSSEL; ROUSSEL; AUSTIN, 1967), vibroestimulação peniana (*Saimiri boliviensis* – YEOMAN et al., 1997b); (*Callithrix jacchus* – KUEDERLING et al., 2000); (*Callithrix penicillata* – MASSAROTTO et al., 2010); e *Leontopithecus chrysomelas* (HENRIQUE et al., 2013), lavagem vaginal (*Callithrix jacchus* – KUEDERLING; MORRELL; NAYUDU, 1996), vagina artificial (*Pongo pygmaeus* – VANDEVOORT et al., 1993; *Pan troglodytes* – YOUNG; SMITHWICK; GOULD, 1995), masturbação ou autoestimulação (THOMSEN, 2014), estimulação manual realizada por um técnico (*Pan troglodytes* – MARSON et al., 1988; *Chlorocebus aethiops* – HIYAOKA; CHO, 1990; *Gorilla gorilla gorilla* – BROWN; LOSKUTOFF, 1998), punção do epidídimo *in vivo* (*Chlorocebus aethiops* – SPARMAN et al., 2007) e extração de espermatozoides do epidídimo (*Callithrix jacchus* e *Macaca fascicularis* – YEUNG et al., 1996) ou ducto deferente (*Macaca mulatta* – GOFF; LIUKKONEN; KUBISCH, 2009) *post-mortem* ou pós-castração. Sem dúvida, o método mais utilizado é a eletroejaculação. Este método é seguro e efetivo para a colheita de sêmen de animais selvagens em geral, incluindo primatas não-humanos (GOULD; WARNER; MARTIN, 1978; BUTLER et al., 1995). A eletroejaculação pode ser feita por meio de sonda retal ou eletrodos penianos (FUSSEL; ROUSSEL; AUSTIN, 1967). Em PVM ambas as técnicas foram descritas. Já para PN, apenas a técnica de probe retal foi descrita.

O método de colheita a ser utilizado depende da praticidade e viabilidade do método, de acordo com a espécie e a situação. No caso de trabalhos pontuais, com espécies de médio a grande porte, como é o caso dos bugios, é comum a utilização da eletroejaculação com probe retal, pois a mesma não exige treinamento prévio do animal e tem altas taxas de sucesso (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO et al., 2014). Já para espécies pequenas, como é o caso dos calitriquídeos, pode-se utilizar a técnica de vibroestimulação peniana (YEOMAN et al., 1997b; KUEDERLING et al., 2000; MASSAROTTO et al., 2010; HENRIQUE et al., 2013). No caso de grandes centros de pesquisa, onde se realizam estudos

frequentes na área de reprodução, especificamente, ou estudos que dependam da realização de técnicas de reprodução assistida, é comum a manutenção de indivíduos treinados para colheita de sêmen por eletroejaculação peniana, como é o caso dos macacos-rhesus (VANDEVOORT, 2004).

2.3.2 Particularidades do sêmen de primatas não-humanos e implicações técnicas

As técnicas para preservação de espermatozoides são extremamente importantes para uso em manejo genético, principalmente para compor bancos de germoplasma, para propagação de informação genética de um indivíduo por longos períodos ou várias gerações futuras (VALLE, 2007). Entretanto, um dos principais problemas para se obter sucesso com biotécnicas da reprodução, é a baixa qualidade do sêmen, o que tem limitado o uso destas técnicas em espécies ameaçadas (ROTH, 1993). Em se tratando de primatas, a coagulação do sêmen durante ou após a ejaculação da maioria das espécies, resulta em qualidade seminal variável e dificuldade na análise (VALLE et al., 2004). A seguir será apresentada uma teoria evolutiva para a formação do coágulo seminal e as técnicas utilizadas para processamento do sêmen de primatas não-humanos, de forma a tentar obter amostras viáveis.

2.3.2.1 Teoria evolutiva para formação do coágulo seminal

A coagulação do sêmen é descrita em diversas espécies, desde artrópodes (PARKER, 1988), até répteis (DEVINE, 1984) e mamíferos, incluindo roedores, (ARBOR, 1979) e primatas (DIXON; ANDERSON, 2002). De acordo com Dixon e Anderson (2002), existem algumas teorias para a formação do coágulo seminal ou tampão copulatório (do inglês, *copulatory plug*). Uma delas seria a formação de uma barreira física para o sêmen de outros machos que venham a copular com aquela

fêmea, enquanto outra possibilidade seria evitar a perda de espermatozoides a partir do trato reprodutivo da fêmea após a ejaculação, ou a proteção desses espermatozoides até que consigam ascender em direção ao local de fecundação dos oócitos. Qualquer uma dessas “estratégias” seriam benéficas com relação à competição espermática.

De acordo com Parker (1998, p. 4), pode-se definir competição espermática como “competição entre espermatozoides de dois ou mais machos, para a fecundação de um dado conjunto de oócitos”. Ou seja, a competição espermática ocorre em todas as espécies em que a fêmea copula com mais de um macho durante o período fértil. Isso implica que o espermatozoide capaz de fecundar um determinado oócito, confere vantagem adaptativa para o macho que gerou esse espermatozoide (PARKER, 1970). A partir disso, foram geradas diversas teorias relacionadas à seleção sexual por meio da competição espermática.

Dessa forma, a formação do coágulo seminal pode ter sido selecionada evolutivamente, como uma vantagem adaptativa com relação à competição espermática. Para comprovar essa teoria, um estudo verificou que, de modo geral, espécies que apresentam maior competição espermática (sistemas poliândrico e poligínico-poliândrico), apresentam maior grau de coagulação, enquanto que espécies que possuem menor competição espermática (sistemas monogâmico e poligínico), possuem menor grau de coagulação (DIXSON; ANDERSON, 2002).

Além da formação do coágulo seminal, outras características foram relacionadas à competição espermática e seleção sexual. Essas características incluem tanto características seminais, tais como qualidade seminal (MOLLER, 1988) e motilidade espermática (NASCIMENTO et al., 2008), como características anatômicas dos machos, tais como tamanho testicular (DIXSON, 1987; MOLLER, 1988) morfologia peniana (DIXSON, 1987) e tamanho das vesículas seminais (DIXSON, 1998).

As características seminais das espécies utilizadas no presente estudo, incluindo a formação ou não de coágulo seminal, serão descritas em separado.

2.3.2.2 Processamento do sêmen

Em geral, em PVM, a incubação da amostra de sêmen por 30 minutos em temperatura ambiente (VANDEVOORT et al., 2004) ou a 37°C (WARNER; MARTIN; KEELING, 1974; SI et al., 2000), permite a obtenção de uma fração líquida, rica em espermatozoides. Em PN, as características do coágulo variam de acordo com a espécie, indo desde a ausência de coagulação, como no caso de *Alouatta caraya* (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO, 2012), até a formação de um coágulo firme com ou sem a presença de uma fração líquida, como ocorre em *Ateles* spp. (HERNÁNDEZ-LOPES et al., 2002a; SILVA et al., 2013) *Cebus* (*Sapajus*) *apella* (BUSH et al., 1975) e *Saimiri* spp. (BENNETT, 1967; YEOMAN et al., 1997b), entre outros. Outra dificuldade encontrada é o volume pequeno de sêmen obtido em alguns casos. Em PVM o volume varia desde uma média de 300 µl (intervalo de variação de 200 a 600 µl) para *Gorilla gorilla* (WARNER; MARTIN; KEELING, 1974) até 7800 ± 6400 µl para *Papio* sp. (KRAEMER; VERA-CRUZ, 1969). Já em PN o volume varia desde 7,02 ± 0,54 µl para *Callithrix penicillata* (MASSAROTO et al., 2010) até 4000 ± 600 µl para *Ateles geoffroyi* (HERNÁNDEZ-LOPES et al., 2002a). Dessa forma, o processamento da amostra varia de acordo com as características seminais de cada espécie.

2.3.3 Estudo do sêmen de *Alouatta caraya*

Os estudos de sêmen de *Alouatta caraya* são bem mais recentes e escassos em relação aos de *Macaca mulatta* (descrito no item 2.3.4). Um trabalho pioneiro avaliou aspectos da fisiologia reprodutiva de seis machos *Alouatta caraya* mantidos no Riverbanks Zoological Park and Botanical Garden, nos Estados Unidos (EUA). Os objetivos foram avaliar a qualidade do sêmen e concentração de metabólitos fecais de testosterona, ao longo de um ano e meio, além de comparar a qualidade do sêmen de animais adultos e subadultos, e avaliar o efeito do plasma seminal na longevidade do sêmen. Para o procedimento, os animais foram anestesiados com 10

mg/kg de quetamina e mantidos em plano anestésico com isoflurano. Após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma cunha de espuma. O sêmen foi coletado por meio de eletroejaculação por sonda retal, utilizando-se de sonda de 1,3 a 1,6 cm de diâmetro, com três eletrodos longitudinais. Os estímulos foram aplicados com um padrão de voltagem crescente, de 2 a 6 V, sendo 10 a 20 estímulos por voltagem. De modo geral, a amostra era obtida quando a voltagem atingia 5 a 6 v, pelo menos 10 minutos após o início da estimulação. A concentração de metabólitos de testosterona foi constante ao longo do ano para a maioria dos indivíduos. Os maiores volumes foram obtidos no verão e as concentrações foram muito variáveis ao longo do ano. Os parâmetros motilidade, pH e osmolalidade, foram constantes ao longo do período. As características seminais dos subadultos foram semelhantes às dos adultos. Entretanto, os subadultos apresentaram porcentagem maior de espermatozoides anormais e baixa longevidade espermática *in vitro*. Já os adultos, apresentaram longevidade maior que 5 horas, quando da remoção do plasma seminal (MORELAND et al., 2001).

Posteriormente, em outro trabalho com nove machos *Alouatta caraya*, mantidos no Centro Nacional de Primatas, no Brasil, foram avaliados volume, concentração, motilidade, integridade de membrana plasmática e morfologia espermática. Neste estudo, utilizou-se protocolo anestésico, modelo de sonda, e protocolo de estimulação diferentes do estudo anterior, o que resultou em 100% de sucesso nas colheitas, além de nenhuma amostra contaminada por urina, contra 28% de contaminação no trabalho anterior. Os animais foram anestesiados com uma associação de 7,5 mg/kg de quetamina e 0,5 mg/kg de xilazina e posicionados em decúbito ventral sobre um suporte de madeira. O sêmen também foi colhido por eletroejaculação por sonda retal, porém a sonda utilizada tinha um diâmetro de 1,2 cm e o eletrodo era composto por duas folhas de metal que envolviam toda a circunferência da sonda, ao invés de três eletrodos longitudinais. Os estímulos foram aplicados com padrão de voltagem crescente, de 2 a 8 V, sendo cada série de estímulos composta por 30 estímulos, com duração de 2 a 3 s e intervalo de 1 a 2 s (VALLE et al., 2004).

Recentemente, um terceiro trabalho avaliou o efeito de colheitas sucessivas sobre algumas características seminais de seis machos *Alouatta caraya*. O método de colheita utilizado foi o mesmo utilizado por Valle et al. (2004). Foram avaliados

motilidade total e progressiva, pH, concentração, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e atividade citoquímica mitocondrial. O estudo mostrou que houve melhora geral da qualidade do sêmen da primeira à quinta colheita, com destaque para concentração, motilidade total e progressiva e integridade de acrossoma (CARVALHO et al., 2014).

Com relação ao volume de sêmen dessa espécie foram relatados volumes de 10 a 203 μl (MORELAND et al., 2001), $90 \pm 50 \mu\text{l}$ (VALLE et al., 2004) e $86,8 \pm 10,4$ (CARVALHO et al., 2014). Este pequeno volume pode, eventualmente, ser compensado por concentrações de 7 a 583×10^6 spz/ml (MORELAND et al., 2001), $649,5 \pm 926,7 \times 10^6$ spz/ml (VALLE et al., 2004) e $726,0 \pm 129 \times 10^6$ spz/ml (CARVALHO et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, ao contrário do que ocorre na maioria dos primatas, não foi observado formação de coágulo em nenhuma das amostras de *Alouatta caraya*, de acordo com os estudos disponíveis na literatura (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO et al., 2014), mesmo em amostras não diluídas (MORELAND et al., 2001). O primeiro trabalho (MORELAND et al., 2001) avaliou as amostras tanto frescas e sem diluição prévia, como após lavagem com uma solução comercial para lavagem de sêmen com 5 mg/ml de albumina sérica humana (*Sperm Washing Medium* - SWM, Irvine Scientific). Para lavagem, as amostras foram diluídas na proporção de 1:1 com SWM e centrifugadas a 300 g por 10 minutos. Como mencionado anteriormente, para os machos adultos, a remoção do plasma seminal proporcionou maior longevidade espermática *in vitro*. Os outros dois trabalhos (VALLE et al., 2004; CARVALHO et al., 2014) utilizaram a solução de Ringer com lactato para diluição imediata das amostras de sêmen e não submeteram as amostras à centrifugação, ou seja, não houve remoção do plasma seminal.

Como mencionado anteriormente, segundo trabalho recente (OKLANDER; KOWALEWSKI; CORACH, 2014), o sistema de acasalamento do bugio-preto é poligínico-poliândrico. Portanto, a ausência do coágulo seminal nessa espécie contraria a teoria evolutiva para formação do coágulo que diz que espécies com maior competição espermática, apresentam maior grau de coagulação (DIXSON; ANDERSON, 2002). Isso ressalta a necessidade de estudos com relação aos aspectos reprodutivos dessa espécie.

2.3.4 Estudo do sêmen de *Macaca mulatta*

Os estudos de sêmen de *Macaca mulatta* datam desde 1963 (MASTROIANNI; MANSON, 1963). Neste primeiro estudo o sêmen foi colhido por eletroejaculação peniana, utilizando-se de eletrodos metálicos. Em 1965, Weisbroth e Young descreveram uma técnica de eletroejaculação por meio de sonda retal, baseada em uma técnica descrita anteriormente para colheita de sêmen de ruminantes domésticos. Já em 1991, Sarason et al. descreveram uma nova técnica de eletroejaculação peniana utilizando-se de eletrodos não metálicos, obtidos a partir de eletrodos descartáveis para desfibrilador cardíaco, cortados em tiras. Este novo método reduziu em muito o risco de lesões, principalmente durante o período de adaptação. A eletroejaculação peniana permite a obtenção de amostras com volume e concentração maiores quando comparada à eletroejaculação com sonda retal. Entretanto, requer treinamento dos indivíduos para o procedimento, visto que o animal se encontra acordado durante a colheita (VANDEVOORT, 2004). O volume de sêmen dessa espécie varia de 20 a 1200 μl (média de 387 μl) e a concentração varia de 6×10^6 a 1260×10^6 espermatozoides/ml (média de 136×10^6 espermatozoides/ml) (VANDEVOORT, 2004).

Assim como na maioria dos primatas não-humanos, o sêmen desta espécie coagula durante ou logo após a ejaculação (SETTLAGE; HENDRICKX, 1974), o que corrobora a teoria evolutiva para formação do coágulo seminal (DIXSON; ANDERSON, 2002). Quando se iniciaram os estudos de sêmen de *Macaca mulatta*, houve preocupação com relação à dissolução ou eliminação do coágulo. Alguns estudos testaram o uso de enzimas (proteolíticas ou hidrolíticas) na tentativa de dissolução do coágulo. As enzimas tripsina a 1% (ROUSSEL; AUSTIN, 1967a) e α -quimiotripsina a 2% (HOSKINS; PATTERSON, 1967) apresentaram os melhores resultados, dentre as enzimas testadas. Um estudo posterior testou o uso da enzima α -quimiotripsina a 5% e obteve resultados insatisfatórios (SETTLAGE; HENDRICKX, 1974). Na tentativa de evitar o uso de enzimas de forma a não interferir nos estudos bioquímicos, um estudo avaliou a remoção cirúrgica da porção cranial da próstata, como forma de evitar a formação do coágulo, visto que a substância responsável

pela coagulação do sêmen é proveniente desta região (GREER; ROUSSEL; AUSTIN, 1968). A técnica foi bem-sucedida em dois animais e não houve diferença notável no volume da amostra e na concentração e motilidade dos espermatozoides. Apesar dos resultados positivos obtidos com essas técnicas (digestão enzimática do coágulo e remoção cirúrgica da próstata cranial), as mesmas não foram incorporadas na rotina. Segundo revisão de VandeVoort (2004), para obtenção de sêmen de alta qualidade para uso em ARTs, devem-se seguir os seguintes passos: (1) o sêmen deve ser colhido por eletroejaculação peniana de animais previamente treinados para o procedimento, preferencialmente pela manhã; (2) após a colheita, a amostra deve ser mantida à temperatura ambiente por 30 minutos para que ocorra a separação da fração líquida; (3) a fração líquida deve ser separada do coágulo e lavada três vezes em 15 ml de meio de Tyrode modificado com albumina, lactato e piruvato, associado a Hepes, conhecido como TALP-Hepes. A centrifugação deve ser realizada a no máximo 400 g, devido à sensibilidade dos espermatozoides à força centrífuga. Desta forma, não se faz necessário o uso de enzimas digestivas ou a remoção cirúrgica da próstata cranial.

2.4 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Existem diversas técnicas descritas para avaliação da qualidade seminal. A seguir será apresentada uma revisão das técnicas utilizadas para avaliação das características seminais que serão utilizadas neste trabalho, que incluem (1) avaliação da integridade de membrana plasmática, (2) avaliação da integridade de acrossoma, (3), avaliação da atividade mitocondrial, (4) avaliação do estresse oxidativo, e (5) avaliação do índice de fragmentação de DNA.

2.4.1 Integridade de membrana plasmática

A avaliação da vitalidade espermática (termo antigo) ou integridade de membrana plasmática é importante, pois permite a diferenciação entre espermatozoides imóveis vivos e espermatozoides imóveis mortos (BJÖRNDAHL; SÖDERLUND; KVIST, 2003). Dessa forma, essa técnica se apresenta como uma forma de controle da avaliação da motilidade, pois o número de células mortas não deve exceder o número de células imóveis (WHO, 2010).

A avaliação pode ser feita por meio do teste hiposmótico ou de corantes (método de exclusão de corante) (WHO, 2010). O teste hiposmótico se baseia no estresse osmótico provocado por uma solução hiposmótica em relação ao espermatozoide, ou seja, os espermatozoides com membrana plasmática íntegra irão absorver água e aumentar de volume, com conseqüente enrolamento da cauda, enquanto os espermatozoides com membrana lesada não irão absorver água (MATSON; KAPELLE; MALECKI, 2009). Este teste foi descrito apenas para sêmen de PVM, *Papio hamadryas hamadryas* (MATSON; KAPELLE; MALECKI, 2009) e *Macaca silenus* (SCHAFFER et al., 1989b).

O método de exclusão de corante se baseia no princípio de que membranas plasmáticas lesadas permitem a entrada de determinados corantes, enquanto membranas plasmáticas íntegras não permitem a entrada desses corantes (WHO, 2010). O uso de corantes foi descrito para várias espécies de primatas não-humanos. A maioria dos estudos utilizam corantes à base de eosina, isolada ou em combinação com anilina azul (SHAFFER; ALMQUIST, 1948), nigrosina (BLOM, 1950), *fast green* (MAYER et al., 1951), entre outros. Estes corantes foram utilizados para sêmen de *Macaca mulatta* (HOSKINS; PATTERSON, 1967), *Macaca fuscata* (WEISBROTH; YOUNG, 1965), *Macaca nemestrina* (WEISBROTH; YOUNG, 1965; REZNICHECK et al., 1968), *Pan troglodytes*, *Pongo pygmaeus* e *Gorilla gorilla* (WARNER; MARTIN; KEELING, 1974) *Papio ursinus* (BORNMAN et al., 1988), *Papio anubis* (SCHAFFER et al., 1992), *Saimiri boliviensis* (BENNETT, 1967), *Callithrix jacchus* (KUEDERLING; MORRELL; NAYUDU, 1996; MORRELL; KÜDERLING; HODGES, 1996; KUEDERLING et al., 2000; VALLE, 2007; VALLE et al., 2008), *Cebus apella* (BUSH et al., 1975; ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al.,

2010, 2011), *Callithrix penicillata* (MASSAROTO et al., 2010), *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011a), *Alouatta caraya* (VALLE et al., 2004; CARVALHO et al., 2014), *Ateles geoffroyi* (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2002a,b; FLORES-HERRERA et al., 2012) e *Leontopithecus chrysomelas* (HENRIQUE et al., 2013, 2014).

Também é possível a avaliação da integridade da membrana plasmática por meio de corantes fluorescentes. Nesta técnica, a contagem pode ser feita por um observador ao microscópio (técnica subjetiva) ou por meio de citometria de fluxo (técnica objetiva). Ambas as técnicas foram descritas para sêmen de *Macaca fascicularis*. A técnica subjetiva foi feita com o corante Hoechst 33258 (TOLLNER et al., 1990; LI et al., 2005b), enquanto a técnica objetiva foi feita com a combinação dos corantes Hoechst 33342 e iodeto de propídio (LI et al., 2005a).

2.4.2 Integridade de acrossoma

O acrossoma contém enzimas envolvidas no processo de fecundação, responsáveis pela penetração do espermatozoide no oócito (GARNER; HAFEZ, 2004). Existem técnicas para averiguar a presença ou ausência do acrossoma nos espermatozoides, as quais já foram descritas para sêmen de primatas não-humanos. Dentre estas técnicas encontra-se a coloração com sondas fluorescentes, tais como o isotiocianato de fluoresceína conjugado à aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA) ou a aglutinina do amendoim (FITC-PNA), descritas para sêmen de *Callithrix jacchus* (O'BRIEN et al., 2003; PUDRITZ, 2000; VALLE et al., 2008) e *Macaca fascicularis* (LI et al., 2005a; 2005b). Outras técnicas utilizadas em PN incluem a coloração com kit comercial Spermac[®], descrita para sêmen de *Callithrix jacchus* (VALLE, 2007) e *Alouatta caraya* (MORELAND et al., 2001; CARVALHO et al., 2014); além da coloração com corante simples para acrossoma, desenvolvida por Pope, Zhang e Dresser (1991) para sêmen de felinos, validada para sêmen de *Callithrix jacchus* (VALLE et al., 2008) e utilizada em *Cebus apella* (PAZ; TEIXEIRA; GUIMARÃES, 2006; PAZ et al., 2006), *Callithrix penicillata* (MASSAROTO et al., 2010), *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011a), *Alouatta caraya* (CARVALHO et al., 2014) e *Leontopithecus chrysomelas* (HENRIQUE et al., 2013, 2014). Adicionalmente, pode-

se utilizar a microscopia eletrônica de transmissão, como descrito para sêmen de *Ateles geoffroyi* (FLORES-HERRERA et al., 2012).

2.4.3 Atividade mitocondrial

De acordo com Motta, Nichi e Serafini (2011), existem vários testes para avaliação da função mitocondrial, dentre os quais incluem-se sondas fluorescentes tais como rodamina 123, JC-1 e Mitotracker vermelho, verde ou laranja, além da coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Ainda segundo esses autores, para utilização de sondas fluorescentes é necessário microscópio de fluorescência ou citômetro de fluxo. Isso limita essas técnicas a centros de pesquisa especializados e inviabiliza sua utilização a campo. Já a técnica de coloração com DAB, descrita por Hrudka (1987), exige apenas um microscópio de contraste de fase, o que a torna mais viável para utilização em várias situações. A técnica se baseia na análise quantitativa e qualitativa da atividade da enzima citocromo c oxidase (CCO) – enzima da cadeia respiratória responsável pela produção de energia mitocondrial – por meio da enzima 3,3'-diaminobenzidina. A atividade mitocondrial está envolvida no processo de respiração celular e produção de energia do espermatozoide, principalmente quando ocorre alteração do metabolismo energético sem alterar a membrana (KATO et al., 2002). Esta técnica ainda não foi descrita para PVM, mas foi descrita para alguns PN, incluindo *Callithrix jacchus* (VALLE, 2007), *Callithrix penicillata* (MASSAROTO et al., 2010) *Alouatta caraya* (CARVALHO et al., 2014) e *Leontopithecus chrysomelas* (HENRIQUE et al., 2014).

2.4.4 Estresse oxidativo

Um dos fatores reconhecidamente responsáveis pela diminuição da qualidade espermática pós-descongelamento é o estresse oxidativo (BANSAL; BILASPURI, 2010). Segundo revisão recente, a produção de adenosina trifosfato (ATP) gera

intermediários relativamente instáveis conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). Quando ocorre distúrbio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante das células, estas ROS se acumulam e causam estresse oxidativo. A membrana celular é um dos principais alvos do estresse oxidativo, por ser formada por grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs, do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*), que sofrem a chamada peroxidação lipídica. Esta gera o acúmulo de hidroperóxidos e a formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), que alteram a membrana celular e geram transtornos de permeabilidade com consequentes alterações de DNA, proteínas e componentes da matriz extracelular (LUZ et al., 2011). A reação do ácido tiobarbitúrico (TBA, do inglês *Thiobarbituric acid*) com o MDA gera um pigmento vermelho que pode ser quantificado por espectrofotometria, com comprimento de onda de 532 nm (OHKAWA; OHISH; YAGI, 1979). A reação de peroxidação lipídica pode ser espontânea (OHKAWA; OHISH; YAGI, 1979) ou induzida (AITKEN et al., 1993). A reação induzida é desencadeada por um promotor e mede a disponibilidade de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática para iniciar a reação de peroxidação e a habilidade do espermatozoide de inibir a continuidade do processo. A avaliação da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *Thiobarbituric acid reactive species*) pela peroxidação lipídica de espermatozoides, já foi descrita em algumas espécies, incluindo o homem (AITKEN et al., 1993), touro (NICHI, 2009), rato (SÖNMEZ; TÜRK; YÜCE, 2005), cão (HATAMOTO et al., 2006), gato-do-mato-pequeno (BARROS, 2007), perdiz (GÓES, 2008), cavalo (MORTE et al., 2008), suíno (PIPAN et al., 2014) e coelho (GLIOZZI et al., 2009). Recentemente, foi descrita, pela primeira vez, para sêmen de um primata não-humano, *Alouatta caraya* (CARVALHO, 2012; CARVALHO et al., 2012).

2.4.5 Fragmentação de DNA

Existem várias técnicas disponíveis para avaliação da estrutura da cromatina espermática e da integridade do DNA, as quais incluem o ensaio de eletroforese em

gel de célula única (Cometa), o ensaio *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling* (TUNEL), o ensaio *Nick Translation in situ* (NT), o teste de laranja de acridina (AOT, do inglês *Acridine Orange Test*) e o teste de estrutura da cromatina espermática, conhecido pela sigla em inglês, SCSA (EVENSON; LARSON; JOST, 2002). Contudo, o SCSA, desenvolvido por Evenson, Darzynkiewicz e Melamed (1980) é o teste com maior poder estatístico, praticidade e eficiência, por avaliar de 5.000-10.000 células em poucos minutos, ao invés de 100-200 células, como os outros métodos. O SCSA mede a susceptibilidade do DNA à desnaturação ácida e é capaz de predizer tanto subfertilidade ou infertilidade de machos, como a possibilidade de desenvolvimento embrionário após aplicação de técnicas de reprodução assistida (EVENSON; JOST, 2000; EVENSON; LARSON; JOST, 2002; D'OCCHIO; HENGSTBERGER; JOHNSTON, 2007). Esta técnica já foi descrita para sêmen humano (EVENSON; LARSON; JOST, 2002) e de diversos animais tais como rato (EVENSON et al., 1993), cachaço (EVENSON; THOMPSON; JOST, 1994), garanhão (MORRELL et al., 2008), touro (BALLACHEY; EVENSON; SAACKE, 1988), carneiro (KASIMANICKAM et al., 2006), peixe (*Clarias gariepinus*), peru e *hamster* (LEWIN et al., 1999). Com relação aos primatas não-humanos, a técnica foi descrita para quatro espécies, *Macaca mulatta* (SITZMANN et al., 2010), *Macaca fascicularis* (FOSTER; MCMAHON; RICE, 1996; LEWIN et al., 1999), *Alouatta caraya* (CARVALHO, 2012; CARVALHO et al., 2012), e *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2012).

2.5 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS

No que se refere à criopreservação de sêmen, diluidores à base de gema de ovo têm sido usados amplamente. Segundo revisão realizada por Morrell e Hodges (1998), as concentrações de gema de ovo para criopreservação de sêmen de primatas não-humanos, variam de 5 a 30%, sendo que a maioria dos trabalhos utilizaram a concentração de 20%. Trabalhos posteriores à referida revisão utilizaram concentrações de 10% (SI et al., 2000; SI et al., 2004a,b; LI et al., 2005a; SI et al., 2006), 20% (FERADIS et al., 2001; LI; GAO; JI, 2004, 2005a; SILVA, 2005;

VALLE, 2007; DONG et al., 2008a; GAGLIARDI; MYERS; KUBISCH, 2008; OLIVEIRA et al., 2011; YANG et al., 2011a,b; LEÃO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015) ou 30% de gema de ovo (SI et al., 2000; LI, et al., 2005a; LEIBO et al., 2007; DONG et al., 2008b; GAGLIARDI; MYERS; KUBISCH, 2008; GOFF; LIUKKONEN; KUBISCH, 2009).

Dentre os diversos crioprotetores existentes, o mais utilizado para criopreservação de sêmen é o glicerol. Trata-se de um crioprotetor penetrante que pode ser tóxico e causar lesão ao deixar a célula após a descongelação. A sensibilidade celular ao efeito tóxico do glicerol varia de acordo com a espécie (ROYERE et al., 1996; MORRELL; HODGES, 1998; LEIBO; PICTON; GOSDEN, 2001; LI et al., 2005a; VALLE, 2007). A concentração de glicerol utilizada para criopreservação de sêmen de primatas não-humanos em geral varia de 1,5% (OLIVEIRA et al., 2015) até 14% (MORRELL; HODGES, 1998). Para PN, as concentrações utilizadas tendem a estar entre as mais baixas, de acordo com os trabalhos realizados até o momento, sendo 4% para *Saimiri sciureus* (DENIS et al., 1976), 8% para *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997a), 5% para *Saguinus labiatus* (SANKAI et al., 1997), 4 e 5% para *Callithrix jacchus* (MORRELL; HODGES, 1998; VALLE, 2007), 2,5 a 7% para *Cebus (Sapajus) apella* (OLIVEIRA et al., 2011; LEÃO et al., 2015), 7% para *Ateles paniscus* e *Ateles marginatus* (SILVA, 2005), 3 e 4% para *Alouatta caraya* (CARVALHO, 2012) e 1,5 e 3% para *Saimiri collinsi* (OLIVEIRA et al., 2015).

2.5.1 Criopreservação de sêmen de *Alouatta caraya*

Existe apenas um trabalho sobre criopreservação de sêmen de *Alouatta caraya*. O referido estudo avaliou diluidores à base de gema de ovo e de lecitina de soja com glicerol a 3 ou 4% para criopreservação de sêmen desta espécie (CARVALHO, 2012). Concluiu-se que o diluidor à base de gema de ovo com glicerol a 4% apresentou melhores resultados que os demais, apesar de também não ter tido resultados satisfatórios. Ainda, este trabalho apontou que os principais problemas observados após a criopreservação foram queda brusca da motilidade e da

integridade de membrana plasmática e aumento da suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo e à desnaturação ácida da cromatina.

2.5.2 Criopreservação de sêmen de *Macaca mulatta*

Ao contrário do que ocorre para *Alouatta caraya*, existem muitos estudos que avaliaram diferentes aspectos da criopreservação de sêmen de *Macaca mulatta* (Quadros 3 e 4). As concentrações de gema de ovo utilizadas variam de 0 a 50%. Entretanto, de acordo com alguns estudos, a presença da gema de ovo é essencial (DONG; CORREA; VANDEVOORT, 2009; DONG; HILL; VANDEVOORT, 2009; DONG; VANDEVOORT, 2009; MCCARTHY; MEYERS, 2011) e as concentrações de 20-30% parecem ser as ideais (DONG; CORREA; VANDEVOORT, 2009). Adicionalmente, um estudo revelou que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês, *low density lipoproteins*) são as principais responsáveis pela proteção dos espermatozoides durante a criopreservação, enquanto as lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês, *high density lipoproteins*), exercem um papel neutro (DONG et al., 2011). Apesar disso, o uso de LDL isolada não trouxe nenhuma vantagem em relação ao uso de gema de ovo integral. Os autores ressaltam ainda, que a gema de ovo integral contém outros fatores, tais como antioxidantes e aminoácidos que podem ser benéficos para a criopreservação de espermatozoides.

Com relação aos açúcares, foram testados diversos tipos e concentrações, incluindo glicose, sacarose, lactose, rafinose e dextrose. De acordo com Si et al. (2006), glicose e lactose foram mais adequados quando comparados à rafinose, visto que esta teve um efeito deletério sobre a integridade do acrossoma e da membrana plasmática.

Além da gema de ovo e dos açúcares, também foram avaliados diferentes crioprotetores, incluindo glicerol, dimetilssulfóxido (DMSO), etilenoglicol e propilenoglicol. Propilenoglicol e DMSO não são apropriados para criopreservação de sêmen desta espécie, ao passo que glicerol e etilenoglicol tiveram resultados semelhantes (SI et al., 2004a,b; DONG et al., 2008a; DONG; CORREA; VANDEVOORT, 2009).

Com relação às curvas de congelação, o mais comum é a utilização de uma fase de equilíbrio de 1,5 a 2 horas a 4°C, seguida de congelação em vapor de nitrogênio por 10 minutos, com velocidades variáveis (29 a 400°C/minuto).

Apesar da grande quantidade de estudos realizados, ainda não se chegou a um protocolo ideal. O maior problema observado é a rápida perda de motilidade pós-descongelação, o que torna a FIV inviável (WOLF et al., 2004). Faz-se necessário, portanto, o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação que permita a realização de FIV, ou seja, um protocolo que permita a manutenção da motilidade espermática pós-descongelação por um período prolongado.

Quadro 3 - Composição dos diluidores utilizados para criopreservação de sêmen de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*)

(continua)

Gema de ovo	Açúcar	Tampão	Crioprotetor	Outros	Motilidade pós-descongelção	Referência
20%	-	Solução de glutamato de sódio a 3%	Glicerol 14% (diluído 1:11)		27%	ROUSSEL; AUSTIN, 1967b
20%	-	Citrato de sódio 1,3%, Bicarbonato de sódio 0,55%, Fosfato de potássio 0,032%	Glicerol 7%	-	0 a ≈39%	LEVERAGE et al., 1972
-	Sacarose 80 mM	TALP-Hepes	Glicerol 5%		31,2 + 8,3%	YEOMAN et al., 2000
12%	Glicose 60 mM	Tes-Tris	Glicerol 3%	Leite desnatado 8%	55,4 + 7,4%	
20%	Glicose 111 mM, Lactose 5,6 mM, Rafinose 0,34 mM	Tes-Tris	Glicerol 5%	-	56 ± 5%	SI et al., 2000
30%	Glicose 42,7 mM	Tes-Tris	Glicerol 3%		17 ± 2%	
10%	Glicose 0,15 mol/L, Lactose 0,15 mol/L	-	Glicerol	-	47,3 ± 5,7%	SI et al., 2004a
			DMSO		22,09 ± 0,9	
			Etilenoglicol		44,8 ± 6,7%	
			Propilenoglicol		0 ± 0%	
10%	Glicose 1%, lactose 10%	Tris	Glicerol 2%	-	28,3 ± 4,8%	SI et al., 2004b
			Glicerol 5%		45,5 ± 4,0%	
			Glicerol 10%		32,4 ± 5,3%	
			Glicerol 15%		16,1 ± 4,6%	
			DMSO 2%		26,2 ± 3,8%	
			DMSO 5%		25,6 ± 4,4%	
			DMSO 10%		7,5 ± 1,3%	
			DMSO 15%		3,3 ± 1,1%	
-	Sacarose 0,1 M	TALP-Hepes	Glicerol 6%	-	17 ± 6%	YEOMAN et al., 2005
30%	Glicose 0,06 M	Tes-Tris	Glicerol 3%	Leite desnatado 20%	24 ± 5%	
30%	Glicose 0,06 M	Tes-Tris	Glicerol 3%	Leite desnatado 20%	49 ± 5%	

(continuação)

Gema de ovo	Açúcar	Tampão	Crioprotetor	Outros	Motilidade pós-descongelção	Referência
20%	Lactose 2 g/ml, Glicose 2 g/ml, Rafinose 0,2 g/ml	Tes-Tris	Glicerol 5%	-	48,74 ± 6,90%	LI et al., 2006
20%	Lactose 11 g/ml	-	Glicerol 4%	-	49,00 ± 5,53%	
10%	Lactose 10 g/ml, Glicose 1 g/ml		Glicerol 4%	-	49,14 ± 7,99%	
10%	Lactose 5,5 g/ml, Glicose 2,75 g/ml	-	Glicerol 4%	-	48,84 ± 6,48%	
10%	Glicose 5,5 mg/ml	-	Glicerol 4%	-	47,79 ± 6,10%	
20%	Glicose 0,5 mg/ml	Tris	Glicerol 5%	-	50,03 ± 6,78%	
10%	-	Solução salina – Controle	Glicerol 5%	NaCl 0,57 M	18,5 ± 3,9%	SI et al., 2006
	Glicose 0,3 M				41,2 ± 4,6%	
	Lactose 0,3 M				38,1 ± 6,0%	
	Rafinose 0,3 M				16,0 ± 3,1%	
	Glicose 0,15 M, Lactose 0,5 M				39,7 ± 5,6%	
	Glicose 0,15 M, Rafinose 0,15 M				38,1 ± 3,6%	
	Lactose 0,15 M, Rafinose 0,15 M				28,1 ± 5,9%	
	Glicose 0,1 M, Lactose 0,1M, Rafinose 0,1 M				42,3 ± 8,1%	
30%	Dextrose 1 g/100 ml	Tes-Tris	Glicerol 3%	Leite desnatado 20%	55%	LEIBO et al., 2007
30%	Dextrose 1 g/100 ml	Tes-Tris	Glicerol 3%, 6%, 9%, 12%	-	Média geral com glicerol a 3%=42%	DONG et al., 2008a
			Etilenoglicol 3%, 6%		-	
20%	Glicose 10 g/ L	Tes-Tris	Glicerol 3%	-	40 a 50%	DONG et al., 2008b

(continuação)

Gema de ovo	Açúcar	Tampão	Crioprotetor	Outros	Motilidade pós-descongelamento	Referência
20%	Glicose 10 g/L	Tes-Tris	Glicerol 3%	-	46,4 ± 4,8%	DONG; CORREA; VANDEVOORT, 2009
30%			-		36,1 ± 5,0%	
40%			-		37,1 ± 6,5%	
50%			-		<30%	
0%			-		<10%	
20%			-		10,6 ± 5,0%	
30%			-		43,0 ± 9,7%	
20%			Glicerol 3%		≈40%	
20%			Etilenoglicol 2%		55,4 ± 9,3%	
					56,4 ± 16,0	
30%	Dextrose 1 g/100 ml	Tes-Tris	Glicerol 3%	-	42,4%	GOFF; LIUKKONEN; KUBISC, 2009
20%	Glicose 10 g/L	Tes-Tris	Glicerol 3%	-	23,6 a 62,4%	DONG; HILL; VANDEVOORT, 2009
-			Etilenoglicol 2%		6,1 a 68,6%	
-			-		0 a 55,1%	
10%	Glicose 10 g/L	Tes-Tris	Glicerol 3%	-	7,9 a 34,9%	DONG; VANDEVOORT; 2009
20%					40,4 a 44,0%	
30%					38,5 a 43,1%	
40%					38,5 a 42,3%	
50%					36,5 a 43,1%	
2, 4, 8, 10 ou 20%					36,5 a 37,5%	
0%					52,9 a 58,4%	
20%					27,2 e 33,9%	
20%	45,6 e 54,6%					
20%	Glicose 2%, Lactose 2%, Rafinose 0,2%	Tes-Tris	Glicerol 2%	-	40,3 e 39,4%	SI et al., 2010
			Glicerol 5%		53,9 e 63,7%	

(conclusão)

Gema de ovo	Açúcar	Tampão	Crioprotetor	Outros	Motilidade pós-descongelamento	Referência
30%	Dextrose 1%	Tes-Tris	Glicerol 3%	Leite desnatado 20%	≈50%	MCCARTHY; MEYERS, 2011
				SOD 200 U/ml	≈70%	
				CAT 200 U/ml	≈50%	
				α-tocoferol 100 μM	≈30%	
0%				-	<10%	
20%	Glicose 111mM, Lactose 55,5mM, Rafinose 3,4mM	Tes-Tris	Glicerol 5%	-	43,6% (sem plasma seminal) 45% (com plasma seminal)	YANG et al.; 2011a
20%	Glicose 2%, Lactose 2%, Rafinose 0,2%	Tes-Tris	Glicerol 0,7 M	-	42,7 ± 12,5%	YANG et al., 2011b
			Etilenoglicol (EG) 0 M		8,6 ± 2,5%	
			EG 0,175 M		23,1 ± 6,6%	
			EG 0,35 M		32,3 ± 6,1%	
			EG 0,7 M		48,1 ± 9,2%	
			EG 1,4 M		25,4 ± 11,1%	
			EG 2,1M		11,3 ± 5,7%	
20%	Glicose 10 g/L	Tes-Tris	Glicerol 3%	-	49,0 ± 8% e 52,5 ± 14%	TOLLNER; DONG; VANDERVOORT, 2011
20%	Glicose 10 g/L	Tes-Tris	Glicerol 0 ou 3%	-	40 a 60%	DONG et al., 2011
-			Glicerol 0 ou 3%	LDL 8 ou 10%	45 a 60%	
-			Glicerol 0 ou 3%	HDL 1, 2, ou 4%	15 a 45%	
20%	Dextrose 1 g	Tes-Tris	Glicerol 3%	-	15 a 55%	MARTORANA; KLOOSTER; MEYERS, 2014

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

Legenda: TALP= Meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato; DMSO=dimetilssulfóxido; SOD=superóxido dismutase; CAT=catalase; LDL=lipoproteínas de baixa densidade; HDL=lipoproteínas de alta densidade

Quadro 4 - Curvas de congelação utilizadas para criopreservação de sêmen de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*)

(continua)

Fase de Equilíbrio	Fase de Congelação	Motilidade Pós-descongelação	Referência
-	8 min vapor LN2	27%	ROUSSEL; AUSTIN, 1967b
(1) 4°C/4 h (sem glicerol) + 18 h com glicerol	LN2	0	LEVERAGE et al., 1972
(2) 37°C/30 min		≈39%	
4°C/90 min	30 min vapor LN2	Ver Quadro 3	YEOMAN et al., 2000
4°C/2,5 h	10 min vapor LN2	56 ± 5%	SI et al., 2000
4°C/2 h		17 ± 2%	
4°C/2 h	10 min vapor LN2	Ver Quadro 3	SI et al., 2004a
4°C/2h	10 min vapor LN2	Ver Quadro 3	SI et al., 2004b
4°C/90 min	2 min vapor LN2	17 ± 6%	YEOMAN et al., 2005
4°C/90 min	2 min vapor LN2	24 ± 5%	
4°C/90 min	Gelo seco	49 ± 5%	
4°C/3 h	10 min vapor LN2	Ver Quadro 3	LI et al., 2006
4°C/2 h	10 min vapor LN2	Ver Quadro 3	SI et al., 2006
4°C/2 h	10 min vapor LN2	55%	LEIBO et al., 2007
4°C/2 h	-29°C/min	-	DONG et al., 2008a
	-220°C/min	55,8 ± 7,3%	
Temperatura ambiente/30 min	10 min vapor LN2	40 a 50%	DONG et al., 2008b
4°C/30 min			
4°C/1 h			
4°C/2 h			
4°C/3 h			
4°C/4 h			
4°C/2 h	-29°C/min ou -220°C/min	Curva mais rápida melhor na ausência de glicerol	DONG; CORREA; VANDEVOORT, 2009
4°C/2 h	10 min vapor LN2	42,4%	GOFF; LIUKKONEN; KUBISC, 2009
4°C/2 h ou 0°C/10 min	-5, -29, -220 ou -400°C/min	Ver Quadro 3	DONG; HILL; VANDEVOORT, 2009
4°C/2 h	-220 ou -400°C/min	Ver Quadro 3	DONG; VANDEVOORT; 2009
	-220°C/min		
4°C/2 h	10 min vapor LN2	40,3 a 53,9%	SI et al., 2010
	Direcional (gradiente de congelação em aparelho automático)	39,4 a 63,7%	

(conclusão)

Congelador automático		Ver Quadro 3	MCCARTHY; MEYERS, 2011
4°C/2 h	10 min vapor LN2	Ver Quadro 3	YANG et al.; 2011a
Fase de Equilíbrio	Fase de Congelação	Motilidade Pós-descongelação	Referência
4°C/2 h	-10 °C/min por 10 min	24,6 ± 4,2%	YANG et al.; 2011b
	-69 por 10 min	34,7 ± 5,4%	
	-183°C/min por 10 min	45,8 ± 6,6%%	
	-435°C/min por 10 min	36,3 ± 5,7%	
	-183°C/min por 5 min	44,9 ± 4,2%	
	-183°C/min por 10 min	51,4 ± 4,2%	
4°C/2 h	10 min vapor LN2	49,0 ± 8% e 52,5 ± 14%	TOLLNER; DONG; VANDERVOORT, 2011
4°C/2 h	10 min vapor LN2	Ver Quadro 3	DONG et al., 2011
Vários		15 a 55%	MARTORANA; KLOOSTER; MEYERS, 2014

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

Legenda: LN2=nitrogênio líquido

2.6 USO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (PUFAs) E ANTIOXIDANTES NO MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO

Estudos anteriores indicam que o ácido docosahexaenoico (DHA) é o PUFA mais importante para o espermatozoide, por atuar na fluidez da membrana espermática e na regulação da espermatogênese (OLLERO; POWERS; ALVAREZ, 2000). No entanto, a presença de grandes quantidades de DHA na membrana espermática, torna o espermatozoide mais susceptível ao ataque das ROS (NICHII, 2009). Com base nesta informação, o referido autor sugere que um tratamento que alterasse o perfil lipídico seminal ou espermático poderia causar impactos significativos conforme descrito a seguir. Caso os PUFAs fossem incorporados à membrana espermática, isto a tornaria ainda mais suscetível ao ataque das ROS, o que talvez pudesse ser evitado pelo tratamento com antioxidantes, tal como a vitamina E (α -tocoferol). Por outro lado, se os PUFAs não fossem incorporados, permanecendo no meio extracelular, haveria uma maior quantidade de substrato para o ataque das ROS, o que provavelmente pouparia as células espermáticas. Poucos são os estudos que relacionam o tratamento do sêmen com PUFAs a um possível efeito em relação à suscetibilidade ao ataque das ROS. Não foram

encontradas publicações que relatem tal correlação para o tratamento de amostras espermáticas em primatas não-humanos.

O tratamento do sêmen com vitamina E, combinada ou não com o DHA foi descrito para algumas espécies domésticas, tais como bode (ANSARI et al., 2012), touro (NASIRI; TOWHIDI; ZEINOALDINI, 2012), suíno (JEONG et al., 2009), cão (MICHAEL et al., 2007), carneiro (TOWHIDI et al., 2013) e uma espécie de primata não-humano, *Macaca mulatta* (MCCARTHY et al., 2010; MCCARTHY; MEYERS, 2011). Não foram encontrados trabalhos com sêmen de PN.

O Trolox^{TM1} é um análogo hidrossolúvel da vitamina E (WU; HASHIMOTO; AU, 1991) e, portanto, de mais fácil dissolução em relação à vitamina E propriamente dita. O tratamento do sêmen com TroloxTM foi descrito para algumas espécies, incluindo equino (SILVA et al., 2009), ovino (MAIA et al., 2010), caprino (SOARES et al., 2015) e humano (MINAEI et al., 2012). Não foram encontrados trabalhos com sêmen de PNH.

2.7 FOLICULOGÊNESE E MATURAÇÃO OOCITÁRIA

Durante a vida fetal são produzidas as oôgonias por divisão mitótica e estas se dividem por divisão meiótica para produzir oócitos primários. A divisão meiótica é interrompida, antes do nascimento, na Prófase I. Ao nascimento, os oócitos são circundados por uma única camada de células, compondo os folículos primordiais (HAFEZ; HAFEZ, 2004a). Segundo Zeleznik e Pohl (2006), a foliculogênese se inicia a partir do momento em que os folículos primordiais iniciam a transição para folículos primários. Para que isso ocorra, é necessário que as células da granulosa se tornem cúbicas e passem a se multiplicar (folículo pré-antral) até que formem de seis a sete camadas, momento em que se inicia a formação da cavidade antral e o desenvolvimento das células da teca (folículo antral). Paralelamente, inicia-se o crescimento do oócito. Os eventos que ocorrem até que o folículo atinja o estágio de folículo antral não dependem da ação de gonadotropinas – hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) – e duram cerca de 85 dias.

¹ F. Hoffman-La Roche Ltd

A partir do estágio de folículo antral, é necessário FSH para terminar o desenvolvimento do folículo como um todo, incluindo o oócito (ZELINSKI-WOOTEN et al., 1995; ZELEZNIK; POHL, 2006). O FSH produz mudanças significativas nos folículos, as quais permitem que estes passem a produzir hormônios esteroides e que se tornem responsivos ao LH, culminando com a ovulação (ZELEZNIK; POHL, 2006).

A maturação oocitária compreende duas fases – uma fase de crescimento, que acompanha o crescimento do folículo; e uma fase de maturação nuclear e citoplasmática, que ocorre momentos antes da ovulação e é dependente do pico de gonadotropinas (HAFEZ; HAFEZ, 2004b). A maturação nuclear se caracteriza pela retomada da meiose, com extrusão do primeiro corpúsculo polar, seguida de nova interrupção da meiose, desta vez na Metáfase II (HAFEZ; HAFEZ, 2004b). Já a maturação citoplasmática, se caracteriza por alterações na expressão de algumas moléculas tais como o receptor de inositol trifosfato (IP₃R), a glutatona e a proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII), entre outras (FLORMAN; DUCIBELLA, 2006). Essas alterações tornam o oócito competente para ativação oocitária, caracterizada pela capacidade de secreção de grânulos corticais, formação dos pronúcleos e término da meiose, com extrusão do segundo corpúsculo polar, após a fecundação pelo espermatozoide (MENG; WOLF, 1997; FLORMAN; DUCIBELLA, 2006). Conseqüentemente, falhas na maturação citoplasmática se caracterizam pela incapacidade de realizar diversas funções, tais como elevação do Ca²⁺ intracelular, secreção dos grânulos corticais, descondensação da cromatina espermática e formação dos pronúcleos (FLORMAN; DUCIBELLA, 2006).

2.8 IMPORTÂNCIA DESTE TRABALHO

A presente revisão permite concluir que ainda há muito o que se estudar em relação a todos os aspectos do sêmen de primatas não-humanos. Sabe-se muito pouco sobre algumas espécies e nada sobre a grande maioria das espécies. Dentre os PN, as espécies mais estudadas são *Cebus (Sapajus) apella*, *Saimiri sciureus* e *Callithrix jacchus*, com grande destaque para a última. Já em PVM, as espécies mais

estudadas são *Gorilla gorilla gorilla*, *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* e *Macaca mulatta*, com grande destaque para as duas últimas. Ainda assim, há lacunas a serem preenchidas, mesmo nessas espécies mais estudadas.

Certamente, a utilização da maioria dessas espécies em pesquisas biomédicas foi o que impulsionou a realização de estudos nas mesmas, com consequentes avanços no conhecimento. Em se tratando de conservação de espécies, o número de espécies estudadas é menor ainda, destacando-se as supracitadas *Cebus (Sapajus) apella* e *Gorilla gorilla gorilla*. Isso destaca a importância do presente trabalho, como forma de contribuir para a tão escassa literatura nessa área.

3 ESTUDO I - AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E DO EFEITO DO TRATAMENTO COM DHA E TROLOX™ NAS CARACTERÍSTICAS PÓS-DESCONGELAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE BUGIO-PRETO (ALOUATTA CARAYA)

Mais de 50% dos primatas não-humanos estão sob algum tipo de ameaça de extinção (PRIMATE SPECIALIST GROUP, 2014). As ARTs podem auxiliar na propagação de indivíduos de espécies ameaçadas, tanto *in situ* como *ex situ* (HOLT; PICKARD, 1999; ANDRABI; MAXWELL, 2007). Apesar do bugio-preto não ser considerado ameaçado de extinção pela IUCN (2014), acredita-se que, devido à disponibilidade e sucesso reprodutivo em cativeiro, essa espécie possa ser usada como modelo para outras espécies de bugio sob maior risco de extinção (MORELAND et al., 2001).

Existem apenas três estudos com a relação às características seminais de bugio-preto (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO et al., 2014). Com relação à criopreservação de sêmen dessa espécie, existe apenas um estudo (CARVALHO, 2012) que comparou diferentes diluidores – Test-gema de ovo com glicerol a 3 (G3) ou 4% (G4) e Test-lecitina de soja com glicerol a 3 (L3) ou 4% (L4). As motilidades total e progressiva pós-descongelação foram, respectivamente, $15,59 \pm 1,43\%$ e $5,12 \pm 0,85\%$ para L3; $16,29 \pm 1,18\%$ e $5,12 \pm 0,62\%$ para L4; $17,68 \pm 1,31\%$ e $9,23 \pm 1,04\%$ para G3; e $19,08 \pm 1,55\%$ e $9,76 \pm 1,21\%$ para G4. Concluiu-se que o diluidor à base de gema de ovo com glicerol a 4% apresentou melhores resultados, apesar de também não ter sido eficiente. Com base nesse último estudo, elaborou-se o presente estudo de forma a tentar sanar os problemas apresentados no estudo anterior.

A seguir serão descritos (1) os objetivos, (2) o delineamento experimental, (3) os animais que serão utilizados e a forma de obtenção das amostras, e (4) como serão processadas e analisadas as amostras do Estudo I.

3.1 OBJETIVOS

A) Objetivo geral: comparar protocolos de criopreservação de sêmen de *Alouatta caraya*.

B) Objetivos específicos

- Avaliar e comparar os efeitos da criopreservação com os diluidores *Freezing Medium with Gentamicin Test Yolk Buffer* (TYB)² (para sêmen humano) e BotuBOV^{®3} (para sêmen bovino), sobre a motilidade e a integridade de membrana plasmática.
- Avaliar e comparar os efeitos da adição do glicerol em um ou dois passos sobre a motilidade e a integridade de membrana plasmática.
- Avaliar e comparar os efeitos da vitrificação e da congelação lenta sobre a motilidade e a integridade de membrana plasmática.
- Avaliar os efeitos da adição de ácido docosahexaenoico (DHA) e de Trolox[™] sobre a motilidade, a integridade de membrana plasmática, a integridade de acrossoma, a atividade citoquímica mitocondrial, o índice de fragmentação de DNA e a suscetibilidade ao estresse oxidativo em espermatozoides dessa espécie.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir será descrita a metodologia do Estudo I, incluindo o delineamento experimental, animais utilizados e protocolos para colheita, avaliação e criopreservação do sêmen.

² Product Number 90128; Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA

³ Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil

3.2.1 Delineamento experimental

O Estudo I foi dividido em dois experimentos (Quadro 5), de forma que o Experimento II era dependente dos resultados obtidos no Experimento I, conforme descrito a seguir.

Quadro 5 - Experimentos de criopreservação do sêmen de bugio-preto (*Alouatta caraya*) realizados no Estudo I

Experimento	Diluidor	Crioprotetor	Adição do crioprotetor	Aditivo	Descongelação
1.1	Test-yolk buffer	Glicerol 4%	1 passo	-	37°C/15 s
			2 passos	-	
	BotuBOV	Glicerol 3,5%	1 passo	-	
1.2	Test-yolk buffer	Glicerol 5%	1 passo	-	37°C/15 s
	HTF-HSA	Sacarose 0,5 M	1 passo	-	Em 1 ml de RL a 37°C
2	Test-yolk buffer	Glicerol 4%	2 passos	-	37°C/15 s
				DHA	
				Trolox	
				DHA + Trolox	

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

Legenda: HTF-HSA=*Human Tubal Fluid-Human Serum Albumin*; DHA=Ácido docosahexaenoico

3.2.1.1 Experimento I – Comparação de diluidores e métodos de congelação

O Experimento I foi dividido em dois ensaios. No primeiro ensaio foram comparados os efeitos dos diluidores BotuBOV® e TYB para congelação lenta de sêmen de *Alouatta caraya*. No segundo ensaio, comparou-se a técnica de congelação lenta com a técnica de vitrificação. Para a técnica de congelação lenta foi utilizado o diluidor com melhores resultados no primeiro ensaio. Para a técnica de vitrificação foi utilizado o diluidor *Human Tubal Fluid*⁴ com *Human Serum Albumin*⁵ e sacarose 0,25 M (HTF-HSA, ISACHENKO et al., 2011).

⁴ Modified HTF Medium and Gentamicin – HEPES, Product Number 90126; Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA

3.2.1.2 Experimento II – Avaliação dos efeitos da adição de DHA e de Trolox™ ao sêmen

Após o estabelecimento do diluidor e método de congelação por meio do Experimento I, foram testados os efeitos da adição de um ácido graxo essencial da família ômega 3 – ácido docosahexaenoico (DHA; DHA vs. controle) e de um antioxidante – Trolox™ (Trolox vs. controle) ao sêmen de *Alouatta caraya*, com relação às características seminais após a criopreservação, num arranjo fatorial 2x2.

3.2.2 Animais e obtenção da amostra

Foram utilizados dois *Alouatta caraya*, machos, adultos, mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo – SP e seis *Alouatta caraya*, machos, adultos, mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP), Ananindeua - PA, Brasil (Quadro 6). Os machos acasalados eram separados das fêmeas no dia anterior à colheita, para evitar que copulassem durante este período. As amostras de sêmen foram obtidas por meio de eletroejaculação com sonda retal conforme descrito anteriormente (VALLE et al., 2004; CARVALHO et al., 2014). Para tanto utilizou-se aparelho eletroejaculador⁶ adaptado para a espécie (Figura 8). O eletrodo foi lubrificado com KY® gel⁷ e introduzido no reto do animal (Figura 9A). Os estímulos iniciaram-se com 2,0 volts, com aumentos suscetivos de 0,5 volts a cada série de estímulos, até a obtenção da amostra (Figura 9B) ou até alcançar um máximo de 8,0 volts. Cada série consistiu de 30 estímulos de 2 a 3 segundos de duração, aplicados a intervalos de 1 a 2 segundos. O sêmen foi colhido com auxílio de um tubo de vidro estéril encaixado em frasco com água a 37°C (Figuras 9C e 9D), mantido em banho-maria até o momento

⁵ Product Number 9988; Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA

⁶ DUBOI – Campo Grande, MS

⁷ Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para a Saúde Ltda

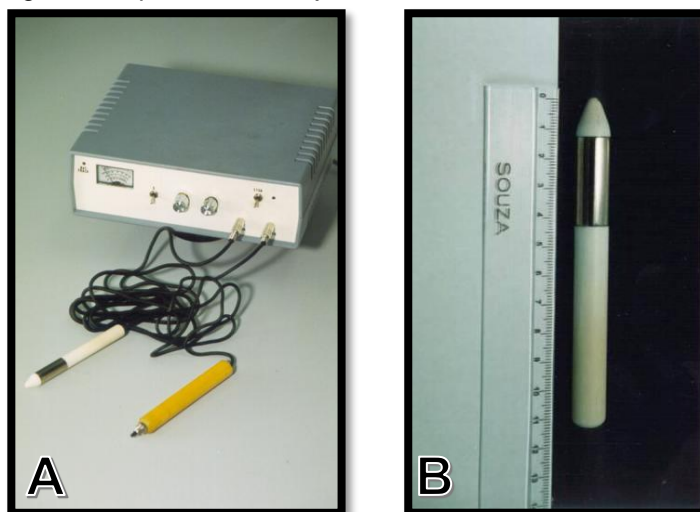
da colheita (VALLE et al., 2004). As colheitas foram realizadas com intervalos de 15 dias e as amostras foram avaliadas imediatamente após a colheita para determinação da qualidade inicial da amostra. Para viabilizar a avaliação dos diferentes protocolos de criopreservação, somente foram incluídas as amostras com motilidade total superior a 30% (aqui denominadas amostras viáveis).

Instituição	Identificação	Idade (anos)	Peso (Kg)	Agrupamento
FPZSP	Edson	7	8,95	Sozinho
FPZSP	Hudson	7	9,90	Sozinho
CENP	BAC	10	11,78	Casal
CENP	BAE	8	6,73	Casal
CENP	BAA	11	11,08	Casal
CENP	BAB	8	10,00	Casal
CENP	BAI	8	9,19	Casal
CENP	BAG	8	10,10	Casal

Fonte: (Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 2014; Centro Nacional de Primatas, 2014)

Legenda: FPZSP=Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CENP=Centro Nacional de Primatas

Figura 8 - Aparelho eletroejaculador DUBOI



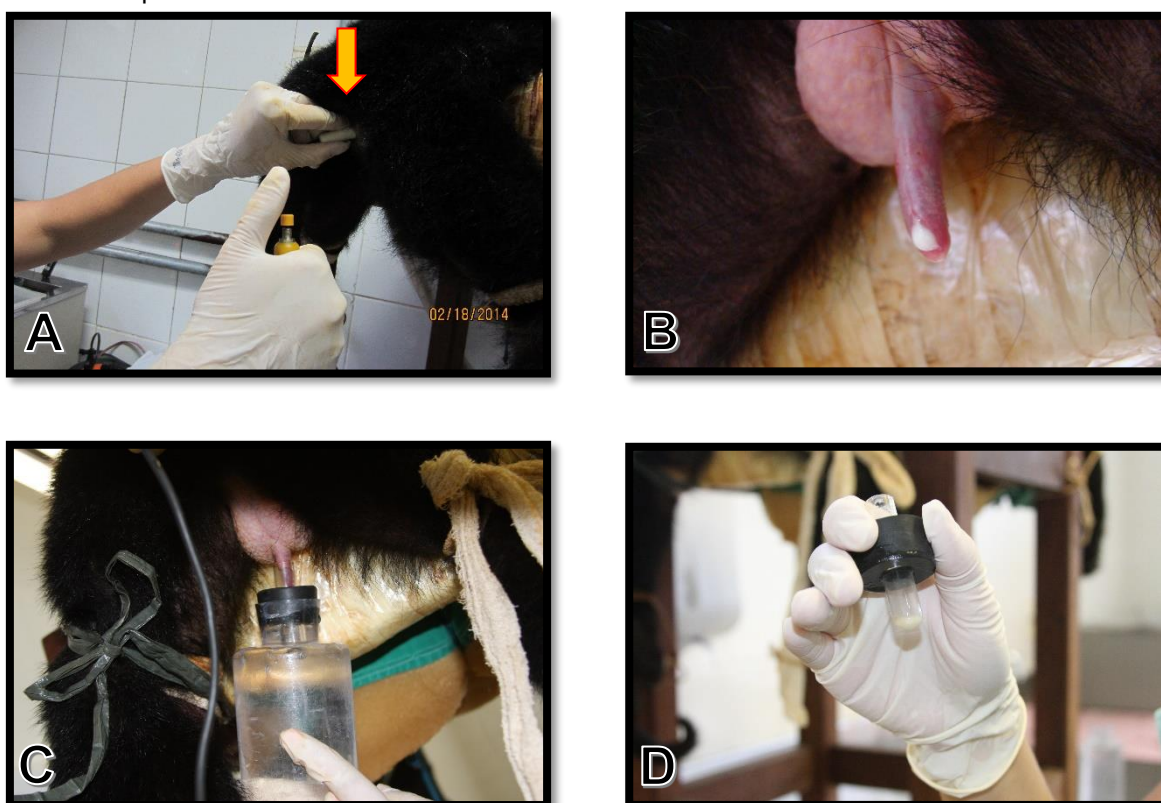
Fonte: (VALLE, R. R., 2002).

Legenda: (A) com probe (B) adaptada para bugio (*Alouatta caraya*).

3.2.3 Processamento e análise do sêmen

As amostras recém-colhidas foram avaliadas imediatamente quanto ao volume, com pipeta automática, e ao pH, com fita reagente para pH⁸. Em seguida, foram diluídas em solução de Ringer com lactato pré-aquecido a 37°C (VALLE et al., 2004; CARVALHO, 2012).

Figura 9 - Colheita de sêmen de bugio-preto (*Alouatta caraya*) por meio de eletroejaculação com probe retal



Fonte: (Centro Nacional de Primatas, 2014).

Legenda: A. Posicionamento da probe retal (seta). B. Início da ejaculação. C. Sistema para manutenção da temperatura do tubo de colheita a 37°C. D. Ejaculado.

No Experimento I, após a diluição inicial as amostras foram avaliadas em relação à motilidade total e motilidade progressiva, concentração espermática (Câmara de Neubauer *improved*), e integridade da membrana plasmática (coloração com eosina-nigrosina). No Experimento II, além desses parâmetros, também foram

⁸ Merck, Darmstadt, Alemanha

avaliados integridade do acrossoma (coloração simples para acrossoma), atividade citotóxica mitocondrial (coloração com DAB), índice de fragmentação de DNA (*Sperm Chromatin Structure Assay*, SCSA), avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo (concentração de TBARS).

3.2.3.1 Experimento I

Para o primeiro ensaio foram utilizadas duas amostras viáveis de sêmen de cada macho (n=8) das duas instituições, totalizando 16 amostras. As amostras foram colhidas no período de janeiro a junho de 2014. Após a colheita, as amostras foram (1) diluídas com solução de Ringer com lactato para um volume final de 500 µl (2) avaliadas quanto aos parâmetros citados anteriormente, (3) diluídas com diluidores comerciais à base de gema de ovo e glicerol, BotuBOV® e TYB e (4) congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido para análise pós-descongelação.

Já para o segundo ensaio foram utilizadas duas amostras viáveis de cada um dos machos do CENP (n=6), totalizando 12 amostras. As amostras foram colhidas no período de outubro a novembro de 2014. Assim como no primeiro ensaio, as amostras foram imediatamente diluídas com solução de Ringer com lactato. Entretanto, neste ensaio as amostras foram diluídas na proporção de 1:1, apenas para aumentar o volume da amostra de forma a permitir a avaliação e divisão da amostra restante para diluição com os diferentes diluidores. Após avaliação inicial, as amostras foram diluídas com TYB e HTF-HSA, congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido para análise pós-descongelação. O procedimento de congelamento será descrito no item “3.2.3.10 Tratamentos”.

3.2.3.2 Experimento II

Foram utilizadas duas amostras de cada um dos machos do CENP (n=6), totalizando 12 amostras. As amostras foram colhidas no período de outubro a dezembro de 2014. Após a colheita, as amostras foram imediatamente diluídas com

solução de Ringer com lactato na proporção de 1:1. Quarenta microlitros da amostra foram diluídos com 80 μ l de solução de Ringer com lactato para realização das análises iniciais. O restante da amostra foi dividido em quatro alíquotas para diluição com os diferentes diluidores a serem testados. O procedimento de congelação será descrito no item “3.2.3.10 Tratamentos”.

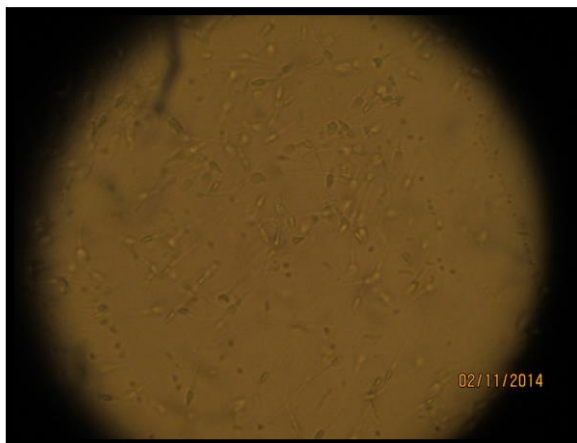
3.2.3.3 Motilidade espermática

Para avaliação da motilidade espermática (Figura 10), 10 μ l do sêmen diluído foram colocados entre lâmina e lamínula e observados ao microscópio de luz com aumento de 400x. Os espermatozoides foram classificados quanto à presença ou não de motilidade e se a motilidade era progressiva ou não. A motilidade total é a porcentagem de espermatozoides com qualquer tipo de movimento de cauda, enquanto a motilidade progressiva é a porcentagem de espermatozoides com movimento ativo, seja linear ou em círculos grandes (WHO, 2010).

3.2.3.4 Concentração

Para avaliação da concentração espermática, 10 μ l do sêmen diluído foram adicionados a 90 μ l de formol salina a 10%, pré-aquecido em banho-maria a 37°C. Para determinação da concentração espermática, os espermatozoides foram contados em câmara de Neubauer.

Figura 10 - Avaliação da motilidade espermática em amostra de sêmen de bugio-preto (*Alouatta caraya*)



Fonte: (CARVALHO, F. M., 2014)
Notas: Aumento de 400X.

3.2.3.5 Integridade de membrana plasmática

Para avaliação da integridade de membrana plasmática (Figura 11) foi utilizado o corante eosina-nigrosina. Para realização da coloração, 5 μ l de solução de eosina-nigrosina foram adicionados a 5 μ l de sêmen em um tubo do tipo Eppendorf. Após 30 segundos foi realizado esfregaço em lâmina de vidro. Foram avaliados 200 espermatozoides em microscópio de luz com aumento de 1000x (objetiva de imersão).

Figura 11 - Avaliação da integridade de membrana plasmática em amostra de sêmen de bugio-preto (*Alouatta caraya*)



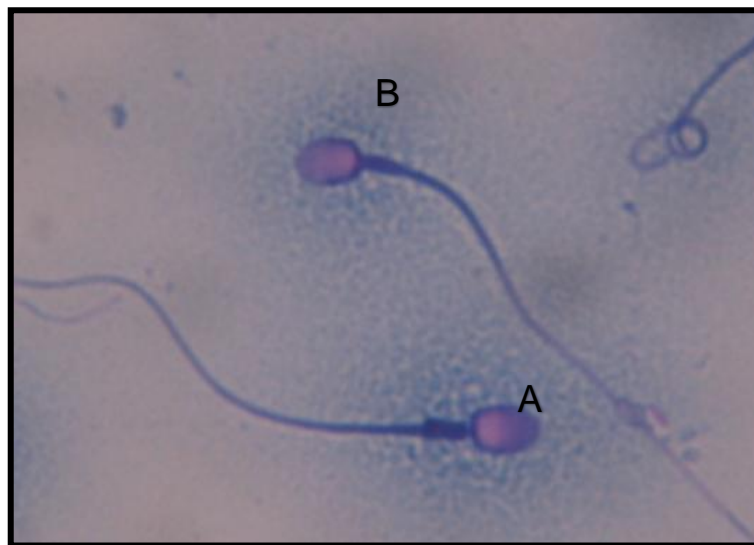
Fonte: (CARVALHO, F. M., 2010)

Legenda: A. Membrana plasmática íntegra (não corada). B. Membrana plasmática lesada (corada). Coloração com eosina-nigrosina. Aumento de 1000X (imersão).

3.2.3.6 Integridade de acrossoma

A integridade de acrossoma (Figura 12) foi avaliada por meio da coloração simples para acrossoma (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991), previamente validada para a espécie (CARVALHO et al., 2014). Foi utilizada uma alíquota de 5 μ L da amostra para 5 μ L de corante simples para acrossoma. A mistura foi incubada por 120 segundos na ausência de luz e, em seguida, foi realizada uma extensão em lâmina de vidro para avaliação em microscopia de luz, com aumento de 1000x (objetiva de imersão). Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina. Para o sêmen criopreservado, foi utilizado tempo de incubação de 140 segundos conforme descrito em trabalho anterior (CARVALHO, 2012).

Figura 12 - Avaliação da integridade de acrossoma em amostra de sêmen de bugio-preto (*Alouatta caraya*)



Fonte: (CARVALHO, F. M., 2010)

Legenda: A. Acrossoma íntegro (corado). B. Acrossoma lesado (não corado). Coloração com corante simples para acrossoma. Aumento de 1000X (imersão).

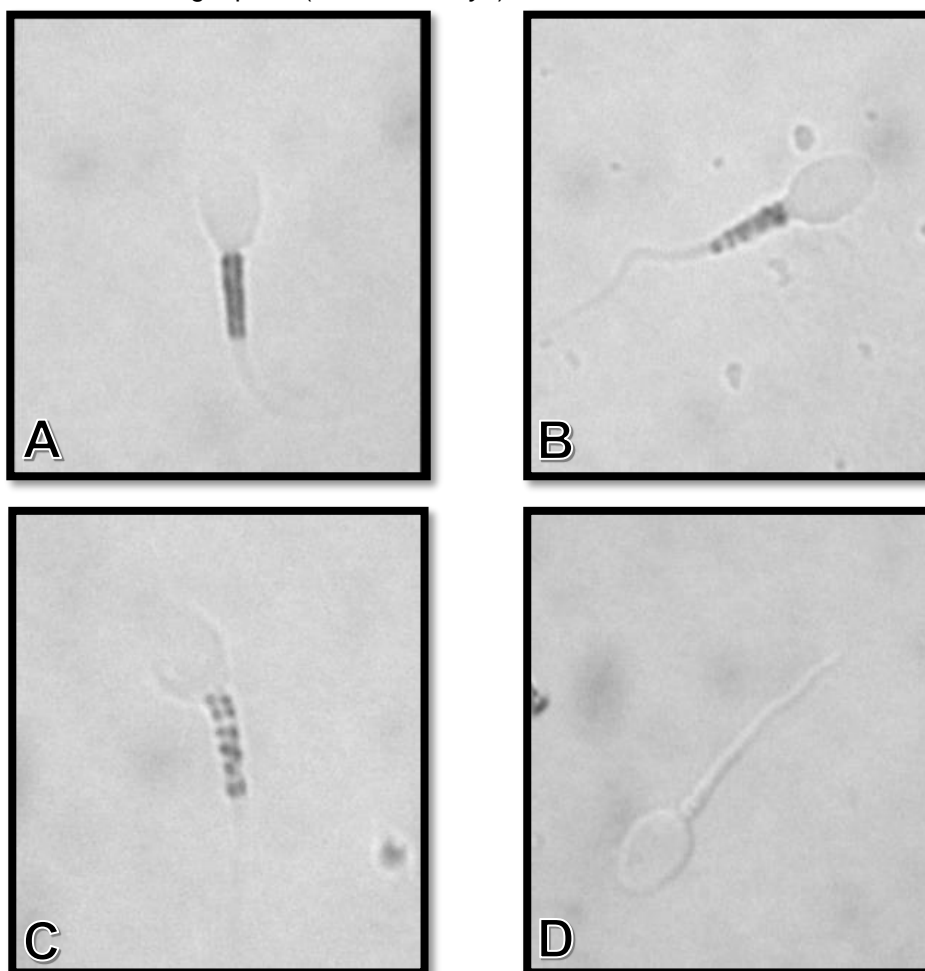
3.2.3.7 Atividade citoquímica mitocondrial

Para avaliação da atividade citoquímica mitocondrial (Figura 13), foi utilizada a enzima 3,3' diaminobenzidina (DAB). Para realização da técnica de coloração, 10 μ l da amostra foram adicionados a 10 μ l de DAB (a 37°C), homogeneizados e incubados em banho-maria a 37°C, durante 90 minutos, na ausência de luz. Em seguida, foi feita uma extensão em lâmina de vidro e secagem na ausência de luz (em caixa de isopor fechada) e em temperatura ambiente. Após a secagem, foi feita fixação em formol a 10% por 10 minutos e secagem na ausência de luz, novamente. Foram contados e classificados 200 espermatozoides em microscópio de contraste de fase, com aumento de 1000x (objetiva de imersão). Os espermatozoides foram classificados em quatro classes, de acordo com a atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozoides, segundo escala proposta por Hrudka (1987), ou seja, classe I – 100% das mitocôndrias ativas; classe II – mais do que 50% das mitocôndrias ativas; classe III – menos do que 50% das mitocôndrias ativas; e classe IV – nenhuma mitocôndria ativa.

3.2.3.8 Avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo (TBARS)

Esta técnica foi baseada no estudo feito por Ohkawa, Ohish e Yagi (1979), em que o malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um pigmento de coloração vermelha que pode ser quantificado por meio de espectrofotometria, com um comprimento de onda de 532 nm. Para este trabalho, foi utilizado o teste induzido descrito por Aitken et al. (1993).

Figura 13 - Avaliação da atividade citoquímica mitocondrial em amostra de sêmen de bugio-preto (*Alouatta caraya*)



Fonte: (CARVALHO, F. M., 2010)

Legenda: A. Classe I – 100% das mitocôndrias ativas. B. Classe II – mais do que 50% das mitocôndrias ativas. C. Classe III – menos do que 50% das mitocôndrias ativas. D. Classe IV – nenhuma mitocôndria ativa. Coloração com 1,3' diaminobenzidina. Aumento de 1000X (imersão).

3.2.3.8.1 *Protocolo de indução para o sêmen fresco*

Uma alíquota de 20 µl do sêmen foi colocada em um tubo do tipo Eppendorf ao qual foram adicionados 180 µl de solução de Ringer com lactato, 50 µl de solução de sulfato de ferro 4mM e 50 µl de solução de ácido ascórbico 20mM. A solução foi, então, incubada em banho-maria a 37°C por 90 minutos com a tampa do tubo aberta, para permitir a entrada de oxigênio.

Após o término dos 90 minutos, foi adicionado ácido tricloro acético a 10% (TCA) gelado (4°C) na proporção de 1:2 (300 µl de solução + 600 µl de TCA). Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 3370 g. O sobrenadante (800 µl) foi colocado em um criotubo e armazenado a -20°C até o momento da análise.

3.2.3.8.2 *Protocolo de indução para o sêmen criopreservado*

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 15 segundos. O conteúdo da palheta (100 µl) foi transferido para um tubo do tipo Eppendorf e foram adicionados 1800 µl de PBS. A solução foi centrifugada duas vezes a 19.700 g por 10 minutos para lavagem do sêmen e remoção do diluidor. O sobrenadante (1800 µl) foi descartado e a amostra ressuspensa com mais 100 µl de PBS, totalizando 200 µl de solução. A partir daqui foi utilizado o mesmo protocolo descrito para indução do sêmen fresco.

3.2.3.8.3 *Protocolo para quantificação de TBARS*

As análises foram realizadas no Laboratório de Andrologia (LA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). As amostras induzidas foram descongeladas em temperatura ambiente e foi adicionado ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA) na proporção de 1:1 (800 µl de amostra + 800 µl de TBA). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 100°C por 15

minutos com o criotubo fechado hermeticamente. Após o término dos 15 minutos, as amostras foram colocadas em caixa de isopor contendo gelo, para interromper a reação. As amostras foram, então, transferidas para cubetas para leitura em espectrofotômetro⁹. Os dados de absorbância foram comparados com uma curva padrão previamente estabelecida e calculou-se o índice de peroxidação lipídica em mg de TBARS/10⁶ espermatozoides.

3.2.3.9 Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) adaptado

O SCSA, técnica inicialmente descrita por Boe-Hansen et al. (2005), foi adaptado pelo Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da FMVZ/USP, o qual utiliza o citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System¹⁰ e o programa FlowJo^{®11}, para análise dos dados. Este teste foi previamente validado para sêmen de *Alouatta caraya* (CARVALHO, 2012).

Para realização desse teste, foi utilizada uma alíquota de sêmen com 250.000 espermatozoides. A alíquota foi transferida para um criotubo, congelada direto em nitrogênio líquido (*snap freezing*) e armazenada em botijão criogênico até o momento da análise. No momento da análise, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C e lavadas duas vezes com 500 µl de PBS. Para isso, após adição do PBS, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. As amostras foram, então, acrescidas de 50 µl de solução tampão TNE e de 100 µl de detergente ácido (Apêndice A) e incubadas por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 300 µl de laranja de acridina (Apêndice A) e após dois minutos feita a leitura por citometria de fluxo, com o citômetro Guava EasyCyte™. Após a leitura das amostras, os dados foram exportados e analisados no programa FlowJo[®], com base nos pontos de corte estabelecidos por meio da validação. O resultado foi apresentado como índice de fragmentação de DNA (IFD) que é a porcentagem de espermatozoides com estrutura de cromatina anormal.

⁹ Ultrospec 3300 pro, Amersham Pharmacia (GE Healthcare UK Limited), Buckinghamshire, England

¹⁰ Guava Technologies, Inc., Hayward, California, USA

¹¹ Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA

3.2.3.10 Tratamentos

A seguir serão descritos os diferentes diluidores e protocolos de criopreservação utilizados nos Experimentos I e II.

3.2.3.10.1 Experimento I – Comparação de diluidores e métodos de congelação

No primeiro ensaio do Experimento I, após as análises iniciais a amostra restante foi dividida em três partes iguais. Cada alíquota foi submetida a um tratamento diferente, conforme descrito abaixo.

- Tratamento 1 – BotuBOV
- Tratamento 2 –TYB em um passo (TYB1)
- Tratamento 3 –TYB em dois passos (TYB2)

Para tanto, a alíquota a ser diluída com BotuBOV[®] foi pré-diluída com solução de Ringer com lactato pré-aquecida a 37°C, de forma a se obter concentração final de espermatozoides de 50×10^6 sptz/ml. Em seguida, foi adicionado BotuBOV[®] (pré-aquecido a 37°C) na proporção de 1:1, de forma a se obter concentração final de espermatozoides de 25×10^6 sptz/ml. Já as alíquotas que foram diluídas com TYB, foram pré-diluídas com solução de Ringer com lactato (pré-aquecido a 37°C) de forma a se obter concentração final de 75×10^6 sptz/ml. Para a parte que foi diluída em um passo, foi adicionado TYB (com glicerol a 12%; pré-aquecido a 37°C), na proporção de 1:2 (sêmen:diluidor) de forma a se obter concentração final de 25×10^6 sptz/ml e 4% de glicerol. Para a parte que foi diluída em dois passos, foi adicionado o *Refrigeration Medium with Gentamicin Test Yolk Buffer*¹² (RM-TYB; pré-aquecido a 37°C), na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor) antes da curva de refrigeração. Após a curva de refrigeração, adicionou-se o TYB (com glicerol a 12%; pré-resfriado a 4°C) em volume igual ao do RM-TYB, de forma que a proporção final ficasse 1:2 (sêmen:diluidor), como foi feito na diluição em fração única. Para tentar evitar o

¹² Product Number 90129, Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA

estresse osmótico, a adição da fração 2 (com glicerol) foi feita em quatro etapas, com intervalo de 1 minuto entre as etapas (GAO et al., 1995).

As amostras foram, então, congeladas com protocolo de congelação manual, baseado no trabalho de Valle (2007), conforme descrito a seguir. Após adição dos diferentes diluidores, as amostras foram transferidas para uma caixa acrílica com 150 ml de água. A caixa acrílica foi mantida em geladeira a 4°C por duas horas. Ao término das duas horas, as amostras foram transferidas para palhetas de 100 µl (palhetas de 250 µl cortadas; CARVALHO, 2012) mantidas a 4°C, vedadas com álcool polivinílico, as quais foram mantidas a 10 cm do vapor de nitrogênio por 10 minutos. As palhetas foram, então, mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico até o momento da análise. Para análise pós-descongelação, as amostras foram descongeladas a 37°C por 15 segundos e avaliadas segundo os mesmos parâmetros avaliados no sêmen fresco.

Já no segundo ensaio, a amostra foi submetida aos seguintes tratamentos:

- Tratamento 4 – Congelação lenta com TYB (TYB3)
- Tratamento 5 – Vitrificação com o diluidor HTF-HSA e descongelação em 2 ml de Ringer com lactato a 37°C (HTF1)
- Tratamento 6 – Vitrificação com o diluidor HTF-HSA e descongelação em placa aquecedora a 37°C (HTF2)

Para tanto, a amostra obtida foi pré-diluída com solução de Ringer com lactato pré-aquecida a 37°C na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor). Vinte microlitros da amostra pré-diluída foram novamente diluídos com solução de Ringer com lactato na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor) e mantidos a 37°C para realização da análise inicial da amostra. O restante da amostra foi dividido em duas alíquotas e mantido em temperatura ambiente. Uma alíquota foi diluída com RM-TYB, enquanto a outra alíquota foi diluída com HTF-HSA, ambos à temperatura ambiente, de forma a se obter concentração final de 50×10^6 spz/ml. Na sequência, as amostras foram diluídas com a fração dois de cada diluidor. Para a congelação lenta, foi adicionado TYB com glicerol a 10% na proporção de 1:1 de forma a se obter concentração final de 5% de glicerol (SI et al., 2004b) e 25×10^6 spz/ml. A amostra foi envasada em palhetas de 100 µl e submetida à fase de refrigeração em caixa acrílica, conforme

descrito para o primeiro ensaio. A fase de vapor foi realizada conforme descrito por Dong, Hill e VandeVoort (2009), ou seja, as palhetas foram mantidas em vapor de nitrogênio por 10 minutos, sobre uma placa de isopor de 1 cm de espessura em uma caixa de isopor com nitrogênio líquido a uma altura de 4 cm. Após 10 minutos no vapor, as amostras foram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas até o momento da análise pós-descongelação.

Para a vitrificação, a amostra foi diluída com HTF-HSA com sacarose a 0,5 M na proporção de 1:1 (amostra:diluidor), de forma a se obter concentração final de sacarose de 0,25 M e 25×10^6 spz/ml. As amostras foram envasadas em palhetas de 100 μ l (palhetas de 250 μ l cortadas para um tamanho de 8 cm), as quais foram inseridas dentro de palhetas de 500 μ l (cortadas para um tamanho de 10 cm). Apenas as palhetas externas (500 μ l) foram vedadas nas duas extremidades, utilizando uma seladora elétrica de forma a se obter um *Straw Packaging System* (SPS; Sistema de Embalagem de Palheta em tradução livre), semelhante ao descrito por Isachenko et al. (2011). Em seguida, o SPS foi mergulhado diretamente em nitrogênio líquido e armazenado até o momento da análise pós-descongelação.

As amostras congeladas por meio de congelação lenta foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 15 segundos. Já as amostras congeladas por meio de vitrificação foram descongeladas de duas formas diferentes. A primeira forma foi semelhante ao descrito por Isachenko et al. (2011), ou seja, a palheta interna foi removida com o auxílio de uma ponteira e mergulhada imediatamente em 2 ml de solução de Ringer com lactato a 37°C. A palheta foi agitada constantemente até que o conteúdo descongelasse e se misturasse ao Ringer com lactato. Na sequência, a amostra foi centrifugada a 300 g por 5 minutos e o sobrenadante (2 ml) foi descartado. A segunda forma de descongelação foi feita na tentativa de evitar a necessidade de centrifugação, visto que os espermatozoides são sensíveis à mesma. Para tanto, a palheta interna foi removida com auxílio de uma ponteira e colocada sobre uma placa aquecedora a 37°C. Realizou-se movimento de rolagem com a palheta de forma a distribuir o calor da forma mais homogênea possível até que a amostra estivesse totalmente descongelada. Em seguida, a amostra foi transferida para um tubo do tipo Eppendorf e mantida em banho-maria a 37°C para realização das análises pós-descongelação.

3.1.3.10.2 Experimento II – Avaliação dos efeitos da adição de DHA e de Trolox™ ao sêmen

Para este experimento foram utilizadas 12 amostras viáveis. Após as análises descritas no item “**3.1.3. Processamento e análise do sêmen**”, as amostras foram divididas em quatro partes iguais. Cada alíquota foi submetida a um tratamento diferente, conforme descrito abaixo.

- Tratamento 1 – Controle
- Tratamento 2 – DHA
- Tratamento 3 – Trolox
- Tratamento 4 – DHA + Trolox (DHAT)

O Tratamento 1 (Controle) consistiu no melhor tratamento obtido no Experimento I – TYB em dois passos, com algumas alterações. Os demais tratamentos consistiram no Tratamento Controle com adição de DHA¹³ (10 ng/ml; ANSARI et al., 2012; NASIRI; TOWHIDI; ZEINOALDINI, 2012) ou Trolox™¹⁴ (40 µM; MINAEI et al., 2012), isolados ou combinados. As alterações foram baseadas nos resultados do Experimento I e serão descritas a seguir. Os motivos que levaram a essas alterações serão abordados nos resultados.

- Volume de Ringer com lactato – Ao invés de adicionar quantidade suficiente para volume final de 0,5 ml, o Ringer com lactato foi adicionado na proporção de 1:1, conforme descrito no item “**3.1.3. Processamento e análise do sêmen**”.
- Volume de diluidor – A fração 1 foi adicionada para uma concentração final de 50×10^6 spz/ml e a fração 2 foi adicionada na proporção de 1:1.
- Temperatura – Ao invés de manter a amostra a 37°C, a amostra foi mantida à temperatura ambiente, assim como a fração 1 do diluidor.

¹³ Cis-4,7,10,13,16,19-docosaenoic acid. Referência do produto D2534, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil

¹⁴ Ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico. Referência do produto 238813, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil

3.2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa SAS System for Windows¹⁵, por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias LSD (*least significant difference*). O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que houve diferenças significativas entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente serão apresentados dados relativos à análise descritiva do sêmen fresco. Na sequência serão apresentados e discutidos os dados de cada experimento, separadamente.

3.3.1 Análise descritiva do sêmen fresco de bugio-preto (*Alouatta caraya*)

Os dados referentes à análise descritiva do sêmen fresco encontram-se na Tabela 1. Como esperado, houve grande variação tanto inter como intraindivíduo. Os valores de volume variaram de 28 a 490 µl, com média de $146,31 \pm 19,75$ µl, valores superiores aos obtidos em trabalhos anteriores que variaram de 10 a 210 µl (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO et al., 2014). Os valores de pH variaram de 7,3 a 8,7, com média de $7,98 \pm 0,07$, a qual difere das médias de $8,9 \pm 0,1$ (MORELAND et al., 2001) e $7,45 \pm 0,06$ (CARVALHO et al., 2014), porém se aproxima da média de $8,1 \pm 0,5$ (VALLE et al., 2004). Conforme discutido em trabalho anterior (CARVALHO et al., 2014), as diferenças de pH podem ser devidas a diferenças no tamanho e posicionamento dos eletrodos, o que levaria a diferenças na composição do plasma seminal, assim como diferenças nutricionais ou

¹⁵ SAS Institute Inc. – Cary, North Carolina, USA, 2000

ambientais que poderiam alterar o balanço ácido-básico, com consequentes alterações do pH seminal.

A concentração espermática variou de 32,80 a 2436,00 x 10⁶ sptz/ml, com média de 646,68 ± 101,30 x 10⁶ sptz/ml, valores dentro dos relatados anteriormente que variaram de 7,00 x 10⁶ a 5400 x 10⁶ sptz/ml (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004; CARVALHO et al., 2014).

A motilidade total variou de 1 a 90%, com média de 71,11 ± 4,20%. A grande maioria (88%) das amostras tiveram motilidade total ≥ 50%. Apesar da grande variação, a média foi semelhante às médias de 73,00 ± 2,30% (MORELAND et al., 2001) e 75,70 ± 18,10% (VALLE et al., 2004), e superior à média de 60 ± 5,57% (CARVALHO et al., 2014). A motilidade progressiva variou de 0 a 80%, com média de 58,57 ± 4,50%, superior à média de 47,15 ± 5,47% obtida em estudo anterior (CARVALHO et al., 2014). Nos demais estudos a motilidade progressiva foi avaliada de acordo com recomendações mais antigas do manual WHO (1999), que classificava a motilidade progressiva em uma escala de 0 a 5, o que impossibilita a comparação dos resultados.

A integridade de membrana plasmática variou de 24 a 94%, com média de 62,62 ± 3,65%, valores superiores à média de 47,38 ± 3,21% (CARVALHO et al., 2014), porém mais próximos de 68,3 ± 15,00% (VALLE et al., 2004).

Tabela 1 - Resultados (média ± erro padrão) da análise descritiva do sêmen fresco (n=33 amostras) de bugio-preto (*Alouatta caraya*; n=8), colhido por eletroejaculação com probe retal, com intervalo de 15 dias entre as colheitas

Variável	Indivíduo								Média geral
	BAA	BAB	BAC	BAE	BAG	BAI	Edson	Hudson	
Volume (µl)	181,40 ± 62,76	109,40 ± 9,92	230,60 ± 33,34	202,33 ± 145,20	155,20 ± 44,35	65,60 ± 8,16	75,50 ± 15,50	106,50 ± 78,50	146,31 ± 19,75
pH	7,84 ±0,23	8,02 ± 0,52	8,02 ± 0,11	8,10 ± 0,30	7,98 ± 0,12	8,18 ± 0,16	7,45 ± 0,15	-*	7,98 ± 0,07
Concentração (x10⁶ sptz/ml)	249,29 ± 66,54	1205,10 ± 162,12	620,05 ± 244,38	1047,17 ± 704,90	369,47 ± 55,32	457,93 ± 186,31	676,44 ± 188,94	766,07	646,68 ± 101,30
Número de sptz (x10⁶)	35,59 ± 8,83	135,59 ± 25,81	149,51 ± 75,30	103,37 ± 63,72	60,62 ± 6,66	30,90 ± 14,14	54,00 ± 24,75	21,45	81,34 ± 16,18
Motilidade total (%)	52,20 ± 14,79	74,00 ± 8,72	85,00 ± 5,00	56,57 ± 17,64	70,00 ± 7,07	86,00 ± 2,45	70,00 ± 10,00	-*	71,11 ± 4,20
Motilidade progressiva (%)	38,00 ± 12,81	62,00 ± 10,68	75,00 ± 5,00	43,33 ± 20,28	55,00 ± 8,66	76,00 ± 2,45	55,00 ± 15,00	-*	58,57 ± 4,50
Integridade de membrana plasmática (%)	51,20 ± 5,21	65,40 ± 4,07	76,00 ± 4,42	31,67 ± 5,78	56,25 ± 8,98	82,60 ± 2,40	82,00 ± 12,00	32,00	62,62 ± 3,65

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

*dado perdido

Legenda: sptz=espermatozoides

3.3.2 Experimento I – Comparação de diluidores e métodos de congelação

O Experimento I foi realizado em dois ensaios, conforme descrito no item “3.1 MATERIAL E MÉTODOS”. No primeiro ensaio foram realizadas 23 colheitas de sêmen, das quais 17 (74%) foram consideradas viáveis para congelação. Das amostras consideradas inviáveis, cinco foram contaminadas com urina e uma apresentou volume insuficiente para realização de todas as avaliações e tratamentos propostos neste experimento. No segundo ensaio foram realizadas 11 colheitas de sêmen, das quais 10 (91%) foram consideradas viáveis para congelação. A amostra não viável consistiu apenas de líquido prostático e não continha espermatozoides.

A Tabela 2 apresenta os resultados da comparação entre sêmen fresco e criopreservado com diferentes protocolos, em relação à motilidade total e progressiva, assim como integridade de membrana plasmática. O sêmen criopreservado teve a qualidade espermática significativamente inferior ($p < 0,05$) para todas as variáveis avaliadas, independente do protocolo utilizado. Ou seja, nenhum protocolo de criopreservação foi capaz de proteger os espermatozoides de forma adequada. A Tabela 3 apresenta os resultados da comparação do desempenho pós-descongelação dos diferentes protocolos utilizados.

Com relação à motilidade total, o protocolo HTF2 foi significativamente melhor ($p < 0,05$) que todos os outros. O protocolo TYB3 foi significativamente inferior ($p < 0,05$) a todos os outros com exceção do BotuBOV. Os demais protocolos não diferiram entre si.

Já com relação à motilidade progressiva, os resultados foram diferentes. HTF 1 apresentou o pior desempenho ($p < 0,05$), não diferindo apenas de BotuBOV. Os demais protocolos não diferiram entre si.

Com relação à integridade de membrana plasmática, TYB3 apresentou o melhor desempenho ($p < 0,05$), não diferindo significativamente apenas de TYB2. BotuBOV teve o pior desempenho ($p < 0,05$), não diferindo significativamente de TYB1, HTF1 e HTF2.

Tabela 2 - Resultados (média ± erro padrão da média) da análise do sêmen de bugio-preto (*Alouatta caraya*) fresco versus criopreservado com diferentes diluidores

Variável	Fresco	Criopreservado/Diluidor*						ANOVA
		BotuBOV	TYB1	TYB2	TYB3	HTF1	HTF2	
Motilidade Total (%)	74,17 ± 3,24 ^A	3,29 ± 1,04 ^C	4,56 ± 1,18 ^{BC}	4,64 ± 0,98 ^{BC}	0,56 ± 0,24 ^C	4,78 ± 1,16 ^{BC}	11,44 ± 2,95 ^B	<0,0001
Motilidade Progressiva (%)	61,25 ± 3,92 ^A	2,00 ± 0,72 ^B	3,31 ± 0,84 ^B	3,06 ± 0,77 ^B	0,22 ± 0,15 ^B	0 ^B	2,67 ± 1,13 ^B	<0,0001
Integridade de membrana Plasmática (%)	66,00 ± 3,27 ^A	29,18 ± 3,20 ^D	37,13 ± 2,67 ^{CD}	40,94 ± 3,30 ^{BC}	49,11 ± 5,47 ^B	29,67 ± 4,45 ^{CD}	30,11 ± 5,65 ^{CD}	<0,0001

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)]

*Médias na mesma linha, seguidas de letras diferentes, são significativamente diferentes (p<0,05) pelo teste LSD

Legenda: BotuBOV=diluidor comercial para sêmen bovino; TYB1=Test-yolk buffer (TYB) com glicerol a 4% adicionado em um passo; TYB2= TYB adicionado em dois passos; TYB3=TYB com glicerol a 5% adicionado em um passo; HTF1=*Human Tubal Fluid-Human Serum Albumin* (HTF-HSA) e descongelação em 2ml de Ringer com lactato a 37°C; HTF2=HTF-HSA e descongelação em mesa aquecedora a 37°C.

Tabela 3 - Resultados (média ± erro padrão da média) da análise pós-descongelação do sêmen de bugio-preto (*Alouatta caraya*), criopreservado com diferentes diluidores

Variável	Diluidor*						ANOVA
	BotuBOV	TYB1	TYB2	TYB3	HTF1	HTF2	
Motilidade Total (%)	3,29 ± 1,04 ^{BC}	4,56 ± 1,18 ^B	4,64 ± 0,98 ^B	0,56 ± 0,24 ^C	4,78 ± 1,16 ^B	11,44 ± 2,95 ^A	0,0004
Motilidade Progressiva (%)	2,00 ± 0,72 ^{AB}	3,31 ± 0,84 ^A	3,06 ± 0,77 ^A	0,22 ± 0,15 ^B	0 ^B	2,67 ± 1,13 ^A	0,0216
Integridade de membrana plasmática (%)	29,18 ± 3,20 ^C	37,13 ± 2,67 ^{BC}	40,94 ± 3,30 ^{AB}	49,11 ± 5,47 ^A	29,67 ± 4,45 ^{BC}	30,11 ± 5,65 ^{BC}	0,0052

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

*Médias na mesma linha, seguidas de letras diferentes, são significativamente diferentes (p<0,05) pelo teste LSD

Legenda: BotuBOV=diluidor comercial para sêmen bovino; TYB1=Test-yolk buffer (TYB) com glicerol a 4% adicionado em um passo; TYB2= TYB adicionado em dois passos; TYB3=TYB com glicerol a 5% adicionado em um passo; HTF1=*Human Tubal Fluid-Human Serum Albumin* (HTF-HSA) e descongelação em 2ml de Ringer com lactato a 37°C; HTF2=HTF-HSA e descongelação em mesa aquecedora a 37°C.

Os protocolos de congelação lenta foram realizados com um diluidor para sêmen bovino (BotuBOV) e um diluidor para sêmen humano (TYB), ambos à base de gema de ovo e com glicerol como crioprotetor. No geral, o diluidor para sêmen humano teve desempenho superior ao diluidor para sêmen bovino. A adição do glicerol em um (TYB1) ou dois passos (TYB2), não influenciou significativamente a qualidade pós-descongelação. O protocolo TYB3 teve impacto negativo na motilidade, porém foi melhor em relação à integridade de membrana plasmática. É possível que a utilização de uma curva de congelação mais rápida, com as palhetas a 1 cm do nitrogênio líquido, ao invés de 5 cm, tenha tido um impacto negativo na motilidade, assim como a concentração maior de glicerol (5%).

A melhor proteção da membrana plasmática pode ser atribuída, em parte, à maior quantidade de meio de criopreservação (à base de gema de ovo) em relação aos demais protocolos (como apontado no item 3.1.3.11.2. *Experimento II* do MATERIAL E MÉTODOS), visto que a gema de ovo atua como protetor de membrana contra o choque térmico (DONG; VANDEVOORT, 2009). Isso foi possível com a diminuição do volume de Ringer com lactato utilizado para a diluição inicial, o que gerou a necessidade de um volume maior de meio de criopreservação para atingir a concentração final de espermatozoides desejada. Além disso, a amostra foi mantida à temperatura ambiente durante o tempo de processamento do sêmen com o objetivo de diminuir o metabolismo espermático e, conseqüentemente, o gasto de energia e a geração de ROS. Como apontado na revisão de literatura, a membrana celular é um dos principais alvos do estresse oxidativo (LUZ et al., 2011), de forma que ao diminuir a produção de ROS, diminui-se, também, a lesão de membrana plasmática causada por essas substâncias.

Com relação aos protocolos de vitrificação, o protocolo HTF2 foi significativamente melhor que o HTF1 em relação à motilidade total e progressiva. É possível inferir que a ausência da centrifugação após a descongelação foi benéfica para os espermatozoides. Entretanto, ambos os protocolos de vitrificação não tiveram bom desempenho com relação à integridade de membrana plasmática. Com base nos fundamentos de criobiologia (WOODS et al., 2011), é possível que o volume de amostra utilizado para vitrificação (100 µl) tenha sido muito grande, ou o *Straw Packaging System* (SPS) tenha dificultado a transferência de calor, o que tornaria a congelação mais lenta, permitindo a formação de cristais de gelo que

causariam lesão nos espermatozoides. Se isso for verdade, a utilização de um volume menor ou a congelação de gotas direto no nitrogênio líquido, conforme descrito pelos mesmos autores (ISACHENKO et al., 2011), poderia trazer melhores resultados.

Com base nos resultados discutidos anteriormente, optou-se por utilizar o protocolo TYB2 modificado, visto que o mesmo apresentou motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática entre as melhores dentro dos protocolos testados. As modificações implementadas foram apresentadas no item 3.1.3.11.2. *Experimento II* do MATERIAL E MÉTODOS.

3.3.3 Experimento II – Avaliação dos efeitos da adição de DHA e de Trolox™ ao sêmen

Para o Experimento II foram realizadas 12 colheitas no total, sendo todas viáveis para congelação. A Tabela 4 apresenta os resultados da comparação entre sêmen fresco e criopreservado com diferentes diluidores. Quando comparado ao sêmen fresco, o sêmen criopreservado apresentou perda significativa da motilidade total e progressiva e aumento significativo da suscetibilidade ao estresse oxidativo ($p < 0,05$), independente do diluidor utilizado. A presença de DHA (diluidores DHA e DHAT) causou maior instabilidade da membrana plasmática ($p < 0,05$), enquanto os diluidores Controle ou Trolox foram capazes de manter a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra em relação ao sêmen fresco. A combinação de DHA e Trolox (diluidor DHAT) causou diminuição significativa na porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro ($p < 0,05$) em relação ao diluidor Controle, enquanto DHA ou Trolox isolados não diferiram do Controle ou do sêmen fresco. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na atividade citoquímica mitocondrial ou no IFD do sêmen criopreservado em relação ao sêmen fresco, independente do diluidor utilizado.

Tabela 4 - Resultados (média ± erro padrão da média) obtidos para sêmen de *Alouatta caraya* fresco ou criopreservado com diferentes diluidores

Variável	Fresco	Diluidor*				ANOVA
		Controle	Trolox	DHA	DHAT	
Motilidade Total (%)	72,50 ± 5,09 ^A	13,67 ± 3,31 ^B	14,92 ± 4,33 ^B	15,67 ± 3,82 ^B	17,75 ± 3,35 ^B	<0,0001
Motilidade Progressiva (%)	62,50 ± 5,09 ^A	10,75 ± 2,72 ^B	11,67 ± 3,49 ^B	11,67 ± 2,84 ^B	12,83 ± 2,69 ^B	<0,0001
MPI (%)	60,83 ± 4,72 ^A	51,25 ± 2,80 ^{AB}	50,83 ± 3,28 ^{AB}	50,25 ± 2,68 ^B	49,50 ± 3,77 ^B	0,1501
AI (%)	65,08 ± 3,00 ^{AB}	70,67 ± 3,52 ^A	65,75 ± 4,61 ^{AB}	69,16 ± 4,96 ^{AB}	57,92 ± 4,33 ^B	0,2397
ACM Classe I (%)	23,42 ± 2,56	25,33 ± 4,43	24,27 ± 3,61	21,92 ± 3,91	25,25 ± 4,50	0,9680
ACM Classe II (%)	56,92 ± 2,99	52,67 ± 4,26	54,63 ± 3,38	55,58 ± 3,65	55,42 ± 4,07	0,9479
ACM Classe III (%)	14,00 ± 2,24	14,16 ± 2,40	12,36 ± 1,23	13,83 ± 2,01	12,67 ± 2,27	0,9609
ACM Classe IV (%)	5,67 ± 1,27	7,83 ± 2,41	8,73 ± 2,58	8,67 ± 1,84	6,75 ± 2,20	0,8136
TBARS/ 10⁶ sptz	83,27 ± 23,13 ^B	270,80 ± 8,94 ^A	260,53 ± 11,20 ^A	297,74 ± 15,01 ^A	313,46 ± 44,54 ^A	<0,0001
IFD (%)	4,02 ± 1,47	5,81 ± 1,43	6,02 ± 1,26	6,65 ± 1,62	5,98 ± 1,36	0,7690

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

*Médias na mesma linha, seguidas de letras diferentes diferem entre si de acordo com o teste LSD (p<0,05)

Legenda: DHA= ácido docosahexaenoico; DHAT= ácido docosahexaenoico + Trolox; MPI= membrana plasmática íntegra; AI= acrossoma íntegro; ACM= atividade citotóxica mitocondrial; TBARS= Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; IF= índice de fragmentação de DNA

A Tabela 5 apresenta os resultados da comparação do desempenho pós-descongelamento dos diferentes diluidores. Com exceção da integridade de acrossoma, não houve diferença no desempenho pós-descongelamento dos diferentes diluidores, quando comparados entre si. O diluidor Controle apresentou integridade de acrossoma significativamente maior do que o diluidor DHAT. Os diluidores Trolox e DHA tiveram desempenho semelhante, tanto ao Controle, como ao DHAT.

As concentrações efetivas de DHA utilizadas em outros trabalhos variaram muito. Um estudo obteve melhores resultados com 1 ng/ml para sêmen ovino (TOWHIDI et al., 2013), enquanto outros dois estudos obtiveram resultados melhores com 10 ng/ml para sêmen bovino (NASIRI; TOWHIDI; ZEINOALDINI, 2012) e caprino (ANSARI et al., 2012). Um quarto estudo utilizou 0,35 mg/ml de diluidor para sêmen suíno (CHANAPIWAT; KAEOKET; TUMMARUK, 2012), uma concentração muitas vezes maior que a dos demais trabalhos citados. Optou-se por utilizar a concentração intermediária de 10 ng/ml, visto que foi utilizada com sucesso em dois trabalhos diferentes. Entretanto, a concentração de DHA utilizada no presente trabalho teve efeito negativo na integridade de membrana plasmática. É possível que a utilização de uma concentração menor, por exemplo, 1 ng/ml tivesse melhores resultados.

Por outro lado, como sugerido por Nichi (2009), independente da concentração utilizada, a incorporação do DHA à membrana espermática poderia tornar o espermatozoide ainda mais suscetível ao ataque das ROS, o que deveria ser combatido por um antioxidante, no caso o Trolox™. No entanto, os resultados indicam que a concentração de Trolox™ utilizada, tanto isolada, como em combinação com DHA, não trouxe melhora significativa na resistência ao estresse oxidativo. Mais uma vez, as concentrações de Trolox™ utilizadas em outros trabalhos variaram muito, desde 40 µM (MINAEI et al., 2012) para sêmen humano até 120 µM/ml para sêmen equino (SILVA et al., 2009). Optou-se por usar a dose de 40 µM por ter sido bem-sucedida para sêmen humano, espécie mais próxima do bugio, em comparação com as espécies domésticas. É possível que doses maiores possam trazer melhoras significativas ou, ainda, que sejam necessários outros antioxidantes que não a vitamina E.

Tabela 5 - Resultados (média ± erro padrão da média) obtidos para sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diferentes diluidores

Variável	Diluidor*				ANOVA
	Controle	Trolox	DHA	DHAT	
Motilidade Total (%)	13.67 ± 3.31	14.92 ± 4.33	15.67 ± 3.82	17.75 ± 3.35	0.8880
Motilidade Progressiva (%)	10.75 ± 2.72	11.67 ± 3.49	11.67 ± 2.84	12.83 ± 2.69	0.9687
MPI (%)	51.25 ± 2.80	50.83 ± 3.28	50.25 ± 2.68	49.50 ± 3.77	0.9816
AI (%)	70.67 ± 3.52 ^A	65.75 ± 4.61 ^{AB}	69.16 ± 4.96 ^{AB}	57.92 ± 4.33 ^B	0.1844
ACM Classe I (%)	25.33 ± 4.43	24.27 ± 3.61	21.92 ± 3.91	25.25 ± 4.50	0.9291
ACM Classe II (%)	52.67 ± 4.26	54.63 ± 3.38	55.58 ± 3.65	55.42 ± 4.07	0.9469
ACM Classe III (%)	14.16 ± 2.40	12.36 ± 1.23	13.83 ± 2.01	12.67 ± 2.27	0.9098
ACM Classe IV (%)	7.83 ± 2.41	8.73 ± 2.58	8.67 ± 1.84	6.75 ± 2.20	0.9179
TBARS/10⁶ sptz	270.80 ± 8.94	260.53 ± 11.20	297.74 ± 15.01	313.46 ± 44.54	0.3734
IFD (%)	5.81 ± 1.43	6.02 ± 1.26	6.65 ± 1.62	5.98 ± 1.36	0.9769

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

*Médias na mesma linha, seguidas de letras diferentes diferem entre si de acordo com o teste LSD (p<0,05)

Legenda: DHA= ácido docosahexaenoico; DHAT= ácido docosahexaenoico + Trolox; MPI= membrana plasmática íntegra; AI= acrossoma íntegro; ACM= atividade citoquímica mitocondrial; TBARS= Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; IF= índice de fragmentação de DNA

Quando comparado com os diluidores à base de gema de ovo do trabalho anterior com sêmen de bugio (CARVALHO, 2012), o presente trabalho trouxe resultados semelhantes com relação à motilidade total (13,67-17,75 vs 17,68-19,08), motilidade progressiva (10,75-12,83 vs 9,23-9,76), integridade de acrossoma (57,92-70,67 vs 63,19-63,71) e TBARS (260,53-313,46 vs 272,66-342,50). Entretanto, houve melhora com relação à integridade de membrana plasmática (49,50-51,25 vs 24,32-26,76) e ao índice de fragmentação de DNA (5,81-6,65 vs 19,12-21,89). Provavelmente, essas melhoras são decorrentes da mudança na quantidade de diluidor à base de gema de ovo, como já discutido anteriormente.

Conforme observado em estudo anterior, houve queda brusca da motilidade total e progressiva e aumento significativo da suscetibilidade ao estresse oxidativo, com relação ao sêmen fresco. Entretanto, os diluidores Controle e Trolox foram capazes de manter a integridade de membrana plasmática e de acrossoma, a atividade citoquímica mitocondrial e o índice de fragmentação de DNA. Portanto, em estudos futuros recomenda-se (1) utilização de diluidor à base de gema de ovo com glicerol a 4%; (2) Utilização de congelação lenta; (3) Avaliação de outros antioxidantes para tentar combater o estresse oxidativo.

3.4 CONCLUSÕES

- O diluidor à base de gema de ovo para sêmen humano (TYB) foi melhor que o diluidor à base de gema de ovo para sêmen bovino (BotuBOV), com relação à motilidade total e progressiva e com relação à integridade de membrana plasmática.
- A congelação lenta com o diluidor TYB foi melhor que a vitrificação com relação à motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática.
- Não houve diferença significativa na adição do glicerol em um ou dois passos.
- A adição de Trolox ou DHA ao diluidor de criopreservação nas doses utilizadas não trouxe nenhuma melhora significativa em relação ao diluidor controle em nenhum dos parâmetros avaliados.

- A combinação de DHA e Trolox adicionados ao diluidor de criopreservação foi deletéria para o acrossoma.
- Apesar de haver melhoras em relação aos protocolos anteriores (CARVALHO, 2012), os protocolos de criopreservação testados no presente estudo não atingiram desempenho satisfatório.

4 ESTUDO II – CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE MACACO-RHESUS (*MACACA MULATTA*) E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PÓS-DESCONGELAÇÃO POR MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Existe uma crescente necessidade de primatas não-humanos para uso em pesquisas biomédicas, que não pode ser sanada pela importação de animais de vida-livre ou por cruzamentos seletivos (WOLF et al., 2004). Conseqüentemente, são necessários métodos eficientes para garantir o suprimento tanto de espécies como de indivíduos raros e valiosos. O macaco-rhesus é um dos primatas não-humanos mais utilizados em pesquisa (WHITNEY, 1995). Apesar dos grandes avanços na aplicação de ARTs nessa espécie (BAVISTER et al., 1984; SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 2000; SI et al., 2000; NUSSER et al., 2001), ainda existem grandes lacunas a serem preenchidas. Uma grande limitação ainda é a utilização de espermatozoides criopreservados tanto para FIV (WOLF et al., 2004), como para inseminação artificial (DONG; CORREA; VANDEVOORT, 2009). Portanto, faz-se necessária a continuação dos estudos na área de criopreservação de sêmen dessa espécie.

A seguir serão descritos (1) os objetivos, (2) o delineamento experimental, (3) os animais que serão utilizados e a forma de obtenção das amostras, e (4) como serão processadas e analisadas as amostras do Estudo II.

4.1 OBJETIVOS

- A) Objetivo geral: otimizar a criopreservação e o preparo pós-descongelção de sêmen de *Macaca mulatta*.
- B) Objetivos específicos:
- Avaliar e comparar os efeitos das técnicas de congelação lenta e vitrificação na motilidade espermática, integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma.

- Avaliar diferentes técnicas de preparo dos espermatozoides, incluindo lavagem simples, separação por gradiente de densidade, filtração em lã de vidro e *direct swim-up*.
- Avaliar e comparar as taxas de FIV obtidas com as melhores técnicas de preparo dos espermatozoides.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir será descrita a metodologia do Estudo II, incluindo o delineamento experimental, os animais utilizados e as técnicas de colheita, análise e criopreservação de sêmen; colheita e avaliação dos oócitos; e fecundação *in vitro*.

4.2.1 Delineamento experimental

O estudo foi dividido em três experimentos, de forma que um dependesse do resultado do outro, conforme descrito a seguir.

4.2.1.1 Experimento I – Comparação de métodos de criopreservação

Nesse experimento comparou-se a técnica de congelação lenta com a técnica de vitrificação. Para a técnica de congelação lenta foi utilizado um diluidor à base de gema de ovo com glicerol a 3% (DONG et al., 2008b). Já para a técnica de vitrificação foi utilizado o diluidor *Human Tubal Fluid*¹⁶ com *Human Serum Albumin*¹⁷ e sacarose a 0,25 M (HTF-HSA, ISACHENKO et al., 2011).

¹⁶ Modified HTF Medium and Gentamicin – HEPES, Product Number 90126; Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA

¹⁷ Product Number 9988; Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA

4.2.1.2 Experimento II – Comparação de métodos de preparo pós-descongelamento dos espermatozoides

Nesse experimento, o melhor método obtido no Experimento I foi submetido a diferentes protocolos de preparo do sêmen, incluindo (1) lavagem simples, (2) *direct swim-up*, (3) filtração em lã de vidro e (4) separação por gradiente de densidade.

4.2.1.3 Experimento III – Fecundação *in vitro* (FIV)

Para este experimento, os dois melhores métodos obtidos no Experimento II foram utilizados para realização de FIV.

4.2.2 Animais

Foram utilizados quatro machos adultos (Quadro 6) e seis fêmeas adultas de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*), mantidos em cativeiro no Oregon National Primate Research Center (ONPRC), Beaverton, Oregon – EUA. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee do ONPRC (Protocolo #0095).

Quadro 7 - Características dos machos de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) utilizados no Estudo II

Instituição	Identificação	Idade (anos)	Peso (Kg)	Agrupamento
ONPRC	28178	5,5	7,6	Sozinho
ONPRC	28281	5,5	10,6	Sozinho
ONPRC	26028	8,5	9,6	Sozinho
ONPRC	24583	11	9,2	Sozinho

Fonte: Oregon National Primate Research Center (ONPRC), 2015

Legenda: ONPRC=Oregon National Primate Research Center

Quadro 8 - Características das fêmeas de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) utilizadas no Estudo II

Instituição	Identificação	Idade (anos)	Peso (Kg)	Agrupamento
ONPRC	29251	5	6,0	1 Fêmea
ONPRC	27275	7	5,8	1 Fêmea
ONPRC	24769	7	9,2	1 Fêmea
ONPRC	30346	4	6,04	1 Fêmea
ONPRC	30647	4	6,2	1 Fêmea
ONPRC	28278	6	7,0	1 Fêmea

Fonte: (Oregon National Primate Research Center, 2015)

Legenda: ONPRC=Oregon National Primate Research Center

4.2.3 Experimento I – Comparação de métodos de criopreservação

O Experimento I consistiu na comparação de dois métodos de congelação: congelação lenta e vitrificação. A seguir serão descritos o método de colheita e avaliação do sêmen, e os métodos de congelação do sêmen.

4.2.3.1 Colheita e avaliação do sêmen

As amostras de sêmen foram obtidas por meio de eletroejaculação peniana baseada no protocolo descrito por Sarason et al. (1991). Para tanto, o animal, previamente treinado para o procedimento, foi inicialmente transferido para uma cadeira de contenção.

A transferência da gaiola para a cadeira foi feita pelo método “bastão e colar” (tradução livre do inglês *pole-and-collar method*; ANDERSON; HOUGHTON, 1983). Neste método o animal usa um colar metálico rígido com alças nas laterais onde se encaixam os bastões. Os bastões possuem um sistema de gancho na ponta que trava e destrava por comando manual. Para realização da técnica são necessários dois técnicos treinados, cada um com um bastão. Os técnicos encaixam o gancho nas alças laterais do colar e travam o mesmo, para conduzir o animal até a cadeira de contenção. Na sequência, o colar é preso na cadeira de contenção e então,

soltam-se os ganchos dos bastões. Os membros do animal são contidos por tiras de couro.

O animal já contido na cadeira, foi transportado para a sala de colheita. Já na sala de colheita, cortavam-se duas tiras de eletrodos não-metálicos Defib-Pads¹⁸ (Figura 14A), que são compostos por uma malha porosa recoberta por gel eletrocondutor e originalmente utilizados para substituir o gel ou creme eletrocondutor para desfibrilador. As tiras de Defib-Pads foram colocadas envolta do pênis do animal (Figura 14B) e presas com garras jacaré recobertas por borracha isolante, de forma que o eletrodo negativo (preto) ficasse próximo à base do pênis e o eletrodo positivo (vermelho) ficasse próximo à glândula do pênis (Figura 14C). Os eletrodos eram conectados a um aparelho gerador de estímulos elétricos¹⁹ (Figura 14D). Além disso, o pênis foi lubrificado com Redux^{®20} creme (creme altamente condutor para eletrodos), para melhorar a transmissão do estímulo elétrico e evitar lesões por queimadura.

Após o preparo do animal, a manipulação do pênis e do recipiente de colheita era feita com uma mão (Figura 14E), enquanto o controle dos estímulos elétricos era feito com a outra mão. Inicialmente, era aplicado um estímulo de 1 V por 10-15 segundos. Na sequência, a voltagem era aumentada lentamente até que se observasse o ingurgitamento do pênis ou elevação dos testículos. Geralmente a ejaculação (Figura 14F) ocorre entre 10-20 V, mas independentemente de haver ejaculação ou não, a voltagem máxima não pode exceder 35 V. Cada tentativa deve durar entre 90-120 segundos e podem haver no máximo três tentativas, com intervalo de 1-3 minutos.

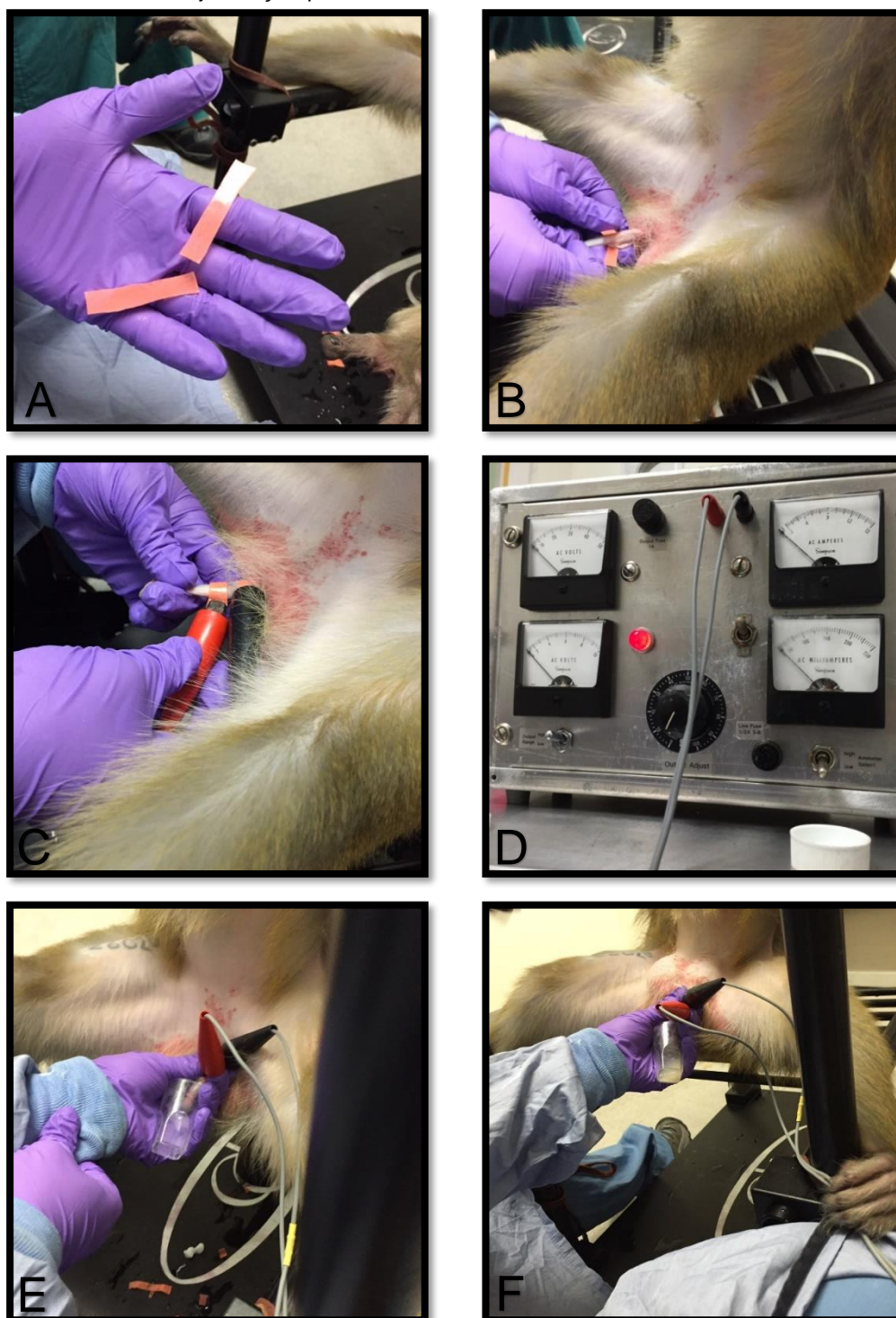
As colheitas foram realizadas no período de março a maio de 2015, com intervalo mínimo de três dias entre as colheitas. Para viabilizar a comparação dos diferentes protocolos, somente foram incluídas amostras com motilidade total superior a 30% (aqui denominadas amostras viáveis).

¹⁸ Catalog Number 2345N, 3M Health Care, St. Paul, Minnesota, USA

¹⁹ PT-Electronics, Boring, Oregon, USA

²⁰ Product # 66-04, Parker Laboratories, Inc., Fairfield, New Jersey, USA

Figura 14 - Colheita de sêmen de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) por eletroejaculação peniana



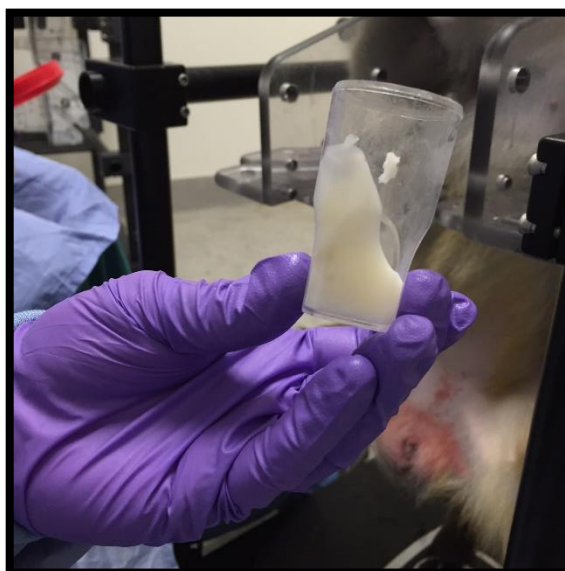
Fonte: (SIDENER, H., 2016).

Legenda: A. Tiras de Defib-Pads que atuam como eletrodos. B. Colocação da tira de Defib-Pads envolta do pênis do animal. C. Tiras de Defib-Pads presas com garras jacaré ligadas ao aparelho gerador de estímulos elétricos. D. Posicionamento da mão que segura o pênis e o recipiente de colheita do sêmen. E. Aparelho gerador de estímulos elétricos. F. Obtenção do ejaculado.

As amostras foram colhidas em recipiente plástico²¹ (Figura 15) e deixadas a temperatura ambiente (22°C) por 30 minutos de forma a permitir a separação da fração líquida. Após este período o volume da amostra foi medido com pipeta automática enquanto a mesma foi transferida para um tubo do tipo Eppendorf. Em seguida, 10 µl da amostra foram adicionados a 190 µl de TALP-Hepes (Apêndice B) para posterior avaliação de motilidade e integridade de membrana plasmática e acrossoma. Outros 10 µl foram adicionados a 190 µl de água bidestilada para posterior avaliação da concentração espermática. A amostra restante foi dividida para congelação com os diferentes protocolos, descritos mais adiante.

A motilidade foi avaliada conforme descrito anteriormente para sêmen de *Alouatta caraya*. A integridade de membrana plasmática e acrossoma (Figura 16) foram avaliadas por meio de coloração com eosina-*fast green* (AALSETH; SAACKE, 1986). Para tanto, 3 µl de sêmen foram colocados sobre uma lâmina aquecida a 37°C e 3 µl de corante foram adicionados ao sêmen e homogeneizados. Em seguida foi feito um esfregaço.

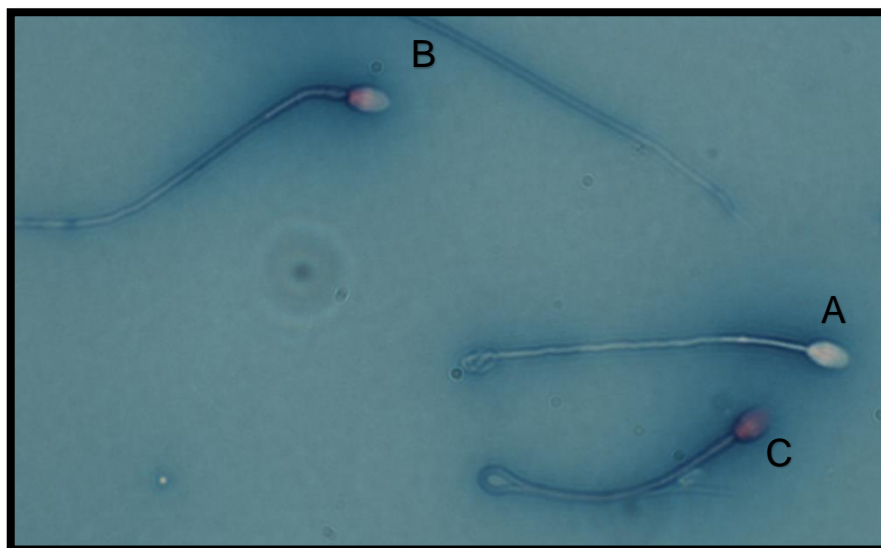
Figura 15 - Ejaculado de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) já coagulado no recipiente de colheita



Fonte: (SIDENER, H., 2016).

²¹ Frascos para diluição hematológica, Catalog Number 201-5266-05K, Evergreen Scientific, Los Angeles, California, USA

Figura 16 - Avaliação da integridade de membrana plasmática e de acrossoma



Fonte: (CARVALHO, F. M., 2015).

Legenda: Espermatozoides são classificados em não-corados (A), meio-corados (B) e corados (C). Espermatozoides com membrana plasmática íntegra = espermatozoides não-corados. Espermatozoides com acrossoma íntegro = espermatozoides não-corados + espermatozoides meio-corados. Espermatozoides corados = membrana plasmática e acrossoma lesados. Coloração com eosina-fast green. Aumento de 1000X (imersão).

Esta coloração permite a avaliação da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra ao mesmo tempo em que se avalia a porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro. No momento da análise, as células foram divididas em três classes: não-coradas, meio-coradas e coradas. Posteriormente, foi feita a interpretação da leitura para obtenção da porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e com acrossoma íntegro. Células não-coradas possuem tanto membrana plasmática como acrossoma íntegros. Células meio-coradas possuem membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro. Células coradas possuem membrana plasmática e acrossoma lesados. Ou seja, o número de células com membrana plasmática íntegra corresponde ao número de células não-coradas, enquanto o número de células com acrossoma íntegro corresponde à soma do número de células não-coradas com o número de células meio-coradas.

4.2.3.2 Protocolos de congelação do sêmen

Foram utilizadas de três a cinco amostras viáveis de cada macho (n=4), com um total de 16 amostras. Após as análises iniciais as amostras foram divididas em duas alíquotas iguais as quais foram diluídas com Test-gema de ovo (TGO) com glicerol a 3% (congelação lenta) preparado no California National Primate Research Center em Davis, Califórnia – EUA (Apêndice C) ou HTF-HSA com sacarose a 0,25 M (vitrificação; ISACHENKO et al., 2011).

4.2.3.2.1 Congelação lenta

O protocolo de congelação lenta utilizado no presente trabalho foi o estabelecido como padrão pelos pesquisadores do California National Primate Research Center. Esse protocolo foi baseado em protocolo inicialmente desenvolvido para sêmen de macaco-cynomolgus (TOLLNER et al., 1990) e posteriormente adaptado para sêmen de macaco-rhesus, por meio de diversos estudos (LEIBO et al., 2007; DONG et al., 2008b; DONG; CORREA; VANDEVOORT, 2009; DONG; HILL; VANDEVOORT, 2009), até chegar ao protocolo atual. A seguir será feita uma breve descrição do protocolo utilizado.

Para a congelação lenta as amostras foram inicialmente diluídas com TGO sem glicerol para uma concentração final de 100×10^6 spz/ml. Em seguida, foi adicionado TGO com glicerol a 6% na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor) de forma a se obter concentração final de 50×10^6 spz/ml e glicerol a 3%. A amostra foi, então, transferida para palhetas de 250 μ l, as quais foram vedadas com álcool polivinil e colocadas em um saco plástico, o qual foi inserido em um béquer com 600 ml de água bidestilada à temperatura ambiente (22°C). O béquer com as palhetas foi mantido em geladeira a 4°C por duas horas. Após a curva de refrigeração, as amostras foram colocadas sobre uma placa de isopor de 1 cm de espessura, dentro de uma caixa de isopor com 4 cm de nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas

no vapor de nitrogênio por 10 min. Após este período foram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico até o momento da análise. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 s.

4.2.3.2.2 Vitriificação

Para a vitriificação a amostra foi diluída inicialmente com HTF-HSA sem sacarose para uma concentração final de 100×10^6 spz/ml. Na sequência, foi adicionado HTF-HSA com sacarose 0,5 M na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor) de forma a se obter concentração final de 50×10^6 spz/ml e sacarose 0,25 M. As amostras foram armazenadas em SPS, conforme descrito anteriormente (item 3.1.3.11.1. *Experimento I*). Para descongelação, as palhetas com a amostra foram retiradas de dentro da palheta de 500 µl com ajuda de uma ponteira e mergulhadas em 1 ml de TALP-Hepes a 37°C, fazendo movimentos circulares de forma a acelerar a velocidade de descongelação.

4.2.4 Experimento II – Comparação de métodos de preparo pós-descongelação dos espermatozoides

O melhor protocolo obtido no Experimento I foi submetido a quatro métodos de preparo do sêmen, incluindo (1) lavagem simples, (2) *direct swim-up*, (3) Filtragem em lã de vidro e (4) separação por gradiente de densidade. Para tanto, foram selecionadas 20 amostras que representassem os quatro machos e incluíssem amostras de várias colheitas diferentes. A partir dessas amostras foram feitos cinco *pools* com quatro amostras, de forma que cada *pool* contivesse uma amostra de cada macho para evitar o efeito-macho. O *pool* foi inicialmente diluído com TALP-Hepes pré-aquecido a 37°C na proporção de 1:1 em tubo Falcon de 15 ml. Na sequência, o *pool* foi dividido em quatro alíquotas que foram submetidas aos diferentes métodos de preparo. A seguir será descrito cada método,

detalhadamente. Avaliaram-se concentração espermática, motilidade e integridade de membrana plasmática e de acrossoma antes e depois de submeter os espermatozoides aos diferentes métodos de preparo.

4.2.4.1 Lavagem simples

A técnica de lavagem simples foi feita conforme descrito no manual WHO (WHO, 2010). Para tanto, a amostra descongelada foi transferida para um tubo Falcon de 15 ml e diluída com 2 ml de TALP-Hepes pré-aquecido a 37°C. Na sequência, a amostra foi centrifugada a 300 g por 5 minutos. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante (2 ml), adicionaram-se 2 ml de TALP-Hepes e a amostra foi centrifugada novamente. O sobrenadante (2 ml) foi descartado e ressuspendeu-se a amostra para um volume final de 1 ml.

4.2.4.2 Direct Swim-up

A técnica de *direct swim-up* foi feita conforme descrito no manual WHO (WHO, 2010). Para tanto a amostra descongelada foi transferida para um tubo Falcon de 15 ml e adicionaram-se, cuidadosamente, 2 ml de TALP-Hepes pré-aquecido a 37°C sobre a amostra. A solução foi incubada em estufa a 37°C por 30 minutos, com o tubo inclinado em um ângulo de 45° e a tampa fechada. Após esse período o tubo foi cuidadosamente colocado na posição vertical e recuperou-se 0,8 ml do sobrenadante, o qual foi transferido para outro tubo Falcon de 15 ml. Adicionaram-se 1,4 ml de TALP-Hepes e a amostra foi centrifugada a 300 g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se a amostra para um volume final de 1 ml.

4.2.4.3 Separação por gradiente de densidade

A técnica de separação por gradiente de densidade foi adaptada a partir da técnica descrita no manual WHO (WHO, 2010). Para tanto, foram preparadas duas frações de gradientes com diferentes densidades. A primeira fração foi preparada diluindo-se 1600 µl de Percoll^{®22} em 400 µl de TALP-Hepes (Percoll[®] a 80%). A segunda fração foi preparada diluindo-se 600 µl da solução de Percoll[®] a 80% em 600 µl de TALP-Hepes, de forma a se obter meio de gradiente de densidade a 40%. Em seguida, 1 ml de solução de Percoll[®] a 80% foi colocado em um tubo Falcon de 15 ml e adicionou-se, cuidadosamente, 1 ml de solução de Percoll[®] a 40%. A amostra de sêmen foi ressuspensa com TALP-Hepes para um volume final de 1 ml e adicionada, cuidadosamente, sobre a segunda camada de Percoll[®]. Procedeu-se, então, a centrifugação da amostra a 300 g por 20 minutos. Na sequência, removeu-se o sobrenadante (2 ml) e adicionaram-se 5 ml de TALP-Hepes, homogeneizando a amostra gentilmente. Centrifugou-se a amostra a 200 g por 5 minutos, removeu-se o sobrenadante (5 ml) e adicionaram-se 5 ml de TALP-Hepes. Centrifugou-se a amostra novamente a 200 g por 5 minutos e removeu-se o sobrenadante (5 ml).

4.2.4.3.1 Comparação Percoll versus ISolate

Após a realização do Experimento II, participou-se de um experimento de outro laboratório, em que foi utilizado um meio de gradiente de densidade comercial específico para sêmen, para preparo de espermatozoides obtidos a partir de epidídimos de animais submetidos a eutanásia. Esse produto apresentou resultados promissores e optou-se por testá-lo com o objetivo de substituir o Percoll[®] no método de separação por gradiente de densidade.

²² Catalog #P4937, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.

Para tanto, 1 ml de ISolate[®] Stock Solution²³ (meio de gradiente de densidade a 90%) foi colocado em um tubo Falcon de 15 ml. Na sequência, adicionou-se, cuidadosamente, 1 ml de ISolate[®] pré-diluído na proporção de 1:1 com TALP-Hepes de forma a se obter meio de gradiente de densidade a 45%. A amostra de sêmen foi ressuspensa com TALP-Hepes para um volume final de 1 ml e adicionada, cuidadosamente, sobre a segunda camada de ISolate[®]. Procedeu-se, então, a centrifugação da amostra a 300 g por 20 minutos. Na sequência, removeu-se o sobrenadante (2 ml) e adicionaram-se 5 ml de TALP-Hepes, homogeneizando a amostra gentilmente. Centrifugou-se a amostra a 200 g por 5 minutos, removeu-se o sobrenadante (5 ml) e adicionaram-se 5 ml de TALP-Hepes. Centrifugou-se a amostra novamente a 200 g por 5 minutos e removeu-se o sobrenadante (5 ml).

Foram comparadas (teste t de student) as porcentagens de espermatozoides com motilidade progressiva, os números totais de espermatozoides e os números de espermatozoides com motilidade progressiva obtidos com cada método. A porcentagem e o número de espermatozoides com motilidade progressiva foram significativamente maiores ($p < 0,05$) com o uso do ISolate[®] quando comparado ao Percoll[®]. Não houve diferença ($p > 0,05$) no número total de espermatozoides obtidos com os diferentes meios. Tendo em vista os melhores resultados obtidos com o ISolate[®], optou-se pela substituição do Percoll[®] no experimento seguinte.

4.2.4.4 Filtragem em lã de vidro

O protocolo de filtragem em lã de vidro foi adaptado de um estudo anterior (ENGEL et al., 2001). Para realização da técnica, uma seringa de 1 ml foi cortada na altura da marca de 0,6 ml e 15 mg de lã de vidro foram inseridos na seringa, de forma que ficasse com 6 mm de altura. A lã de vidro foi lavada com 3 ml de TALP-Hepes para eliminar as impurezas. Em seguida a ponta da seringa foi inserida na tampa de um tubo tipo Eppendorf, previamente perfurada com uma broca com diâmetro adequado para permitir o encaixe justo da ponta da seringa na tampa do

²³ 90% Density Gradient Medium, Catalog ID 99275, Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA

tubo. A amostra foi delicadamente colocada sobre a lã de vidro e, em seguida, adicionaram-se 200 µl de TALP-Hepes pré-aquecido a 37°C. A coluna foi incubada a 37°C por 5 minutos para permitir a filtração da amostra. Após a filtração, a amostra foi transferida para um tubo Falcon de 15 ml e lavada com 2 ml de TALP-Hepes a 300 g por 5 minutos. Após a lavagem, descartou-se o sobrenadante (2 ml) e ressuspendeu-se a amostra para 1 ml com TALP-Hepes.

4.2.5 Experimento III – Fecundação *in vitro* (FIV)

O potencial de fecundação dos espermatozoides descongelados e preparados pelos dois melhores métodos de preparo obtidos no Experimento II foi comparado por meio de FIV. O sêmen fresco foi utilizado como controle da técnica de FIV.

4.2.5.1 Colheita, avaliação e preparo dos oócitos

Os oócitos foram obtidos por meio de videolaparoscopia após estimulação ovariana controlada, seguindo protocolo adaptado a partir de trabalhos anteriores (ZELINSKI-WOOTEN et al., 1995; OUHIBI et al., 2001). Cada fêmea (n=6) foi submetida a um ciclo de estimulação-colheita, com exceção de uma fêmea que foi submetida a dois ciclos, totalizando 7 ciclos de FIV. Para tanto, as fêmeas foram monitoradas diariamente para verificar se havia presença de sangue menstrual na gaiola e na região perigenital. A estimulação folicular iniciava-se entre os Dias 1 e 4, a partir da observação visual de menstruação (Dia 1 do ciclo menstrual). O protocolo de estimulação consistiu na aplicação de 30 UI de hormônio folículo-estimulante humano recombinante (rhFSH) duas vezes por dia (BID), por via intramuscular (IM), por 8-9 dias consecutivos. Amostras de sangue foram colhidas diariamente e quando a concentração sérica de estradiol estava >200 pg/ml, aplicou-se Antide – um

antagonista de hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) – na dose de 0,5 mg/kg por via subcutânea (SC). Além disso, aplicou-se 30 UI de hormônio luteinizante humano recombinante (rhLH) BID/IM nos Dias 7-9 e 1000 UI de gonadotropina coriônica humana (hCG) IM no Dia 10.

Para a colheita de complexos *cumulus*-oócito (COCs, do inglês *cumulus-oocyte complexes*) por videolaparoscopia, as fêmeas foram sedadas com quetamina (7 mg/kg, IM), intubadas e anestesiadas com isofluorano (1-3% em oxigênio) entre 27 e 29 h após a aplicação de hCG. Os COCs foram aspirados em tubos Falcon de 50 ml com TALP-Hepes a 37°C. Após a colheita, os tubos foram colocados em uma incubadora portátil²⁴ e transportados para o laboratório. Ao chegar ao laboratório, adicionou-se hialuronidase²⁵ (10 mg/ml de TALP-Hepes) e após 30 s agitou-se delicadamente o conteúdo do tubo com pipeta sorológica para desagregar as células do *cumulus* e da granulosa antes de filtrar a amostra. Com a filtragem, os oócitos ficavam retidos no filtro²⁶, enquanto o sangue e as células do *cumulus* e da granulosa atravessavam o filtro. O filtro era, então, lavado com TALP-Hepes e o meio contendo oócitos era colhido em placas de Petri. As células do *cumulus* restantes foram removidas com auxílio de uma micropipeta²⁷ com ponteira STRIPPER^{®28} e os oócitos foram avaliados para determinação do estágio de desenvolvimento e qualidade – vesícula germinativa (VG), Metáfase I (MI) e Metáfase II (MII). Após a determinação do estágio de desenvolvimento, os oócitos foram transferidos para placas de FIV.

As placas de FIV foram preparadas na manhã do dia da colheita de oócitos ou na tarde do dia anterior. As placas de FIV²⁹ utilizadas continham oito poços marginais para cultura dos oócitos/embriões e dois poços centrais para lavagem dos oócitos/embriões. Para preparo da placa para a FIV, foram adicionados 100 µl de meio TALP completo (Apêndice D) que foram recobertos com cerca de 9 ml de óleo mineral³⁰ e mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ por pelo menos 2-3 h

²⁴ Ref: 19180/0001, Minitube USA, Inc., Delavan, Wisconsin, USA

²⁵ Product Number H3506, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA

²⁶ Falcon[®] 70µm cell strainer, Product # 352350, Corning Inc., Corning, New York, USA

²⁷ Gel Sequencing Pipette, Cat. # 3-000-203, Drummond Scientific Company, Broomall, Pennsylvania, USA

²⁸ Cat. #MXL3-125, ORIGIO, a CooperSurgical Company, Måløv, Denmark

²⁹ Universal GPS[®] Dish, CE 0086, LifeGlobal[®] Group, LLC - USA

³⁰ OVOIL[™]-100, Vitrolife, Englewood, Colorado, USA

antes da FIV. Foi separada uma placa para os oócitos MI e uma placa para os oócitos MII. Apesar de apenas os oócitos MII serem passíveis de fecundação, existe uma chance de que os oócitos MI se tornem MII em tempo de serem fecundados pelos espermatozoides que ainda estiverem viáveis. Por este motivo, é feita a inseminação de ambos os estágios. Foram colocados de 3-5 oócitos em cada poço, dependendo do número de oócitos obtidos. Os poços foram marcados para indicar qual o tratamento dos espermatozoides. Os oócitos foram incubados nas mesmas condições por 5-7 h (BAVISTER et al., 1984) antes da inseminação.

4.2.5.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Para comparação dos métodos de preparo foi feito um *pool* de sêmen descongelado dos diferentes machos, que foi dividido em duas alíquotas. Cada alíquota foi preparada por um dos dois melhores métodos de preparo e utilizada para a FIV. Uma amostra de sêmen fresco foi utilizada como controle para a técnica de FIV.

4.2.5.2.1 *Processamento do sêmen fresco para FIV*

O sêmen fresco foi processado conforme descrito anteriormente (WOLF et al., 1989), com algumas modificações. Para tanto, logo após a colheita, o sêmen foi mantido em temperatura ambiente (22°C) por 30 minutos para permitir a separação da fração líquida. A fração líquida foi transferida para um tubo Falcon de 15 ml e lavada com 12 ml de TALP-Hepes a 400 g por 5 minutos. Após a segunda lavagem, descartou-se o sobrenadante, deixando 1 ml de espermatozoides diluídos. Na sequência avaliou-se a concentração e a motilidade. Uma fração contendo 40×10^6 espermatozoides móveis foi transferida para um novo tubo e ressuspensa com TALP complete para um volume final de 2 ml (concentração final de 20×10^6

sptz/ml). Os espermatozoides diluídos foram incubados nas mesmas condições dos oócitos por 4-6 h. Momentos antes da FIV, os espermatozoides foram ativados com uma solução de dibutilil adenosina monofosfato cíclico (dbcAMP) 1mM e cafeína 1 mM em solução salina (Apêndice E; BOATMAN; BAVISTER, 1984) na proporção de 1:9 (100 µl de sêmen:900 µl de solução ativadora). A solução ativadora também foi adicionada aos poços da placa de FIV (10 µl/poço) para garantir que todos os espermatozoides fossem ativados.

Após a ativação, 1 µl de espermatozoides ativados foram adicionados a cada poço da placa de FIV e as placas foram recolocadas na incubadora. Após 12-16 h de incubação, os oócitos foram examinados a procura dos pronúcleos (Figura 17), o que indicava que foram fecundados. Além disso, examinaram-se os oócitos MI para verificar quais se tornaram MII nesse período. Os oócitos que não sofreram maturação foram descartados e não entraram nos cálculos de taxa de fecundação. A cultura de embriões foi feita como descrito anteriormente (WOLF et al., 2004), apenas modificando-se o meio de cultura. Para tanto, os oócitos fecundados foram transferidos para poços contendo 100 µl de Global® *embryo culture medium*³¹ pré-equilibrado e cultivados por 156-180 h (estágio de blastocisto). Nesta fase, as placas contendo os embriões foram mantidas em uma câmara vedada dentro da incubadora, com uma mistura fixa de gases que consistia em 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. Os embriões foram avaliados a cada 24 h e transferidos para meio de cultura fresco a cada 48 h, até que alcançaram o estágio de blastocisto.

4.2.5.2.1 *Processamento do sêmen criopreservado para FIV*

As palhetas foram descongeladas a 37°C por 30 s e diluídas 1:1 com TALP-Hepes pré-aquecido a 37°C. Em seguida avaliou-se a motilidade. Apenas as amostras com pelo menos 30% de motilidade progressiva foram utilizadas (MAHADEVAN; TROUNSON, 1984). Após determinação da motilidade inicial, foi feito um *pool* com as amostras dos diferentes machos e dividiu-se esse *pool* em

³¹ CE 0086, LifeGlobal® Group, LLC - USA

duas alíquotas. Cada alíquota foi submetida a um dos dois métodos de preparo diferentes, como descrito anteriormente. Após o preparo das amostras, as mesmas foram diluídas em TALP complete (BAVISTER; YANAGIMACHI, 1977) de forma a se obter concentração final de 20×10^6 spz/ml. Os espermatozoides foram, então, ativados como descrito para o sêmen fresco e procedeu-se com a FIV, conforme descrito para o sêmen fresco.

Figura 17 - Oócito fecundado



Fonte: (RAMSEY, C., 2015)

Legenda: Note a presença dos dois pronúcleos (setas superiores) e dos dois corpúsculos polares (setas inferiores)

4.2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc. – Cary, NC - EUA, 2000), por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias LSD (*least significant difference*). 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 houve diferenças

significativas entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente serão apresentados dados relativos à análise descritiva do sêmen fresco. Na sequência serão apresentados e discutidos os dados de cada experimento, separadamente.

4.3.1 Análise descritiva do sêmen fresco de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*)

Os resultados da análise do sêmen fresco estão descritos na Tabela 6. Como observado em bugios, houve grande variação intra e interindivíduo. Os valores de volume variaram de 15 a 1450 μl , com média de $273,28 \pm 80,2 \mu\text{l}$, valores dentro daqueles relatados por VandeVoort (2004), que variaram de 20 a 1200 μl com média um pouco superior ($273,28 \mu\text{l}$ vs $387 \mu\text{l}$). Já os valores de concentração espermática variaram de 249×10^6 a 7688×10^6 sptz/ml, com média de $2686,2 \times 10^6 \pm 474,59 \times 10^6$ sptz/ml, valores muito superiores aos relatados anteriormente, que variaram de 6×10^6 a 1260×10^6 sptz/ml, com média de 136×10^6 sptz/ml (VANDEVOORT, 2004) ou médias de 370×10^6 a 4040×10^6 sptz/ml (YANG et al., 2011a).

Os valores de motilidade total variaram de 1 a 90% com média de $64,24 \pm 4,96\%$, enquanto os valores de motilidade progressiva variaram de 0 a 90%, com média de $51,4 \pm 5,53\%$. A motilidade total foi inferior à de outros trabalhos que variaram de $72,9 \pm 6,5\%$ (SI et al., 2006) a $90,1\%$ (MARTORANA; KLOOSTER; MEYERS, 2014). A motilidade progressiva também foi inferior a relatada em outros trabalhos que variaram de $61,4\%$ (MARTORANA; KLOOSTER; MEYERS, 2014) a $87,1 \pm 0,1\%$ (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 2000).

Com relação à integridade de membrana plasmática, os valores variaram de 27 a 80%, com média de $58,28 \pm 3,13\%$, semelhante à média de 60,8% (MARTORANA; KLOOSTER; MEYERS, 2014) e inferior à média de $77,4 \pm 5,3\%$ (SI et al., 2006). Já a integridade de acrossoma variou de 72 a 100%, com média de $86,0 \pm 1,55\%$, muito próxima de trabalhos anteriores, tais como $92,7 \pm 1,0\%$ (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 2000), $89,7 \pm 1,9\%$ (SI et al., 2006) e $91,0 \pm 0,6\%$ (YANG et al., 2011a).

Se levarmos em consideração as médias obtidas para cada macho, pode-se observar que os machos 28178 e 28281, apresentaram volume, motilidades total e progressiva e integridade de membrana plasmática inferiores aos machos 24583 e 26028. Esses machos (28178 e 28281) eram bem mais novos (5,5 anos) que os outros dois (24583 – 11 anos e 26028 – 8,5 anos). Apesar de ambos serem considerados sexualmente maduros, já que a maturidade sexual ocorre por volta de 3-4 anos de idade (FORTMAN; HEWETT; BENNET, 2002) e que ambos estão produzindo ejaculado com espermatozoides (LUETJENS; WEINBAUER, 2012), é possível que ainda não tenham atingido o tamanho e capacidades de um adulto, visto que ainda são relativamente jovens. Sabe-se que a maturidade sexual é atingida antes da maturidade morfológica e que podem se passar alguns anos até que ambas sejam atingidas (TURNQUIST; HONG, 1995). Isso poderia justificar as médias mais baixas obtidas nesse trabalho em relação aos demais.

Tabela 6 - Resultados (média ± EPM) da análise do sêmen fresco de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) colhido por eletroejaculação peniana, com intervalo mínimo de três dias entre as colheitas

Macho	Variável					
	Volume (µl)	Concentração (x10 ⁶ sptz/ml)	Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)	IMP (%)	IA (%)
24583	317,00 ± 97,98)	583,00 ± 163,85	87,50 ± 2,50	77,50 ± 2,50	38,75 ± 4,71	78,75 ± 3,40
26028	1111,25 ± 117,27	465,38 ± 114,18	91,25 ± 1,25	86,25 ± 2,39	64,75 ± 7,11	93,25 ± 2,87
28178	76,75 ± 20,22	5467,51 ± 646,80	58,75 ± 3,50	40,00 ± 5,35	65,25 ± 2,96	85,25 ± 1,67
28281	56,11 ± 9,54	2135,72 ± 357,43	46,78 ± 9,06	34,44 ± 8,68	57,89 ± 5,81	86,67 ± 2,93
Média Geral	273,28 ± 80,20	2686,20 ± 474,59	64,24 ± 4,96	51,40 ± 5,53	58,28 ± 3,13	86,00 ± 1,55

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

Legenda: EPM=Erro Padrão da Média; IMP=Integridade de Membrana Plasmática; IA=Integridade de Acrossoma

4.3.2 Experimento I – Comparação de métodos de criopreservação

Ao todo foram colhidas 24 amostras de sêmen de macaco-rhesus, das quais 16 (67%) foram consideradas viáveis para congelação. Conforme descrito anteriormente, as amostras foram divididas em duas alíquotas iguais e congeladas por congelação lenta ou vitrificação. Os resultados da comparação entre o sêmen fresco e criopreservado pelos métodos de congelação lenta ou vitrificação encontram-se na Tabela 7. A Tabela 7 também apresenta as taxas de recuperação obtidas com os diferentes métodos de criopreservação. O sêmen criopreservado teve redução significativa de todos os parâmetros avaliados, quando comparado ao sêmen fresco, independente do método de congelação. As taxas de recuperação obtidas por meio de congelação lenta variaram de 36 a 56%, dependendo da variável avaliada. Já as taxas de recuperação obtidas por meio de vitrificação variaram de 1 a 12%, dependendo da variável avaliada.

Os resultados da comparação entre os dois métodos de congelação estão descritos na Tabela 8. O método de congelação lenta foi significativamente melhor que o método de vitrificação em todos os parâmetros avaliados. Além disso, os resultados deixam claro que o método de vitrificação utilizado no presente estudo não foi eficiente para preservar a qualidade espermática pós-descongelação.

Conforme discutido no Estudo I, considerando-se os fundamentos de criobiologia (WOODS et al., 2011), é possível que o volume de amostra utilizado para vitrificação (100 µl) tenha sido muito grande, ou o *Straw Packaging System* (SPS) tenha dificultado a transferência de calor, o que tornaria a congelação mais lenta, permitindo a formação de cristais de gelo que causariam lesão nos espermatozoides. Se isso for verdade, a utilização de um volume pequeno ou a congelação de gotas direto no nitrogênio líquido, conforme descrito pelos mesmos autores que descreveram esse método (ISACHENKO et al., 2011), poderia trazer melhores resultados.

Tabela 7 - Comparação da qualidade do sêmen fresco versus criopreservado por congelação lenta ou vitrificação e taxa de recuperação de espermatozoides de acordo com o método de criopreservação

Método	Variável							
	Motilidade Total (%)	Recup. Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)	Recup. Motilidade Progressiva (%)	IMP (%)	Recup. IMP (%)	IA (%)	Recup. IA (%)
Fresco	76,56 ± 4,15 ^A	-	65,31 ± 5,31 ^A	-	58,44 ± 4,16 ^A	-	87,13 ± 2,06 ^A	-
Congelação lenta	42,50 ± 4,61 ^B	56,00	26,00 ± 4,70 ^B	40,00	21,13 ± 2,91 ^B	36,00	42,75 ± 3,81 ^B	49,00
Vitrificação	1,19 ± 0,29 ^C	2,00	0,44 ± 0,13 ^C	1,00	2,25 ± 0,68 ^C	4,00	10,69 ± 1,77 ^C	12,00

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

Legenda: Recup.=Recuperação; IMP=Integridade de Membrana Plasmática; IA=Integridade de Acrossoma

Médias na mesma coluna, seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativa de acordo com o teste LSD

Tabela 8 - Desempenho pós-descongelação de espermatozoides congelados por congelação lenta *versus* vitrificação

Método	Variável			
	Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)	IMP (%)	IA (%)
Congelação lenta	42,50 ± 4,61	26,00 ± 4,70	21,13 ± 2,91	42,75 ± 3,81
Vitrificação	1,19 ± 0,29	0,44 ± 0,13	2,25 ± 0,68	10,69 ± 1,77
P (Teste t de Student)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

Legenda: IMP=Integridade de Membrana Plasmática; IA=Integridade de Acrossoma

Para discussão da técnica de congelação lenta, devido à grande quantidade de estudos com criopreservação de sêmen de macaco-rhesus, os valores serão comparados apenas com os trabalhos mais recentes (a partir de 2010). A motilidade total pós-descongelação variou de 10 a 70% com média de $42,5 \pm 4,61\%$, próxima à média de $45,0 \pm 2,5\%$ (YANG et al., 2011a), ligeiramente inferior à média de $55,8\%$ (MARTORANA; KLOOSTER; MEYERS, 2014) e bem inferior à média de $63,7 \pm 2,8$ (SI et al., 2010). Já a motilidade progressiva variou de 1 a 60%, com média de $26,0 \pm 4,70\%$, valor semelhante à média de $29,6\%$ (MARTORANA; KLOOSTER; MEYERS, 2014). A integridade de membrana plasmática variou de 9 a 48%, com média de $21,13 \pm 2,91\%$, valor inferior à média de 50% obtida em trabalho anterior (MARTORANA; KLOOSTER; MEYERS, 2014). A integridade de acrossoma variou de 23 a 75%, com média de $42,75 \pm 3,81\%$, valor inferior às médias de $85,4 \pm 3,6$ (SI et al., 2010) e $71,1 \pm 0,8\%$ (YANG et al., 2011a).

O estudo de Si et al. (2010) utilizou uma técnica conhecida como congelação direcional, que consiste na aplicação de diversos gradientes de transferência de calor, de forma que haja controle preciso da propagação do gelo, evitando os danos causados por formação de cristais, ao contrário do que ocorre na congelação convencional. Além disso, utilizou-se glicerol a 5%, enquanto o diluidor do presente estudo continha glicerol a 3%. A associação desses dois fatores poderia justificar os resultados melhores obtidos em relação ao presente estudo.

O estudo de Yang et al. (2011a), utilizou protocolo de congelação lenta com glicerol a 5% e curvas de refrigeração e congelação diferentes das curvas utilizadas no presente estudo. Além disso, esses autores compararam o efeito do plasma seminal na qualidade pós-descongelação do sêmen e constataram que não houve diferença significativa na integridade de membrana plasmática. Entretanto, a presença do plasma seminal trouxe melhora significativa na integridade de acrossoma. No presente trabalho não houve remoção do plasma seminal, portanto essa não foi a causa da diferença na integridade de acrossoma entre os dois estudos. É possível que a concentração maior de glicerol tenha sido benéfica para a preservação da integridade de acrossoma, apesar de a motilidade total ter sido muito próxima daquela obtida no presente estudo.

O estudo mais recente (MARTORANA; KLOOSTER; MEYERS, 2014), comparou o efeito de diferentes taxas de resfriamento acima (suprazero) e abaixo (subzero) de zero na qualidade seminal pós-descongelção. Concluíram que as taxas de resfriamento suprazero são mais importantes na determinação da qualidade pós-descongelção quando comparadas às subzero. Além disso, determinaram que taxas menores de resfriamento suprazero geram melhores resultados pós-descongelção por causarem menor lesão de membrana e peroxidação lipídica por choque térmico. No referido trabalho, ao contrário do que ocorreu nos demais relatos, incluindo o presente estudo, não houve fase de equilíbrio em geladeira. O que variou foi a altura do “barco” de isopor, o que proporcionou curvas suprazero que variaram de 0,5 a 93°C/min. No presente estudo a curva de resfriamento de 22 a 4°C foi de aproximadamente 0,5°C/min, semelhante à curva lenta do referido estudo (MARTORANA; KLOOSTER; MEYERS, 2014). Isso justifica os resultados próximos.

Como sugerido por Si et al. (2010), as taxas de sobrevivência pós-descongelção podem variar por diferenças na resposta individual de cada macho, fato já demonstrado anteriormente (LEIBO et al., 2007), além de variações na curva de congelação por diversos fatores. Como discutido na análise descritiva do sêmen fresco, os machos mais jovens possuíam sêmen de qualidade relativamente baixa, o que pode ter afetado a congelabilidade do sêmen desses machos, afetando também a qualidade pós-descongelção. Possivelmente, isso pode ser a causa das médias mais baixas com relação a outros estudos.

4.3.3 Experimento II – Comparação de métodos de preparo pós-descongelção dos espermatozoides

Como descrito no Materiais e Métodos (item 4.2.4), para esse experimento, foi feito um *pool* de amostras dos quatro machos de forma a evitar o efeito-macho. Esse *pool* foi avaliado imediatamente após a descongelção e após passar pelos diferentes métodos de preparo. A análise descritiva dessa avaliação está

apresentada na Tabela 9. Entretanto, durante as análises, foi possível constatar que, em alguns casos, apesar das porcentagens de espermatozoides móveis serem altas, o número total de espermatozoides era muito baixo. Isso foi bem evidente no caso da técnica de filtragem em lã de vidro (FLV). Por este motivo, para a comparação dos métodos, foi feito o cálculo do número de espermatozoides com cada característica, multiplicando-se o número total de espermatozoides pela porcentagem observada para cada característica, de forma a fazer uma comparação fidedigna (Tabela 10). Adicionalmente, foi calculada a taxa de recuperação (%) de espermatozoides com cada característica, dividindo-se o número de espermatozoides pós-tratamento, pelo número de espermatozoides da amostra inicial (*pool*) (Tabela 11).

O número total de espermatozoides obtidos por lavagem simples (LS) foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que o obtido por FLV, mas não diferiu ($p > 0,05$) dos métodos de separação por gradiente de densidade (SGD) e *swim-up* (SU). Esses dois últimos (SGD e SU) também não diferiram ($p > 0,05$) de FLV. Não houve diferença entre os métodos ($p > 0,05$) com relação à motilidade total e progressiva ou com relação à integridade de acrossoma. Já a integridade de membrana plasmática foi significativamente maior ($p < 0,05$) para LS, quando comparado à FLV, porém não diferiu ($p > 0,05$) de SGD e SU. Esses últimos também não diferiram ($p > 0,05$) de FLV.

A taxa de recuperação de espermatozoides (porcentagem do número total) foi significativamente maior ($p < 0,05$) para LS, quando comparado aos demais métodos. Os métodos SGD e SU tiveram taxa de recuperação de espermatozoides significativamente maior ($p < 0,05$) que FLV. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na taxa de recuperação das motilidades total e progressiva entre os métodos. A taxa de recuperação de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (MPI) foi significativamente maior ($p < 0,05$) para LS, quando comparada aos demais métodos. Não houve diferença nas taxas de recuperação de espermatozoides com MPI entre FLV, SGD e SU. A taxa de espermatozoides com acrossoma íntegro (AI) para LS foi significativamente maior ($p < 0,05$) que FLV e SU, mas não diferiu de SGD. A taxa de recuperação de espermatozoides com AI para SGD também não diferiu de FLV e SU.

Tabela 9 - Porcentagem de espermatozoides (média ± erro padrão da média) com cada característica observados na amostra inicial (*pool*) e após passar pelos diferentes métodos de preparo

Método	Variável			
	Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)	IMP (%)	IA (%)
Pool	35,00 ± 10,95	23,40 ± 11,16	21,60 ± 3,44	40,00 ± 4,88
FLV	62,00 ± 8,60	24,20 ± 12,40	58,20 ± 3,97	75,20 ± 3,40
SGD	16,20 ± 5,87	9,00 ± 2,92	20,20 ± 3,60	36,80 ± 7,17
SU	21,20 ± 8,00	6,00 ± 2,45	27,80 ± 10,97	29,40 ± 3,26
LS	30,00 ± 10,49	10,20 ± 5,39	27,00 ± 1,38	38,60 ± 3,89

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

Legenda: FLV=Filtração em lâ de vidro; SGD=Separação por gradiente de centrifugação; SU=*Swim-up*; LS=Lavagem simples; IMP=Integridade de Membrana Plasmática; IA=Integridade de Acrossoma

Tabela 10 - Número de espermatozoides (média ± erro padrão da média) obtidos por meio dos diferentes métodos de preparo dos espermatozoides, a partir do *pool* inicial de amostras descongeladas

Método	Variável (x1000)*				
	Total Sptz	Sptz Móveis	Sptz com Motilidade Progressiva	Sptz com IMP	Sptz com IA
FLV	425,60 ± 43,99 ^B	251,56 ± 18,70 ^A	87,02 ± 38,31 ^A	248,75 ± 32,29 ^B	314,41 ± 19,35 ^A
SGD	1337,60 ± 307,17 ^{AB}	271,85 ± 111,51 ^A	145,92 ± 52,91 ^A	305,98 ± 95,57 ^{AB}	545,22 ± 159,86 ^A
SU	1406,00 ± 200,72 ^{AB}	304,68 ± 115,53 ^A	101,84 ± 42,37 ^A	340,78 ± 110,49 ^{AB}	414,81 ± 72,80 ^A
LS	2196,40 ± 412,68 ^A	515,28 ± 148,50 ^A	138,55 ± 52,29 ^A	606,71 ± 120,87 ^A	830,53 ± 145,94 ^A

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

*Médias na mesma coluna, seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05) de acordo com o teste LSD

Legenda: FLV=Filtração em lâ de vidro; SGD=Separação por gradiente de centrifugação; SU=*Swim-up*; LS=Lavagem simples; Sptz=espermatozoides; IMP=Integridade de Membrana Plasmática; IA=Integridade de Acrossoma

Tabela 11 - Porcentagem de espermatozoides recuperados (média \pm erro padrão da média) por meio dos diferentes métodos de preparo dos espermatozoides, a partir do *pool* inicial de amostras descongeladas

Método	Variável*				
	Recup. Sptz (%)	Recup. Sptz Móveis (%)	Recup. Sptz Motilidade Progressiva (%)	Recup. Sptz com IMP (%)	Recup. Sptz com IA (%)
FLV	5,38 \pm 1,01 ^C	21,49 \pm 11,86 ^A	5,88 \pm 1,69 ^A	14,76 \pm 2,90 ^B	10,14 \pm 1,77 ^B
SGD	16,29 \pm 4,47 ^B	12,28 \pm 7,61 ^A	11,32 \pm 7,74 ^A	16,65 \pm 5,32 ^B	15,99 \pm 4,90 ^{AB}
SU	16,27 \pm 1,57 ^B	15,74 \pm 8,58 ^A	4,05 \pm 2,62 ^A	18,56 \pm 4,63 ^B	12,65 \pm 2,28 ^B
LS	28,30 \pm 6,37 ^A	31,37 \pm 13,52 ^A	17,14 \pm 8,88 ^A	35,72 \pm 8,45 ^A	27,87 \pm 7,04 ^A

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

*Médias na mesma coluna, seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste LSD

Legenda: FLV=Filtração em lã de vidro; SGD=Separação por gradiente de centrifugação; SU=Swim-up; LS=Lavagem simples; Sptz=espermatozoides; Recup.=Recuperação; IMP=Integridade de Membrana Plasmática; IA=Integridade de Acrossoma

Se fosse considerada apenas a avaliação das porcentagens iniciais (Tabela 9), como foi feito em trabalhos anteriores (ENGEL et al., 2001; LEE et al., 2009; KIM; YU; KIM, 2010; ARZONDO et al., 2012) haveria a falsa impressão de que a FLV seria o método mais eficiente. Entretanto, observando as outras análises, fica claro que a lâ de vidro retém não só espermatozoides defeituosos ou mortos, como também espermatozoides saudáveis.

Essas análises permitem inferir que, dentre os métodos avaliados, o mais eficiente foi a LS e o menos eficiente foi a FLV. Os métodos de SGD e SU não diferiram entre si, apesar da taxa de recuperação de espermatozoides com AI ter sido um pouco melhor para SGD. Com base nesses resultados, optou-se por utilizar os métodos de LS e SGD para preparar os espermatozoides descongelados para FIV (Experimento III).

4.3.4 Experimento III – Fecundação *in vitro* (FIV)

Conforme apresentado no Material e Métodos, para este experimento, foram utilizados sêmen fresco (controle) e sêmen criopreservado preparado pelos dois melhores métodos selecionados no Experimento II. Os métodos selecionados foram separação por gradiente de densidade (ISolate[®]) e lavagem simples.

Geralmente os dados de FIV são apresentados juntando-se os dados dos oócitos MI e MII, já que apenas oócitos MII podem ser fecundados. Entretanto, a análise estatística (Tabela 12) revelou que houve interação método*estágio para a taxa de blastocisto, o que implica na necessidade de avaliação separada das taxas de fecundação dos oócitos MI e MII. Além disso, a análise também revelou que houve influência do estágio no número de oócitos que clivaram, e no número de embriões que atingiram os estágios de oito células, mórula, mórula compacta e blastocisto.

Tabela 12 - Avaliação do efeito do método (sêmen fresco, gradiente de densidade ou lavagem simples) e do estágio de maturação do oócito do momento da inseminação, nas variáveis relacionadas a fecundação *in vitro* (FIV)

Variável	Fonte	ANOVA
Clivagem	Método	0,0082
	Estágio do oócito	0,0206
	Método*estágio	0,9057
Taxa de fecundação	Método	0,0034
	Estágio do oócito	0,9347
	Método*estágio	0,6363
Embrião de 8 células	Método	0,0029
	Estágio do oócito	0,0472
	Método*estágio	0,8682
Mórula	Método	0,0015
	Estágio do oócito	0,0080
	Método*estágio	0,4782
Mórula compacta	Método	0,0025
	Estágio do oócito	0,0074
	Método*estágio	0,2145
Blastocisto	Método	0,0015
	Estágio do oócito	0,0076
	Método*estágio	0,0740
Taxa de blastocisto	Método	0,0026
	Estágio do oócito	0,0017
	Método*estágio	0,0385

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

A Tabela 13 apresenta os dados relativos a avaliação da qualidade seminal por meio de FIV (Figura 17). Avaliou-se o desempenho de amostras de sêmen criopreservado preparado por separação por gradiente de densidade (SGD) ou por lavagem simples (LS), o qual foi comparado ao desempenho de amostras de sêmen fresco (controle). Os parâmetros avaliados foram o número inicial de oócitos, o número de oócitos que clivaram e o número de blastocistos. A partir desses parâmetros calcularam-se a taxa de fecundação e a taxa de blastocisto.

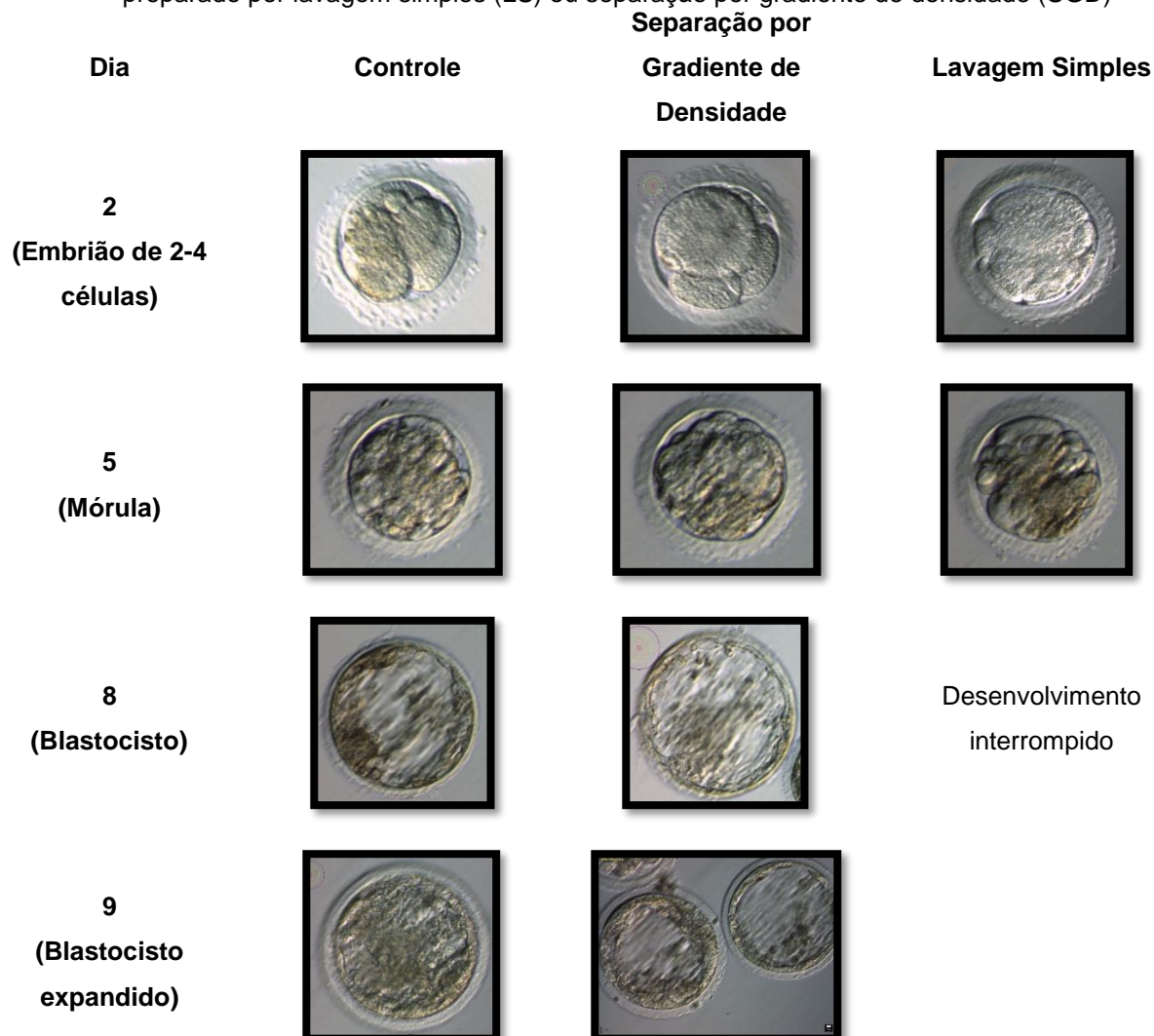
Tabela 13 - Resultados da avaliação da qualidade seminal do sêmen criopreservado por meio da fecundação in vitro (FIV). O sêmen criopreservado foi preparado por separação por gradiente de densidade ou por lavagem simples. O sêmen fresco foi utilizado como controle

Estágio de maturação no momento da inseminação	Variável	Sêmen Fresco*		Sêmen criopreservado*				ANOVA
		Total	Média ± EPM	Gradiente de densidade		Lavagem Simples		
				Total	Média ± EPM	Total	Média ± EPM	
MI	No. de oócitos	24	4,0 ± 1,67 ^A	43	6,14 ± 4,07 ^A	21	3,0 ± 0,93 ^A	0,6929
	Oócitos que clivaram	13	2,17 ± 0,87 ^A	6	0,86 ± 0,46 ^{AB}	1	0,14 ± 0,14 ^B	0,0528
	No. de blastocistos	3	0,5 ± 0,34 ^A	2	0,29 ± 0,18 ^A	0	0 ^A	0,2697
	Taxa de fecundação	13/24 (54%)	43,5 ± 16,36 ^A	6/43 (14%)	25,14 ± 14,24 ^{AB}	1/21 (5%)	2,0 ± 2,0 ^B	0,0845
	Taxa de blastocisto	3/13 (23%)	10,83 ± 7,12 ^A	2/6 (33%)	11,86 ± 7,88 ^A	0/1 (0%)	0 (0%) ^A	0,3193
MII	No. de oócitos	77	11,0 ± 4,59 ^A	86	12,29 ± 4,31 ^A	84	12,0 ± 4,55 ^A	0,9776
	Oócitos que clivaram	27	3,86 ± 1,12 ^A	14	2,0 ± 0,62 ^{AB}	9	1,29 ± 0,61 ^B	0,0992
	No. de blastocistos	14	2,0 ± 0,53 ^A	5	0,71 ± 0,29 ^B	1	0,14 ± 0,14 ^B	0,0056
	Taxa de fecundação	27/77 (35%)	41,43 ± 3,6 ^A	14/86 (16%)	18,43 ± 6,88 ^B	9/84 (11%)	12,71 ± 7,68 ^B	0,0113
	Taxa de blastocisto	14/27 (52%)	64,71 ± 13,59 ^A	5/14 (36%)	30,86 ± 13,81 ^{AB}	1/9 (11%)	4,71 ± 4,71 ^B	0,0062

Fonte: (CARVALHO, F. M., 2016)

*Médias na mesma linha, seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste LSD

Figura 18 - Exemplo de desenvolvimento embrionário do primeiro ensaio de fecundação *in vitro* (FIV). Os oócitos foram inseminados utilizando sêmen fresco (controle) ou criopreservado preparado por lavagem simples (LS) ou separação por gradiente de densidade (SGD)



Fonte: (RAMSEY, C., 2015)

Para os oócitos que se encontravam no estágio MII no momento da FIV e se transformaram em MIII até a primeira avaliação pós-inseminação, o sêmen fresco apresentou taxa de fecundação significativamente maior que o LS. O SGD não diferiu do sêmen fresco ou do LS. Não houve diferença na taxa de blastocisto dos diferentes tratamentos.

Para os oócitos MIII, a taxa de fecundação do sêmen fresco foi significativamente maior que do sêmen criopreservado independente do tratamento.

A taxa de blastocisto do sêmen fresco foi significativamente maior que do LS. O SGD não diferiu do sêmen fresco ou do LS.

Os estudos de FIV com sêmen fresco relatam taxas de fecundação que variam de 50% (WOLF et al., 1989) a 88% (SCHRAMM; BAVISTER, 1996) e 89% (ZELINSKI-WOOTEN et al., 1995) e taxas de blastocisto de 48 a 61% (SCHRAMM; BAVISTER, 1996). As taxas de fecundação obtidas com sêmen fresco no presente trabalho foram $43,5 \pm 16,36\%$ (MI) e $41,43 \pm 3,6\%$ (MII), taxas muito semelhantes entre si, porém inferiores às obtidas em trabalhos anteriores, apesar da metodologia semelhante. Não foi possível estabelecer uma causa para estas taxas inferiores, visto que os animais utilizados neste estudo, já foram utilizados em outros estudos no mesmo laboratório, com os mesmos protocolos, porém com taxas bem superiores (CATHY RAMSEY, comunicação pessoal)³². Já as taxas de blastocisto foram $10,83 \pm 7,12\%$ (MI) e $64,71 \pm 13,59\%$ (MII). As taxas obtidas com os MII foram muito próximas às taxas obtidas em trabalho anterior, o que não ocorreu com os MI. O mesmo foi observado para o sêmen criopreservado.

Segundo revisão de Canipari (2000), as células do *cumulus* têm importante papel, tanto na maturação nuclear, como na maturação citoplasmática de oócitos, independente de serem derivados de folículos antrais ou pré-ovulatórios. Como parte do protocolo estabelecido para colheita e processamento dos COCs de macacos-rhesus, após a lavagem, filtragem e separação dos oócitos, faz-se a desnudação dos mesmos.

Dessa forma, os oócitos que ainda se encontram no estágio de vesícula germinativa ou MI, terminam a maturação na ausência dessas células. Como discutido em trabalhos anteriores (LAZENDORF et al., 1990; SCHRAMM; PAPROCKI; VANDEVOORT, 2003), é possível que esses oócitos não tenham competência para o desenvolvimento, devido à maturação incompleta ou inadequada do citoplasma, o que levaria a interrupção do desenvolvimento no momento em que deveria ocorrer a ativação do genoma embrionário (EGA, do inglês *embryonic genome activation*) que, nessa espécie, ocorre no estágio de seis a oito células (SCHRAMM; BAVISTER, 1999). Isso poderia explicar a taxa de blastocisto

³² Mencionado pela técnica de laboratório Cathy Ramsey, responsável pelo serviço de Tecnologia de Reprodução Assistida do ART Core do Oregon National Primate Research Center, Beaverton, OR, EUA, 2015.

muito maior para os oócitos MII, quando comparados aos MI, tanto para o sêmen fresco, como para o sêmen criopreservado.

Existe apenas um trabalho que avaliou o sêmen criopreservado de macaco-rhesus por meio de FIV (SI et al., 2000). Nesse trabalho, os autores compararam dois protocolos para criopreservação do sêmen e utilizaram aquele com os melhores resultados para realização de FIV. O protocolo selecionado (TTE), diferiu do utilizado no presente trabalho (TEST-gema de ovo), por incluir, além da glicose, os açúcares lactose e rafinose; por utilizar concentração final de glicerol de 5%, ao invés de 3%; e por utilizar curva de equilíbrio de 30 minutos ao invés de 2 h. Com isso, a média de motilidade pós-descongelção foi de $56,0 \pm 5,0\%$, ligeiramente superior à obtida no presente trabalho. Além disso, a longevidade dos espermatozoides criopreservados com esse protocolo foi excelente, com perda insignificante da motilidade durante 6 h pós-descongelção e manutenção da motilidade acima de 30% por mais de 12 h. As amostras foram descongeladas da mesma forma que no presente trabalho e preparadas por lavagem simples em TALP-Hepes. Isso permitiu uma taxa de fecundação de $82,0 \pm 13,0\%$, muito superior às obtidas no presente trabalho – $25,14 \pm 14,24\%$ (MI) e $18,43 \pm 6,88\%$ (MII), e uma taxa de blastocistos de $39,0 \pm 21,0\%$, próxima da obtida no presente trabalho para MII ($30,86 \pm 13,81\%$) e superior à obtida para MI ($11,86 \pm 7,88\%$), considerando apenas os melhores resultados (SGD).

O referido estudo (Si et al., 2000) foi realizado utilizando oócitos imaturos (VG), maturados *in vitro*. Apesar de terem obtido alta taxa de fecundação, a taxa de blastocisto foi relativamente baixa, o que corrobora o que foi sugerido anteriormente, ou seja, oócitos maturados *in vitro* têm menor competência de desenvolvimento, quando comparados aos oócitos maturados *in vivo*, fato que ocorre também em bovinos (BLANCO et al., 2011).

Apesar das taxas de blastocistos serem inferiores para oócitos maturados *in vitro*, todo o processo para obtenção de COCs e realização da FIV é caro, o que gera a necessidade de aproveitamento máximo dos recursos disponíveis. Além disso, há casos de aproveitamento de material de animais que vieram a óbito ou que foram submetidos à eutanásia. Por esses motivos, é mais do que justificado o uso de oócitos maturados *in vitro*, mesmo que com menores taxas de blastocisto. São

necessários mais estudos para tentar obter oócitos de melhor qualidade e com maior competência de desenvolvimento.

4.4 CONCLUSÕES

- A técnica de congelação lenta estabelecida como padrão foi mais adequada para criopreservação de sêmen de *Macaca mulatta*, com relação a todos os parâmetros avaliados.
- A técnica de vitrificação utilizada não foi adequada para sêmen desta espécie.
- As técnicas de lavagem simples e separação por gradiente de densidade foram as mais adequadas para preparo do sêmen pós-descongelação.
- A técnica de separação por gradiente de densidade foi mais adequada para preparo do sêmen criopreservado para realização de FIV, quando comparada à técnica de lavagem simples.
- Não foi possível otimizar a criopreservação de sêmen desta espécie, porém foi possível estabelecer um método de preparo pós-descongelação que possibilitou a fecundação e desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como de costume, esse trabalho gerou mais dúvidas do que respostas, mas deixou claro que apesar de ambas as espécies fazerem parte da Ordem Primates, há grandes diferenças nas características seminais das mesmas. O sêmen do bugio não coagula e, apesar de ter tamanho semelhante ao do macaco-rhesus, o volume de sêmen e a concentração espermática tendem a ser menores. Por que essa diferença se ambas as espécies possuem um sistema de acasalamento do tipo poligínico-poliândrico? Protocolos de criopreservação semelhantes, aplicados ao sêmen das duas espécies, geraram resultados muito diferentes. O sêmen do bugio demonstrou-se muito mais sensível ao processo de congelação-descongelação quando comparado ao sêmen do macaco-rhesus. Será que os fatores presentes no coágulo seminal do macaco-rhesus conferem alguma proteção que melhora a congelabilidade do sêmen? Nada se sabe ainda com relação à ativação de espermatozoides de bugio. Será semelhante à do macaco-rhesus? Se isso é dessa forma para os machos, como será para as fêmeas? Como mencionado anteriormente, acredita-se que as fêmeas de *Alouatta caraya* possuem um ciclo ovariano do tipo menstrual (duração de cerca de 20 dias), assim como as fêmeas de macaco-rhesus (duração de cerca de 26-30 dias). Será possível adaptar os protocolos de estimulação ovariana controlada para as fêmeas de bugio? E com relação à FIV, será possível adaptar os protocolos para bugios?

O presente trabalho deu a oportunidade de contato com dois lados da ciência: o lado da conservação e o lado da pesquisa biomédica. De um lado há uma quantidade de informações mínima ou até ausente, enquanto do outro há uma infinidade de informações disponíveis. De um lado a disponibilidade de indivíduos e de financiamento é pequena, o que traz grande dificuldade para realização de estudos científicos. Do outro lado, há relativamente grande disponibilidade de indivíduos e de financiamento, mas, por outro lado, não há tanto interesse em pesquisa básica. Nessa situação, coloca-se “o carro à frente dos bois”, ou seja, apesar de ainda haver muito o que se estudar, existe maior preocupação em se realizar trabalhos pioneiros, de alta tecnologia e os estudos básicos vão ficando para

trás. Portanto, de certa forma, apesar dos grandes avanços e da grande quantidade de trabalhos disponíveis na literatura, ainda há certa carência de informações na área básica. Nesse sentido, os dois lados deixam de ser opostos e passam a ser similares. A única certeza que esse trabalho permite ter, é a de que ainda há muito o que se estudar.

REFERÊNCIAS

AALSETH, E. P.; SAACKE, R. G. Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. **Gamete Research**, v. 15, p. 73-81, 1986.

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.

AGCA, Y.; LIU, J.; MULLEN, S.; JOHNSON-WARD, J.; GOULD, K.; CHAN, A.; CRITSER, J. Chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa osmotic tolerance and cryoprotectant permeability characteristics. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, p. 470-477, 2005.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993.

AMBOKA, J. N. O.; MWETHERA, P. G.; Characterization of semen from olive baboons. **Journal of Medical Primatology**, v. 32, p. 325-329, 2003.

ANDERSON, J. H.; HOUGHTON, P. The pole and collar system. A technique for handling and training nonhuman primates. **Lab Animal**, v. 12, n. 6, p. 47-49, 1983.

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

ANSARI, M.; TOWHIDI, A.; SHAHRBABA, M. M.; BAHREINI, M. Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in goat. **Slovak Journal of Animal Science**, v. 45, n.1, p. 7-13, 2012.

ARAKAKI, P. R.; CARVALHO, F. M.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VALLE, R. R. Collection and analysis of semen from Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*). In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS CONFERENCE, 43., 2011, Kansas City. **Proceedings...** Kansas City: American Association of Zoo Veterinarians, 2011a. p. 14-15.

ARAKAKI, P. R.; CARVALHO, F. M.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VALLE, R. R. Morfologia espermática em mico-de-Goeldi (*Callimico goeldii*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRIMATOLOGIA, 14., 2011, Curitiba. **Livro de Resumos**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Primatologia, 2011b. p. 178.

ARAKAKI, P. R.; CARVALHO, F. M.; MENDES, C. M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VALLE, R. R. Evaluation of sperm DNA fragmentation of semen from Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*). In: INTERNATIONAL PRIMATOLOGICAL SOCIETY CONGRESS, 24., 2012, Cancún. **Proceedings...** Cancún: International Primatological Society, 2012. Abstract #262.

ARAKAKI, P. R.; CARVALHO, F. M.; NICHI, M.; MUNIZ, J. A. P. C.; MONTEIRO, F. O. B.; VALLE, R. R. Semen analysis and comparison in two Neotropical primate species, *Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata* from a captive colony. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANIMAIS SELVAGENS (ABRAVAS), 16.; ENCONTRO DA ABRAVAS, 22., 2013, Salvador. **Anais...** Salvador: ABRAVAS, 2013. p. 236.

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.

ARBOR, A. Male accessory glands and the evolution of copulatory plugs in rodents. **Occasional Papers of the Museum of Zoology**, n. 689, p. 1-27, 1979.

ARZONDO, M. M.; CABALLERO, J. N.; MARÍN-BRIGGILER, C. I.; DALVIT, G.; CETICA, P. D.; VAZQUEZ-LEVIN, M. H. Glass wool filtration of bull cryopreserved semen: a rapid and effective method to obtain a high percentage of functional sperm. **Theriogenology**, v. 78, p. 201-209, 2012.

ASTUTI, P.; YUSUF, T. L.; HAYES, E.; MAHESHWARI, H.; SJAHFIRDI, L.; JUNAIDI, A.; SAJUTHI, D. Testicular volume and concentration of spermatozoa in the monogamous male Javan gibbons (*Hylobates moloch*). In: INTERNATIONAL MEETING ON ASIAN ZOO/WILDLIFE MEDICINE AND CONSERVATION (AZWMC), 3., 2008, Bogor. **Proceedings...** Bogor: AZWMC, 2008. p. 183-186.

AURICCHIO, P. Subfamília Alouattinae. In: ____ **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995. p. 128-134.

BADER, H. Electroejaculation in chimpanzees and gorillas and artificial insemination in chimpanzees. **Zoo Biology**, v. 2, n. 4, p. 307-314, 1983.

BALLACHEY, B. E.; EVENSON, D. P.; SAACKE, R. G. The sperm chromatin structure assay: Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 109-115, 1988.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011. Article ID 686137. doi:10.4061/2011/686137.

BANSODE, F. W.; CHOWDHURY, S. R.; DHAR, J. D. Seasonal changes in the seminiferous epithelium of rhesus and bonnet monkeys. **Journal of Medical Primatology**, v. 32, p. 170-177, 2003.

BARNABE, R. C.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; OLIVEIRA, C. A.; BARNABE, A. H. Analysis of some normal parameters of the spermiogram of captive capuchin monkeys (*Cebus apella* Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n. 6, p. 331-333, 2002.

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)**. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BAVISTER, B. D.; BOATMAN, D. E.; COLLINS, K. DIERSCHKE, D. J.; EISELE, S. G. Birth of rhesus monkey infant after *in vitro* fertilization and nonsurgical embryo transfer. **PNAS**, v. 81, p. 2218-2222, 1984.

BAVISTER, B. D.; YANAGIMACHI, R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 228-237, 1977.

BEEHLER, B. A.; PIPER, A.; JACOBS, S. C.; CLOWRY, L. J. Post mortem collection of sperm from a lowland gorilla. In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS CONFERENCE, 15., 1982, Seattle. **Proceedings...** Seattle: American Association of Zoo Veterinarians, 1982. p. 56–57

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

BJÖRNDAHL, L.; SÖDERLUND, I.; KVIST, U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. **Human Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 813-816, 2003.

BLANCO, M. R.; DEMYDA, S.; MILLÁN, M. M.; GENERO, E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. 7, p. 155-165, 2011.

BLOM, E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertility and Sterility**, v. 1, n. 2, p. 176-177, 1950.

BOATMAN, D. E.; BAVISTER, B. D. Stimulation of rhesus monkey sperm capacitation by cyclic nucleotide mediators. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 71, p. 357-366, 1984.

BOE-HANSEN, G. B.; MORRIS, I. A.; ERSBOLL, A. K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, 1789-1802, 2005.

BORNMAN, M. S.; VAN VUUREN, M.; MELTZER, D. G.; VAN DER MERWE, C. A.; V RENSBURG, S. J. Quality of semen obtained by electroejaculation from chacma baboons (*Papio ursinus*). **Journal of Medical Primatology**, v. 17, n. 1, p. 57-61.

BRANDON-JONES, D.; EUDEY, A. A.; GEISSMANN, T.; GROVES, C. P.; MELNICK, D. J.; MORALES, J. C.; SHEKELLE, M.; STEWART, C. B. Asian primate classification. **International Journal of Primatology**, v. 25, n. 1, p. 97-164, 2004.

BROWN, C. S.; LOSKUTOFF, N. M. A training program for noninvasive semen collection in captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). **Zoo Biology**, v. 17, p. 143-151, 1998.

BUSH, D. E.; RUSSEL, L. H.; FLOWERS, A. I.; SORENSEN, A. M. Semen evaluation in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Laboratory Animal Science**, v. 25, p. 588-593, 1975.

BUTLER, T. M.; BROWN, B. G.; DYSKO, R. C.; FORD, E. W.; HOSKINS, D. E.; KLEIN, H. J.; LEVIN, J. L.; MURRAY, K. A.; ROSENBERG, D. P.; SOUTHERS, J.

L.; SWENSEN, R. B. Medical Management. In: BENNETT, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. (Ed.). **Nonhuman primates in biomedical research: biology and management**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 255-334.

CANIPARI, R. Oocyte-granulosa cell interactions. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 3, p. 279-289, 2000.

CARVALHO, F. M. **Avaliação de diluidores à base de gema de ovo e de lecitina de soja para a congelação de sêmen de *Alouatta caraya***. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

CARVALHO, F. M.; ARAKAKI, P. R.; NICHII, M.; MENDES, C. M.; ASSUMPÇÃO, M. E.; MUNIZ, J. A.; DUARTE, J. M.; VALLE, R. R. Effect of cryopreservation on lipid peroxidation and DNA fragmentation in *Alouatta caraya* semen. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PRIMATOLOGICAL SOCIETY, 24., 2012, Cancún. **Proceedings...** Cancún: International Primatological Society, 2012. Abstract #268

CARVALHO, F. M.; ARAKAKI, P. R.; NICHII, M.; MUNIZ, J. A. P. C.; DUARTE, J. M. B.; VALLE, R. R. Evaluation of sperm quality in successive regular collections from captive black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*). **Animal Reproduction**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 2014.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE PRIMATAS BRASILEIROS. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CPB-ICMBio). **Primatas brasileiros**. 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/cpb/primatas-brasileiros.html>>. Acesso em: 13 maio 2014.

CERDA-MOLINA, A. L.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; CHAVIRA-RAMÍREZ, R.; CARDENAS, M.; MONDRÁGON-CEBALLOS, R. Seasonality of LH, testosterone and sperm parameters in spider monkey males (*Ateles geoffroyi*). **American Journal of Primatology**, v. 71, p. 427-431, 2009.

CHANAPIWAT, P.; KAEOKET, K.; TUMMARUK, P. Improvement of the frozen boar semen quality by docosahexaenoic acid (DHA) and L-cysteine supplementation. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 15, p. 3697-3703, 2012.

CHIARELLO, A. G.; AGUIAR, L. M. S.; CERQUEIRA, R.; MELO, F. R.; RODRIGUES, F. H. G.; SILVA, V. M. F. Mamíferos ameaçados de extinção no

Brasil. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. v. 2, p. 681-702.

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

CROCKETT, C. M.; AND RUDRAN, R. Red howler monkey birth data. I: Seasonal variation. **American Journal of Primatology**, v. 13, n. 4, p. 347-368, 1987.

CROSS, N. L.; MORALES, P.; FUKUDA, M.; BEHBOODI, E. Determining acrosomal status of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm by fluorescence microscopy. **American Journal of Primatology**, v. 17, n. 2, p. 157-163, 1989.

CSEH, S.; CHAN, P. J.; CORSELLI, J.; BAILEY, L. L. Electroejaculated baboon (*Papio anubis*) sperm requires a higher dosage of pentoxifylline to enhance motility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 17, n. 8, p. 449-453, 2000.

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

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

DAVIS, M. L. The spermatozoon of the common marmoset, *Callithrix jacchus* (Primates, Callitrichidae): an ultrastructural investigation. **Dissertation Abstracts International**, v. 43, n. 6, p.1696B-1697B, 1982.

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. 723-729, 1976.

DEVINE, M. C. Potential for sperm competition in reptiles: behavioral and physiological consequences. In: SMITH, R. L. **Sperm competition and evolution of animal mating systems**. New York: Academic Press, 1984. p. 509-521.

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

DIXSON, A. F. Observations on the evolution of the genitalia and copulatory behavior in male primates. **Journal of Zoology**, v. 213, p. 423-443, 1987.

DIXSON, A. F. **Primate sexuality**: comparative studies of the prosimians, monkeys, apes, and human beings. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2012. 785 p.

DIXSON, A. F. Sexual selection and evolution of the seminal vesicles in primates. **Folia Primatologica**, v. 69, p. 300-306, 1998.

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

D'OCCHIO, M. J.; HENGSTBERGER, K. J.; JOHNSTON, S. D. Review: Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 1-17, 2007.

DONG, Q.; CORREA, L. M.; VANDERVOORT, C. A. Rhesus monkey sperm cryopreservation with TEST-yolk extender in the absence of permeable cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 58, p. 20-27, 2009.

DONG, Q.; HILL, D.; VANDEVOORT, C. A. Interactions among pre-cooling, cryoprotectant, cooling, and thawing for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. **Cryobiology**, v. 59, p. 268-274, 2009.

DONG, Q. X.; RODENBURG, S. E.; HILL, D.; VANDEVOORT, C. A. The role of low-density (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 459-464, 2011.

DONG, Q.; RODENBURG, S. E.; HUANG, C.; VANDEVOORT, C. A. Cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) epididymal spermatozoa before and after refrigerated storage. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 3, p. 283-292, 2008a.

DONG, Q.; RODENBURG, S. E.; HUANG, C.; VANDEVOORT, C. A. Effect of pre-freezing conditions on semen cryopreservation in rhesus monkeys. **Theriogenology**, v. 70, p. 61-69, 2008b.

DONG, Q.; VANDEVOORT, C. A. Effect of egg yolk on cryopreservation of rhesus monkey ejaculated and epididymal sperm. **Journal of Andrology**, v. 30, n. 3, p. 309-316, 2009.

ENGEL, S.; WEBER, H.; PETZOLDT, R.; SEIDL, B.; WIEHE, W.; SPERL, J. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. **Andrologia**, v. 33, p. 223-230, 2001.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

EVENSON, D. P.; EMERICK, R. J.; JOST, L. K.; KAYONGO-MALE, H.; STEWART, S. R. Zinc-silicon interactions influencing sperm chromatin integrity and testicular cell development in the rat as measured by flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 955-962, 1993.

EVENSON, D. P.; LARSON, K. L. JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 25-43, 2002.

EVENSON, D. P.; THOMPSON, L.; JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, v. 41, p. 637-651, 1994.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v. 22, p. 169-189, 2000.

FERADIS, A. H.; PAWITRI, D.; SUATHA, I. K.; AMIN, M. R.; YUSUF, T. L.; SAJUTHI, D.; BUDIARSA, I. N.; HAYES, E. S. Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Medical Primatology**, v. 30, p. 100-106, 2001.

FERNANDEZ-DUQUE, E.; WALLACE, R. B.; RYLANDS, A. B. *Alouatta caraya*. In: IUCN 2014. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2014.3. 2008. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 07 abr. 2015.

FLORES-HERRERA, H.; ACUÑA-HERNÁNDEZ, D. G.; RIVERA-REBOLLEDO, J. A.; GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, M. A.; RODAS-MARTÍNEZ, A. Z.; SWANSON, W. F. Effect of increasing trypsin concentrations on seminal coagulum dissolution and sperm parameters in spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). **Theriogenology**, v. 78, p. 612-619, 2012.

FLORMAN, H. M.; DUCIBELLA, T. Fertilization in mammals. In: NEILL, J. D. (Ed.). **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3. ed. Saint Louis: Elsevier Academic Press, 2006. p. 55-112.

FORTMAN, J. D.; HEWETT, T. A.; BENNETT, B. T. **The laboratory nonhuman primate**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2002. 259 p.

FOSTER, W. G.; MCMAHON, A.; RICE, D. C.; Sperm chromatin structure is altered in cynomolgus monkeys with environmentally relevant blood lead levels. **Toxicology and Industrial Health**, v. 12, n. 5, p. 723-735, 1996.

FUSSEL, E. N.; ROUSSEL, J. D.; AUSTIN, C. R. Use of the rectal probe method for electrical ejaculation of apes, monkeys and a prosimian. **Laboratory Animal Care**, v. 17, n. 5, p. 528-530, 1967.

GAGLIARDI, C.; MYERS, L.; KUBISCH, H. M. Post thaw survival of rhesus macaque sperm: variation in the response of individual males to different freezing protocols. **American Journal of Primatology**, v. 70, p. 1093-1096, 2008.

GAO, D. Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L. E.; WATSON, P. F.; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, P. CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**, v. 10, n. 5, p. 1109-1122, 1995.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 97-110.

GILCHRIST, R. B.; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Maturation, fertilization, and development of marmoset monkey oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 238-246, 1997.

GLIOZZI, T. M.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; LUZI, F.; MAERTENS, L.; CEROLINI, S. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. **Theriogenology**, v. 71, p. 910-919, 2009.

GÓES, P. A. A. **Dosagem dos níveis anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio**. 2008. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOFF, K.; LIUKKONEN, J.; KUBISCH, H. M. Postmortem recovery and cryopreservation of spermatozoa from the vas deferens of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Theriogenology**, v. 72, p. 834-840, 2009.

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

GOULD, K. G.; YOUNG, L. G. Acquisition of fertilizing capacity by chimpanzee sperm. **Folia Primatologica**, v. 54, n. 1-2, p.105-108, 1990.

GRANADOS, M. D. G.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L. E.; AGUILAR, A. C.; CERDA-MOLINA, A. L.; PÉREZ-RAMÍREZ, O.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Effect of photoperiod on characteristics of semen obtained by electroejaculation in stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*). **Primates**, v. 55, p. 393-401, 2014.

GREER, W. E.; ROUSSEL, J. D.; AUSTIN, C. R. Prevention of coagulum in monkey semen by surgery. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 15, p. 153-155, 1968.

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

GROVES, C. P. Order Primates. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Ed.). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. p. 111-184.

GRUBB, P.; BUTYNSKI, T. M.; OATES, J. F.; BEARDER, S. K.; DISOTELL, T. R.; GROVES, C. P.; STRUHSAKER, T. T. Assessment of the diversity of African Primates. **International Journal of Primatology**, v. 24, n. 6, p. 1301-1357, 2003.

GRUPEN, C. G.; SCOTT, S. J.; GILCHRIST, R. B. Effects of animal pairing on marmoset sperm collected by penile vibratory stimulation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 263, 2004. Supplement SBR Abstracts, abst. 263.

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

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004a. p. 13-29.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Folículo-gênese, maturação ovocitária e ovulação. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004b. p. 69-82.

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

HATAMOTO, L. K.; BATISTA SOBRINHO, C. A.; NICHI, M.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, p. 1610-1614, 2006.

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

HENRIQUE, P. C.; CARVALHO, F. M.; ARAKAKI, P. R.; LOPEZ, R. P. G.; VALLE, R. R. Colheita e análise de sêmen de mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*). In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANIMAIS SELVAGENS (ABRAVAS), 16.; ENCONTRO DA ABRAVAS, 22., 2013, Salvador. **Anais...** Salvador: ABRAVAS, 2013. p. 228.

HENRIQUE, P. C.; CARVALHO, F. M.; LOPEZ, R. P. G.; VALLE, R. R. Cryopreservation of semen from captive Golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*). In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS CONFERENCE, 46., 2014, Orlando. **Proceedings...** Orlando: American Association of Zoo Veterinarians, 2014. p.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; CERDA-MOLINA, A. L.; PÁEZ-PONCE, L. D.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Seasonal emission of seminal coagulum and *in vivo* sperm dynamics in the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **Theriogenology**, v. 69, n. 4, p. 466-472, 2008.

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

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

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; UMLAND, N.; MONDRAGON-CEBALLOS, R.; NAYUDU, P. L. Comparison of the effects of Percoll and PureSperm® on the common marmoset (*Callithrix jacchus*) semen. **Journal of Medical Primatology**, v. 34, p. 86-90, 2005.

HERNDON, J. G.; ELVIRA, M. C. R.; TURNER, J. J.; COLLINS, D. C. Resumption of seasonal breeding patterns in male and female rhesus monkeys transferred from an indoor to an outdoor environment. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 733-744, 1985.

HIYAOKA, A.; CHO, F. A method for collecting semen by fingers in the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) and properties of semen collected. **Jikken Dobutsu**, v. 39, n. 1, p. 121-124, 1990.

HOLT, W. V.; PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 143-150, 1999.

HORST, G. V. D.; SEIER, J. V.; SPINKS, A. C.; HENDRICKS, S. The maturation of sperm motility in the epididymis and vas deferens of the vervet monkey, *Cercopithecus aethiops*. **International Journal of Andrology**, v. 11, p. 197-207, 1999.

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

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

INTERAGENCY TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM (ITIS). **Simiiformes**. 2015. Disponível em: <www.itis.gov>. Acesso em: 6 abr. 2015.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **IUCN red list of threatened species**. Version 2014.3. 2014. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 07 abr. 2015.

ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; SANCHEZ, R.; KATLOV, I. I.; KREINBERG, R. Cryopreservation of spermatozoa. In: DONNEZ, J.; KIM, S. S. (Ed.). **Principles and practice of fertility preservation**. New York: Cambridge University Press, 2011. chap. 14, p. 176-198.

JEONG, Y. J.; KIM, M. K.; SONG, H. J.; KANG, E. J.; OCK, S. A.; KUMAR, B. M. Effect of α -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. **Cryobiology**, v. 58, p. 181-189, 2009.

KALLA, N. R.; STEINER, M.; WEINBAUER, G.; ROVAN, E.; FOO, J.; HURKADLI, K. S.; SHETH, A. R.; FRICK, J. Ultrastructure of monkey (*Macaca radiata*) spermatozoa: effect of gossypol in vivo. **Urological Research**, v. 14, p. 247-252, 1986.

KASIMANICKAM, R.; PELZER, K. D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W. S.; THATCHER, C. D. Association of classical semen parameters, sperm DNA

fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v. 65, n. 7, p. 1407-1421, 2006.

KATO, M.; MAKINO, S.; KIMURA, H.; OTA, T.; FURUASHI, T.; NAGAMURA, Y. Evaluation of mitochondrial function and membrane integrity by dual fluorescent staining for assessment of semen status in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 27, n.1, p.11-18, 2002.

KAWASE, O.; CAO, S.; XUAN, X. Sperm membrane proteome in wild Japanese macaque (*Macaca fuscata*) and Sika deer (*Cervus nippon*). **Theriogenology**, v. 83, p. 95-102, 2015.

KIM, S. H.; YU, D. H.; KIM, Y. J. Apoptosis-like changes, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 106-114, 2010.

KINGER, S.; PAL, P. C.; RAJALAKSHMI, M.; KUMAR, P. K. S.; SHARMA, D. N.; BAJAJ, J. S. Effects of testosterone buciclate on testicular and epididymal sperm functions in bonnet monkeys (*Macaca radiata*). **Contraception**, v. 52, p. 121-127, 1995.

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

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

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

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, n. 3, p. 149-154, 2000.

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

Paulo, 2011. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

KUGELMEIER, T.; VALLE, R. R.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; MUNIZ, J. A. P. C.; MONTEIRO, F. O. B.; OLIVEIRA, C. A. Tracking the ovarian cycle in black-and-gold howlers (*Alouatta caraya*) by measuring fecal steroids and observing vaginal bleeding. **International Journal of Primatology**, v. 32, p. 605-615, 2011.

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

LANG, K. C. **Primate factsheets**: Rhesus macaque (*Macaca mulatta*) taxonomy, morphology, and ecology. 2005. Disponível em: <pin.primate.wisc.edu/factsheets/entry/rhesus_macaque>. Acesso em: 08 abr. 2015.

LANZENDORF, S. E.; GLIESSMAN, P. M.; ARCHIBONG, A. E.; ALEXANDER, M.; WOLF, D. P. Collection and quality of rhesus monkey semen. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, p. 61–66, 1990.

LANZENDORF, S. E.; ZELINSKI-WOOTEN, M. B.; STOUFFER, R. L.; WOLF, D. P. Maturity at collection and the developmental potential of rhesus monkey oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 703-711, 1990.

LEÃO, D. L.; MIRANDA, S. A.; BRITO, A. B.; LIMA, J. S.; SANTOS, R. R.; DOMINGUES, S. F. S. Efficacious long-term cooling and freezing of *Sapajus apella* semen in ACP-118®. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 118-123, 2015.

LEE, H. L.; KIM, S. H.; JI, D. B.; KIM, Y. J. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results from cryopreserved bovine semen. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 249-255, 2009.

LEIBO, S. P.; KUBISCH, H. M.; SCHRAMM, R. D.; HARRISON, R. M.; VANDEVOORT, C. A. Male-to-male differences in post-thaw motility of rhesus spermatozoa after cryopreservation of replicate ejaculates. **Journal of Medical Primatology**, v. 36, p. 151-163, 2007.

LEIBO, S. P.; PICTON, H. M.; GOSDEN, R. G. Cryopreservation of human spermatozoa. In: VAYENA, E. (Ed.). **Current practices and controversies in assisted reproduction**. Geneva: World Health Organization, 2001. p. 152-165.

LEVERAGE, W. E.; VALERIO, D. A.; SCHULTZ, A. P.; KINGSBURY, E.; DOREY, C. Comparative study on the freeze preservation of spermatozoa, primate, bovine, and human. **Laboratory Animal Science**, v. 22, n. 6, p. 882-889, 1972.

LEWIN, L. M.; GOLAN, R.; FREIDLIN, P.; SHOCHAT, L. A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 133-137, 1999.

LI, Y.; CAI, K.; LI, J.; DINNYES, A.; JI, W. Comparative studies with six extenders for sperm cryopreservation in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) and rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **American Journal of Primatology**, v. 68, p. 39-49, 2006.

LI, X.; GAO, D.; JI, W. Cryopreservation of sperm of an endangered species: Assamese macaque. **Cell Preservation Technology**, v. 2, n. 1, p. 29-33, 2004.

LI, Y. H.; CAI, K. J.; KOVACS, A.; JI, W. Z. Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 3, p. 387-395, 2005a.

LI, Y. H.; CAI, K. J.; SU, L.; GUAN, M. HE X. C.; WANG, H.; KOVACS, A.; JI, W. Z. Cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa in a chemically defined extender. **Asian Journal of Andrology**, v. 7, n. 2, p. 139-144, 2005b.

LOHIYA, N. K.; ANSARI, A. S.; BARCELLONA, P. S. Antispermatozoal effects of toluidamine in langur (*Presbytis entellus*). **Contraception**, v. 43, n. 5, p. 485-496, 1991.

LOHIYA, N. K.; MANIVANNAN, B.; GOYAL, S.; ANSARI, A. S. Sperm motility inhibitory effect of the benzene chromatographic fraction of the chloroform extract of the seeds of *Carica papaya* in langur monkey, *Presbytis entellus entellus*. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, n. 2, p. 298-306, 2008.

LOHIYA, N. K.; MANIVANNAN, B.; MISHRA, P. K. Ultrastructural changes in the spermatozoa of langur monkeys *Presbytis entellus entellus* after vas occlusion with styrene maleic anhydride. **Contraception**, v. 57, p. 125-132, 1998.

LUETJENS, C. M.; WEINBAUER, G. F. Functional assessment of sexual maturity in male macaques (*Macaca fascicularis*). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, p. 391-400, 2012.

LUIS, P. L. J.; SOTOLONGO, C. M.; RAMÓN, D.; DURAN, M. J.; MARTÍNEZ, N. D.; MAYRA, M. P.; MIGUEL, R. J.; MONSANTO, P. A.; OSMANY, Q.; LEONARDO, C. Evaluation of semen obtained by electroejaculation in nonhuman primates anubis baboon (*Papio anubis*) held at the national zoo Cuba. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 10, n. 10, p. 1-12, 2009.

LUTZ, C. K.; NOVAK, M. A. Primate natural history and social behavior: implications for laboratory housing. In: WOLFE-COOTE, S. **The laboratory primate**. Londres: Elsevier, 2005. p. 133-142.

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Review article: Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-13, 2011.

MAHADEVAN, M. M.; TROUNSON, A. O. The influence of seminal characteristics on the success rate of human *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 42, p. 400-405, 1984.

MAHONY, M. C.; LANZENDORF, S.; GORDON, K.; HODGEN, G. D. Effects of caffeine and dbcAMP on zona pelucida penetration by epididymal spermatozoa of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 530-535, 1996.

MAHONY, M. C.; OEHNINGER, S.; DONCEL, G.; MORSHEDI, M.; ACOSTA, A.; HODGEN, G. D. Functional and morphological features of spermatozoa microaspirated from epididymal regions of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 613-620, 1993.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; SICHERLE, C. C.; RODELLO, L.; GALLEGOS, I. C. S. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen

cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 118-123, 2010.

MARQUES, A. A. B.; FONTANA, C. S.; VÉLEZ, E.; BENCKE, G. A.; SCHNEIDER, M.; REIS, R. E. **Lista das espécies da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. Decreto no. 41.672, de 11 de junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGEA, 2002. 52 p. (Publicações Avulsas FZB, 11).

MARSON, J.; GERVAIS, D.; MEURIS, S.; COOPER, R. W.; JOUANNET, P. Influence of ejaculation frequency on semen characteristics in chimpanzees (*Pan troglodytes*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 43-50, 1989.

MARSON, J.; MEURIS, S.; MOYSAN, F.; GERVAIS, D.; COOPER, R. W.; JOUANNET, P. Cellular and biochemical characteristics of semen obtained from pubertal chimpanzees by masturbation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 199-207, 1988.

MARTORANA, K.; KLOOSTER, K.; MEYERS, S. Suprazero cooling rate, rather than freezing rate, determines post thaw quality of rhesus macaque sperm. **Theriogenology**, v. 81, p. 381-388, 2014.

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

MASTROIANNI Jr., L.; MANSON Jr., W. A. Collection of monkey semen by electroejaculation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 112, n. 4, p. 1025-1027, 1963.

MATSON, P.; KAPELLE, W.; MALECKI, I. The use of a hypo-osmotic swelling (HOS) test on sperm of the pig (*Sus scrofa domesticus*), emu (*Dromaius novaehollandiae*), Asian elephant (*Elaphus maximus*), hamadryas baboon (*Papio hamadryas hamadryas*), and central rock rat (*Zyomys pedunculatus*). **Reproductive Biology**, v. 9, n. 2, p. 181-187, 2009.

MAYER, D. T.; SQUIERS, C. D.; BOGART, R.; OLOUFA, M. M. The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. **Journal of Animal Science**, v. 10, p. 226-235, 1951.

MCCARTHY, M. J.; BAUMBER, J.; KASS, P. H.; MEYERS, S. A. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 644-651, 2010.

MCCARTHY, M. J.; MEYERS, S. A. Antioxidant treatment in the absence of exogenous lipids and proteins protects rhesus macaque sperm from cryopreservation-induced cell membrane damage. **Theriogenology**, v. 76, p. 168-176, 2011.

MENG, L.; WOLF, D. P. Sperm-induced oocyte activation in the rhesus monkey: nuclear and cytoplasmic changes following intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 12, n. 5, p. 1062-1068, 1997.

MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; SARATSIS, P.; BOSCO, C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 204-212, 2007.

MIKICH, S. B.; BÉRNILS, R. S. **Livro vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná**. 2004. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/iap>>. Acesso em: 28 abr. 2016.

MINAEI, M. B.; BARBARESTANI, M.; NEKOONAM, S.; ABDOLVAHABI, M. A.; TAKZARE, N.; ASADI, M. H.; HEDAYATPOUR, A.; AMIDI, F. Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. **Iran Journal of Reproductive Medicine**, v. 10, n. 2, p. 99-104, 2012.

MISHRA, P. K.; MANIVANNAN, B.; PATHAK, N.; SRIRAM, S.; BHANDE, S. S.; PANNEERDOSS, S.; LOHIYA, N. K. Status of spermatogenesis and sperm parameters in langur monkeys following long-term vas occlusion with styrene maleic anhydride. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 501-509, 2003.

MITTERMEIER, R. A.; WALLIS, J.; RYLANDS, A. B.; GANZHORN, J. U.; OATES, J. F.; WILLIAMSON, E. A.; PALACIOS, E.; HEYMANN, E. W.; KIERULFF, M. C. M.; LONG YONGCHENG, SUPRIATNA, J.; ROOS, C.; WALKER, S.; CORTÉS-ORTIZ, L.; SCHWITZER, C. (Ed.). **Primates in peril: the world's 25 most endangered primates 2008–2010**. Arlington, VA.: IUCN/SSC Primate Specialist Group (PSG), International Primatological Society (IPS), and Conservation International (CI), 2009. 84 p.

MOLLER, A. P. Ejaculate quality, testes size and sperm competition in primates. **Journal of Human Evolution**, v. 17, p. 479-488, 1988.

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

MORICHIKA, J.; IWATANI, C.; TSUCHIYA, H.; NAKAMURA, S.; SANKAI, T.; TORII, R. Triplet pregnancy in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) after double embryo transfer. **Comparative Medicine**, v. 62, n. 1, p. 69-72, 2012.

MORRELL, J. M.; HODGES, J. K. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. Review. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1-4, p. 43-63, 1998.

MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A. M.; HAMMAR, L.; SANDEBERT, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 2, 2008. doi: 10.1186/1751-0147-50-2. Disponível em: < <http://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0147-50-2>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

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

MORTE, M. I.; RODRIGUES, A. M.; SOARES, D.; RODRIGUES, A. S.; GAMBOA, S.; RAMALHO-SAANTOS, J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 36-47, 2008.

MOTTA, E. L. A.; NICHI, M.; SERAFINI, P. C. State of the art assisted human reproduction. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 47-55, 2011. Supplement.

NASCIMENTO, J. M.; SHI, L. Z.; MEYERS, S.; GAGNEUX, P.; LOSKUTOFF, N. M.; BOTVINICK, E. L.; BERNS, M. W. The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5 p. 297-302, 2008.

NASIRI, A. H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, v. 44, p. 550-555, 2012. Supplement 1.

NG, S. C.; MARTINELLI, P.; LIOW, S. L.; HERBERT, S.; OH, S. H. Intracytoplasmic sperm injection of frozen-thawed epididymal spermatozoa in a nonhuman primate model, the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). **Theriogenology**, v. 58, p. 1385-1397, 2002.

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**. 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

NYACHIEO, A.; SPIESSENS, C.; CHAI, D. C.; KIULIA, N. M.; MWENDA, J. M.; D'HOOGE, T. M. Separate and combined effects of caffeine and dbcAMP on olive baboon (*Papio anubis*) sperm. **Journal of Medical Primatology**, v. 39, p. 137-142, 2010.

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

O'BRIEN, J. K.; STOJANOV, T.; CRICHTON, E. G.; EVANS, K. M.; LEIGH, D.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; LOSKUTOFF, N. M. Flow cytometric sorting of fresh and frozen-thawed spermatozoa in the Western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). **American Journal of Primatology**, v. 66, p. 297-315, 2005.

O'BRIEN, J. K.; STOJANOV, T.; HEFFERNAN, S. J.; HOLLINSHEAD, F. K.; VOGELNEST, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Flow cytometric sorting of non-human primate sperm nuclei. **Theriogenology**, v. 63, p. 246-259, 2005.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OKADA, A.; IGARASHI, H.; KURODA, M.; TERAOKA, K.; YOSHIKAWA, Y.; SANKAI, T. Cryopreservation-induced acrosomal vesiculation in live spermatozoa from

cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Human Reproduction**, v. 16, n. 10, p. 2139-2147, 2001.

OKLANDER, L. I.; KOWALEWSKI, M.; CORACH, D. Male reproductive strategies in black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*). **American Journal of Primatology**, v. 76, p. 43-55, 2014.

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

OLIVEIRA, K. G.; LEÃO, D. L.; ALMEIDA, D. V. C.; SANTOS, R. R.; DOMINGUES, S. F. S. Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey, *Saimiri collinsi*. **Theriogenology**, v. 84, p. 743-749, 2015.

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

OLLERO, M.; POWERS, R. D.; ALVAREZ, J. G. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. **Molecular Reproduction Development**, v. 55, n. 3, p. 326–334, 2000.

OUHIBI, N.; ZELINSKI-WOOTEN, M. B.; THOMSON, J. A.; WOLF, D. P. Assisted fertilization and nuclear transfer in nonhuman primates. In: WOLF D. P.; ZELINSKI-WOOTEN, M. (Ed.). **Assisted fertilization and nuclear transfer in mammals**. Totowa: Humana Press, 2001. p. 253–284.

PARKER, G. A. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In: BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, A. P. (Ed.). **Sperm competition and sexual selection**. Londres: Academic Press, 1998. p. 3-54.

PARKER, G. A. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. **Biological Reviews**, v. 45, p. 525-567, 1970.

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

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

PERCEQUILLO, A. R.; KIERULFF, M. C. M. Mamíferos. In: BRESSAN, P. M.; KIERULFF, M. C. M. (Coord.). **Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: vertebrados**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio ambiente, 2009. p. 31-85.

PIPAN, M. Z.; MRKUN, J.; KOSEC, M.; SVETE, A. N.; ZRIMSEK, P. Superoxide dismutase: a predicting factor for boar semen characteristics for short-term preservation. **Biomedical Research International**, v. 2014, n. 2, p. ID 105280, 2014. Disponível em: < <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/105280/>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

PLATZ, C. C.; WILDT, D. E.; BRIDGES, C. H.; SEAGER, S. W.; WHITLOCK, B. S. Electroejaculation and semen analysis in a male lowland gorilla, *Gorilla gorilla gorilla*. **Primates**, v. 21, n. 1, p. 130-132, 1980.

POCHES, R. A. **Efecto del estrés sobre la calidad seminal del tití gris (*Saguinus leucopus*) bajo condiciones de cautiverio**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2012.

POCHES, R. A.; BRIEVA, C. I.; JIMÉNEZ, C. Características seminais del tití gris (*Saguinus leucopus*) bajo condiciones de cautiverio obtenidas por estimulación vibratoria del pene (EVP). **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 11-22, 2013.

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

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

PRIMATE SPECIALIST GROUP (PSG), 2014. Disponível em: <www.primatesg.org/primate_diversity_by_region/>. Acesso em: 28 abr. 2016.

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

RAMESH, V.; RAMACHANDRA, G.; KRISHNAMURTHY, H. N.; RAO, J. Electroejaculation and seminal parameters in bonnet monkeys (*Macaca radiata*). **Andrologia**, v. 30, p. 97-100, 1998.

REZNICHECK, R. C.; ROUSSEL, J. D.; MANGELSON, N. L.; KADO, R. T.; COCKETT, A. T. K. Some morphologic and biochemical observations of semen in nemestrina monkeys destined for space flight. **Fertility and Sterility**, v. 19, n. 3, p. 376-381, 1968.

ROTH, T. L. Gamete biotechnology for assisting reproduction in endangered species. In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS CONFERENCE, 26., 1993, Saint Louis. **Proceedings...** Saint Louis: American Association of Zoo Veterinarians, 1993. p. 240-243.

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

ROUSSEL, J. D.; AUSTIN, C. R. Enzymic liquefaction of primate semen. **International Journal of Fertility**, v. 12, p. 280, 1967a.

ROUSSEL, J. D.; AUSTIN, C. R. Preservation of primate spermatozoa by freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 13, p. 333-335, 1967b.

ROYERE, D.; BARTHELEMY, C.; HAMAMAH, S.; LANSAC, J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 6, p. 553-559, 1996.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. The diversity of the New World primates (Platyrrhini): an annotated Taxonomy. In: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; BICCA-MARQUES, J. C.; HEYMANN, E. W. (Ed.). **South American primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation**. New York: Springer, 2009. pt. 2, cap. 2, p. 23-54.

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

SÁNCHEZ-PARTIDA, L. G.; MAGINNIS, G.; DOMINKO, T.; MARTINOVICH, C.; MCVAY, B.; FANTON, J.; SCHATTEN, G. Live rhesus offspring by artificial insemination using fresh sperm and cryopreserved sperm. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1092-1097, 2000.

SANKAI, T.; TSUCHIYA, H.; OGONUKI, N.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y. A trial of oocyte maturation and in vitro fertilization by frozen-thawed spermatozoa in the red-bellied tamarin (*Saguinus labiatus*). **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 14, p. 205-208, 1997.

SARASON, R. L.; VANDEVOORT, C. A.; MADER, D. R.; OVERSTREET, J. W. The use of nonmetal electrodes in electroejaculation of restrained but unanesthetized macaques. **Journal of Medical Primatology**, v. 20, n. 3, p. 122-125, 1991.

SCHAFFER, N. E.; CRANFIELD, M.; FAZLEABAS, A. T.; JEYENDRAN, R. S. Viable spermatozoa in the bladder after electroejaculation of lion-tailed macaques (*Macaca silenus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, p. 767-770, 1989a.

SCHAFFER, N.; CRANFIELD, M.; MEEHAN, T.; KEMPESKE, S. Semen collection and analysis in the conservation of endangered nonhuman primates. **Zoo Biology Supplement**, v. 1, p. 47-60, 1989b.

SCHAFFER, N. E.; JEYENDRAN, R. S.; BEEHLER, B. Improved sperm collection from lowland gorilla: recovery of sperm from bladder and urethra following electroejaculation. **American Journal of Primatology**, v. 24, n. 3-4, p. 265-271, 1991.

SCHAFFER, N. E.; MCCARTHY, T.J.; FAZLEABAS, A. T.; JEYENDRAN, R. S. Assessment of semen quality in a baboon (*Papio anubis*) breeding colony. **Munksgaard**, v. 21, p. 47-48, 1992.

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.

SCHRAMM, R. D.; BAVISTER, B. D. Development of in-vitro-fertilized primate embryos into blastocysts in a chemically defined, protein-free culture medium. **Human Reproduction**, v. 11, n. 8, p. 1690-1697, 1996.

SCHRAMM, R. D.; BAVISTER, B. D. Onset of nucleolar and extranucleolar transcription and expression of fibrillar in macaque embryos developing in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 721-728, 1999.

SCHRAMM, R. D.; PAPROCKI, A. M.; VANDEVOORT, C. A. Causes of developmental failure of in-vitro matured rhesus monkey oocytes: impairments in embryonic genome activation. **Human Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 826-833, 2003.

SEIER, J. V.; FINCHAM, J. E.; MENKVELD, R.; VENTER, F. S. Semen characteristics of vervet monkeys. **Laboratory Animals**, v. 23, p. 43-47, 1989.

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

SHAFFER, H. E.; ALMQUIST, J. O. Vital staining of bovine spermatozoa with eosin-aniline blue staining mixture. **Journal of Dairy Science**, v. 32, p. 723, 1948 (Abstract).

SHANGCHUAN, Y.; WEIZHI, J.; JIANCHUN, C.; ENYUAN, S.; RUJIN, Z. The use of improved penile electroejaculation in rhesus, tibetan and assamese macaques and study on the parameters of their semen. **Zoological Research**, v. 15, n. 1, p. 77-83, 1994

SI, W.; LI, Y.H.; GUAN, M.; JI, W.Z. Cryoprotective effect of four penetrating cryoprotectants on rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa cryopreservation. **Zoological Research**, v. 25, n. 1, p. 32-36, 2004a.

SI, W.; WANG, H.; REID, C.; HILDEBRANDT, T. B.; JI, W. Effect of sugar type on the survival of frozen-thawed rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm. **American Journal of Primatology**, v. 68, p. 103-108, 2006.

SI, W.; LI, Y.; HE, X.; JI, S.; NIU, Y.; TAN, T.; JI, W. Directional freezing as an alternative method for cryopreserving rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1431-1438, 2010.

SI, W.; ZHENG, P.; TANG, X.; HE, X.; WANG, H.; BAVISTER, B. D.; JI, W. Cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa and their functional assessment by *in vitro* fertilization. **Cryobiology**, v. 41, p. 232-240, 2000.

SI, W.; ZHENG, P.; LI, Y.; DINNYES, A.; JI, W. Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm. **American Journal of Primatology**, v. 63, p. 301-306, 2004b.

SILVA, K. M. G.; MORAES, T. A. P.; SILVA, E. C. B.; GAMBOA, S. C.; GUERRA, M. M. P. Efeito da adição de Trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após a descongelação. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 41-49, 2009.

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

SILVA, K. S. M.; RIBEIRO, H. F. L.; VALLE, R. R.; SOUSA, J. S.; SILVA, A. O.; BARBOSA, E. M. Efeitos do trimetilaminoetano (TES) e ringer lactato em sêmen de macacos-aranha mantidos em cativeiro (*Ateles paniscus* e *A. marginatus*). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 934-937, 2013.

SITZMANN, B. D.; LEONE, E. H.; MATTISON, J. A.; INGRAM, D. K.; ROTH, G. S.; URBANSKI, H. F.; ZELINSKI, M. B.; OTTINGER, M. A. Effects of moderate calorie restriction on testosterone production and semen characteristics in young rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 635-640, 2010.

SKERGET, S.; ROSENOW, M.; POLPITYIA, A.; PETRITIS, K.; DORUS, S.; KARR, T. L. The rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 11, p. 3052-3067, 2013.

SOARES, A. T.; SILVA, S. V.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. P. Ultrastructure evaluation of goat spermatozoa after freezing in a skim milk-based extender with Trolox supplementation. **Andrologia**, v. 47, n. 4, p. 470-476, 2015.

SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, v. 63, p. 2063-2072, 2005.

SPARMAN, M. L.; RAMSEY, C. M.; THOMAS, C. M.; MITALIPOV, S. M.; FANTON, J. W.; MAGINNIS, G. M.; STOUFFER, R. L. WOLF, D. P. Evaluation of the vervet (*Chlorocebus aethiops*) as a model for the assisted reproductive technologies. **American Journal of Primatology**, v. 69, p. 1-13, 2007.

SRIVASTAVA, S. Semen profile of langur monkeys pre and post vasectomy and vasovasostomy. **International Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 4, p. 809-817, 2014.

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.

STRIER, K. B.; MENDES, S. L.; SANTOS, R. R. Timing of births in sympatric brown howler monkeys (*Alouatta fusca clamitans*) and northern muriquis (*Brachyteles arachnoides hypoxanthus*). **American Journal of Primatology**, v. 55, n. 2, p. 87-100, 2001.

TAKAHASHI, T.; HASAWA, K.; INOUE, T.; SATO, K.; SEDOHARA, A.; OKAHARA, J.; SUEMIZU, H.; YAGIHASHI, C.; YAMAMOTO, M.; ETO, T.; KONNO, Y.; OKANO, H.; SUEMATSU, M.; SASAKI, E. Birth of healthy offspring following ICSI in in vitro-matured common marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes. **PLOS one**, v. 9, n. 4, p. 1-11, 2014.

THOMSEN, R. Non-invasive collection and analysis of semen in wild macaques. **Primates**, v. 55, p. 231-237, 2014.

THOMSON, J. A.; ILIFF-SIZEMORE, S. A.; GLIESSMAN, P. M.; WOLF, D. P. Collection and fertilization potential of sperm from Sulawesi crested black macaque (*Macaca nigra*). **American Journal of Primatology**, v. 28, n. 4, p. 289-297, 1992.

TIMMINS, R. J.; RICHARDSON, M.; CHHANGANI, A.; YONGCHENG, L. *Macaca mulatta*. In: IUCN 2014. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2014.3. 2008. Disponível em: <www.iucnredlist.org> Acesso em: 07 abr. 2015.

TOLLNER, T. L.; DONG, Q.; VANDEVOORT, C. A. Frozen-thawed rhesus sperm retain normal morphology and highly progressive motility but exhibit sharply reduced efficiency in penetrating cervical mucus and hyaluronic acid gel. **Cryobiology**, v. 62, p. 15-21, 2011.

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

TORII, R.; HOSOI, Y.; MASUDA, Y.; IRITANI, A.; NIGI, H. Birth of the Japanese monkey (*Macaca fuscata*) infant following in-vitro fertilization and embryo transfer. **Primates**, v. 4, n. 1, p. 39-47, 2000.

TORII, R.; NIGI, H. Successful artificial insemination for indoor breeding in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*) and the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). **Primates**, v. 39, n. 4, p. 399-406, 1998.

TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S.; ARDEBILI, R.; DAVACHI, N. D.; NASIRI, A. H. Combined n-3 fatty acids and α -tocopherol supplementation improved the ovine sperm cryosurvival. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 238-243, 2013.

TURNQUIST, J. E.; HONG, N. Functional morphology. In: BENNETT, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. (Ed.). **Nonhuman primates in biomedical research: biology and management**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 49-76.

VALLE, R. R.; VALLE, C. M. R.; NICHI, M.; MUNIZ, J. A. P. C.; NAYUDU, P. L.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Semen characteristics of captive common marmoset (*Callithrix jacchus*): a comparison of a German with a Brazilian colony. **Journal of Medical Primatology**, v. 42, p. 225-230, 2014.

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*). **Theriogenology**, v.70, p. 115-120, 2008.

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

VALLE, R. R.; ARAKAKI, P. R.; CARVALHO, F. M.; MUNIZ, J. A. P. C.; LEAL, C. L. V.; GARCÍA-HERREROS, M. Identification of sperm head subpopulations with defined pleiomorphic characteristics in ejaculate of captive Goeldi's monkeys (*Callimico goeldii*). **Animal Reproduction Science**, v. 137, p. 93-102, 2013a.

VALLE, R. R.; CARVALHO, F. M.; MUNIZ, J. A. P. C.; LEAL, C. L. V.; GARCÍA-HERREROS, M. Differential distribution of sperm subpopulations and incidence of pleiomorphisms in ejaculates of captive howling monkeys (*Alouatta caraya*). **Naturwissenschaften**, v. 100, p. 923-933, 2013b.

VALLE, R. R.; NAYUDU, P. L.; LEAL, C. L. V.; GARCÍA-HERREROS, M. Sperm head morphometry in ejaculates of adult marmosets (*Callithrix jacchus*): a model for studying sperm subpopulations and among-donor variations. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 1152-1165, 2012.

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

VALTONEN-ANDRÉ, C.; OLSSON, A. Y.; NAYUDU, P. L.; LUNDWALL, A. Ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) contain semenogelin and beta-microseminoprotein but not prostate-specific antigen. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 247-255, 2005.

VANDEVOORT, C. A. High quality sperm for nonhuman primate ART: production and assessment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 33, 2004. doi: 10.1186/1477-7827-2-33. Disponível em: <<https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-2-33>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

VANDEVOORT, C. A.; NEVILLE, L. E.; TOLLNER, T. L.; FIELD, L. P. Noninvasive semen collection from an adult orangutan. **Zoo Biology**, v. 12, n. 3, p. 257-265, 1993.

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

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

WARNER, H.; MARTIN, D. E.; KEELING, M. E. Electroejaculation of the great apes. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 2, p. 419-432, 1974.

WEISBROTH, W.; YOUNG, F. A. The collection of primate semen by electroejaculation. **Fertility and Sterility**, v. 16, n. 2, p. 229-235, 1965.

WHITNEY, R. A. Taxonomy. In: BENNET, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. (Ed.). **Nonhuman primates in biomedical research: biology and management**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 33-49.

WILTON, L. J.; MARSHALL, V. S.; PIERCY, E. C.; MOORE, H. D. M. In vitro fertilization and embryo development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 481-486, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. 138 p.

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

WOLF, D. P. Assisted reproductive technologies in rhesus macaques. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 37, 2004. Disponível em: <

<https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-2-37> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

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

WOLF, D. P.; THORMAHLEN, S.; RAMSEY, C.; YEOMAN, R. R.; FANTON, J.; MITALIPOV, S. Use of assisted reproductive technologies in the propagation of rhesus macaques offspring. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 486-493, 2004.

WOLF, D. P.; VANDEVOORT, C. A.; MEYER-HAAS, G.; ZELINSKI-WOOTEN, M.; HESS, D. L.; BAUGHMAN, W. L.; STOUFFER, R. L. In vitro fertilization and embryo transfer in the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 335-346, 1989.

WOLFENSOHN, S.; HONESS, P. **Handbook of primate husbandry and welfare**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2005. 168 p.

WOODS, E.; THIRUMALA, S.; HAN, X.; CRITSER, J. K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. In: DONNEZ, J.; KIM, S. S. (Ed.). **Principles and practice of fertility preservation**. New York: Cambridge University Press, 2011, p. 129-144.

WU, T. W.; HASHIMOTO, N.; AU, J. X.; WU, J.; MICKLE, D. A.; CAREY, D. Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. **Hepatology**, v. 13, n. 3, p. 575-580, 1991.

YANG, S.; PING, S.; JI, S.; LU, Y.; NIU, Y.; WANG, H.; JI, W.; SI, W. The positive effects of seminal plasma during the freezing process on cryosurvival of sperm with poor freezability in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*). **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 6, p. 737-743, 2011a.

YANG, S.; PING, S.; SI, W.; HE, X.; WANG, X.; LU, Y.; JI, S.; NIU, Y.; JI, W. Optimization of ethylene glycol concentrations, freezing rates and holding times in liquid nitrogen vapor for cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 6, p. 717-723, 2011b.

YEOMAN, R. R.; GERAMI-NAINI, B.; MITALIPOV, S.; NUSSER, K. D.; WIDMANN, A. A.; WOLF, D. P. Reduced fertilization after ICSI with frozen/thawed sperm in rhesus macaques. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 319, 2000. Supplement 1.

YEOMAN, R. R.; MITALIPOV, S.; GERAMI-NAINI, B.; NUSSER, K. D.; WOLF, D. P. Low temperature storage of rhesus monkey spermatozoa and fertility evaluation by intracytoplasmic injection. **Theriogenology**, v. 63, p. 2356-2371, 2005.

YEOMAN, R. R.; RICKER, R. B.; HOSSAIN, A. M.; ABEE, C. R. Cryopreservation of spermatozoa from squirrel monkeys. **American Journal of Primatology**, v. 42, p. 157, 1997a.

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

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

YEUNG, C. H.; WEINBAUER, G. F.; NIESCHLAG, E. Movement characteristics of ejaculated sperm from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) analyzed by manual and automated computerized image analysis. **Journal of Medical Primatology**, v. 18, n. 1, p. 56-68, 1989.

YEUNG, C. H.; MORRELL, J. M.; COOPER, T. G.; WEINBAUER, G. F.; HODGES, J. K.; NIESCHLAG, E. Maturation of sperm motility in the epididymis of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). **International Journal of Andrology**, v. 19, p. 113-121, 1996

YOUNG, L. G.; SMITHWICK, E. B.; GOULD, K. G. Characteristics of chimpanzee (*Pan troglodytes*) ejaculates collected by rectal probe electrostimulation and by artificial vagina. **American Journal of Primatology**, v. 35, n. 4, p. 293-304, 1995.

ZAMBONI, L.; CONWAY, C. H.; PELT, L. V. Seasonal changes in production of semen in free-ranging rhesus monkeys. **Biology of Reproduction**, v. 11, p. 251-267, 1974.

ZELEZNIK, A. J.; POHL, C. R. Control of follicular development, corpus luteum function, the maternal recognition of pregnancy, and the neuroendocrine regulation of

the menstrual cycle in higher primates. In: NEILL, J. D. (Ed.). **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3. ed. Saint Louis: Elsevier Academic Press, 2006. p. 2449-2510.

ZELINSKI-WOOTEN, M. B.; HUTCHISON, J. S.; HESS, D. L.; WOLF, D. P.; STOUFFER, R. L. Follicle stimulating hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated monkeys. **Human Reproduction**, v. 10, n. 7, p. 1658-1666, 1995.

APÊNDICE A - Composição das soluções utilizadas para o SCSA adaptado

Solução Tampão TNE (pH 7,4)			
Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
Tris-HCl	Fluka	93363	0,01 M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15 M
EDTA	Sigma	E-5134	1 mM
Água destilada (q.s.p.)	-	-	500 ml

Solução detergente ácida (pH 1,2)			
Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
HCl	Merck	K24537117	0,08 M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15 M
Triton x-100	Sigma	X-100	0,1% (v/v)
Água destilada (q.s.p.)	-	-	500 ml

Solução de Laranja de Acridina – estoque			
Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
Laranja de Acridina	Sigma	A-6014	1 mg/ml
Água destilada (q.s.p.)	-	-	10 ml

Solução de Laranja de Acridina – Uso			
Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
Ácido cítrico	Sigma	0,12	0,1 M
Na ₂ HPO ₄	Sigma	S-5136	0,2 M
EDTA	Sigma	E-5134	0,001 M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15 M
Laranja de Acridina - estoque	-	-	6 µg/ml
Água destilada (q.s.p.)	-	-	120 ml

APÊNDICE B - Meio TALP-Hepes

Para preparo do meio TALP-Hepes, deve-se adicionar cada ingrediente na ordem e quantidade indicada no Quadro 1.

Quadro 1 – Ingredientes para preparo do meio TALP-Hepes. Receita utilizada no ART Core do Oregon National Primate Research Center, Beaverton, Oregon, EUA.

Componente	Catalog #	Quantidade	Quantidade
NaCl (Cloreto de Sódio)	S-5886 (Sigma)	6,660 g	13,320 g
KCl (Cloreto de Potássio)	P-5405 (Sigma)	0,239 g	0,478 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Cloreto de Cálcio Dihidratado)	C-7902 (Sigma)	0,294 g	0,588 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Cloreto de Magnésio Hexahidratado)	M-0250 (Sigma)	0,102 g	0,204 g
Na ₂ HPO ₄ (Fosfato de Sódio)	S-5136 (Sigma)	0,048 g	0,096 g
Glicose	G-6152 (Sigma)	0,900 g	1,800 g
Na Lactate (Ácido láctico)	L-7900 (Sigma)	1,870 ml	3,740 g
Phenol Red	P-3532 (Sigma)	0,010 g	0,020 g
NaHCO ₃ (Bicarbonato de Sódio)	S-5761 (Sigma)	0,168 g	0,336 g
Sulfato de gentamicina	G-1264 (Sigma)	0,050 g	0,100 g
Hepes	H-6147 (Sigma)	2,603 g	5,206 g
Na Pyruvate	P-4562 (Sigma)	0,060 g	0,120 g
Água Milli Q Q.S.P.	-	1 L	2 L
pH	-	7.3-7.5	
Osmolalidade	-	275-290	

Após a homogeneização do meio, deve-se verificar o pH (7,3-7,5) e a osmolalidade (285-295). Se necessário ajustar o pH, deve-se utilizar solução de

NaOH para aumentar o pH ou solução de HCl para diminuir o pH. Se a osmolalidade estiver acima ou abaixo do recomendado, deve-se descartar o meio. Quando o meio estiver pronto, deve ser filtrado em filtro Nalgene de 0,2 μm para 1000 ml³³ antes de ser armazenado. Este meio é estável por um mês em geladeira a 4°C.

Antes do uso, deve-se adicionar Albumina Sérica Bovina (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) na concentração de 3 mg/ml. Após adição do BSA, a solução deve ser filtrada novamente, com filtro Nalgene de 0,2 μm de volume variável de acordo com o volume a ser preparado.

³³ Catalog #154-0020, Thermo Fisher Scientific, Inc.- Waltham, Massachusetts, USA

APÊNDICE C - TEST-gema de ovo

Protocolo de Dong et al. (2008b) adaptado a partir de Tollner et al. (1990)

Para preparo do diluidor, devem-se misturar todos os ingredientes vigorosamente, enquanto esquentam-se a solução gradualmente até atingir 60°C. Na sequência, a solução deve ser resfriada até atingir a temperatura ambiente e centrifugada a 800 g por 3 h de forma a sedimentar os grânulos de gema de ovo, que poderiam interferir com a análise do sêmen. A osmolalidade do diluidor gira em torno de 350 mOsm/kg e o pH deve ser ajustado para 7,4. O diluidor pronto deve ser aliqotado e armazenado em freezer a -80°C até o momento do uso.

Para esse trabalho, o diluidor foi descongelado brevemente e separam-se as frações 1 e 2. À fração 2, adicionou-se 6% de glicerol (v/v). As frações foram divididas em alíquotas de 1 ml, congeladas novamente e mantidas a -80°C até o momento do uso. No dia da colheita, momentos antes do uso, as alíquotas eram descongeladas a 37°C e mantidas à temperatura ambiente até o momento da diluição do sêmen.

Quadro 1 – Ingredientes para o preparo do diluidor utilizado no California National Primate Research Center para criopreservação de sêmen de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*). Todos os componentes utilizados são da Sigma-Aldrich.

Componente	Quantidade
TES	43,25 g
Tris	10,265 g
Glicose	10 g
Penicilina G	0,015 g
Sulfato de Estreptomicina	0,025 g
Gema de ovo (v/v)	20%
Água Milli Q q.s.p.	1000 ml

APÊNDICE D - Meio TALP complete

1. Meio TALP

Para preparo do meio TALP, deve-se inicialmente preparar as soluções estoque, conforme indicado no Quadro 6. Essas soluções são estáveis por 3 meses em geladeira a 4°C, a partir da data do preparo.

Quadro 1 – Ingredientes para preparo das soluções estoques utilizadas no preparo do meio TALP. Receita utilizada no ART Core do Oregon National Primate Research Center, Beaverton, Oregon, EUA.

Solução Estoque	Concentração	g/ml de Água Milli Q
NaCl (Cloreto de sódio)	157 mM	9.2 g/1000 ml
KCl (Cloreto de potássio)	166 mM	2,48 g/200 ml (12,4 g/1000 ml)
CaCl ₂ -2H ₂ O (Cloreto de Cálcio Dihidratado)	120 mM	3,52 g/200 ml (17,6 g/1000 ml)
MgCl ₂ -6H ₂ O (Cloreto de Magnésio Hexahidratado)	120 mM	4,88 g/200 ml (24,4 g/1000 ml)
Glicose	295 mM	26,55 g/500 ml (53,1 g/1000 ml)
NaHCO ₃ (Bicarbonato de Sódio)	167 mM	2,8 g/200 ml (14,0 g/1000 ml)

Após o preparo das soluções estoque, deve-se prosseguir com o preparo do meio TALP. Para tanto, deve-se adicionar cada ingrediente na ordem e quantidade indicada no Quadro 7. Após a homogeneização do meio, deve-se verificar o pH (7,3-7,5) e a osmolalidade (285-295). Se necessário ajustar o pH, deve-se utilizar solução de NaOH para aumentar o pH ou solução de HCl para diminuir o pH. Se a osmolalidade estiver acima ou abaixo do recomendado, deve-se descartar o meio. Quando o meio estiver pronto, deve ser filtrado em filtro Nalgene de 0,2 µm para 500 ml³⁴ antes de ser armazenado. Este meio é estável por um mês em geladeira a 4°C.

³⁴ Catalog #151-4020, Thermo Fisher Scientific, Inc.- Waltham, Massachusetts, USA

Quadro 2 – Ingredientes para preparo do meio TALP. Receita utilizada no ART Core do Oregon National Primate Research Center, Beaverton, Oregon, EUA.

Componente	Catalog #	Quantidade
Solução de NaCl	S-5886 (Sigma)	250 ml
Phenol Red	P-3532 (Sigma)	0,005 g
Solução de Ácido Lático diluída (1:35 vol/vol) ^a	L-7900 (Sigma)	33,5 ml
Sulfato de Gentamicina	G-1264 (Sigma)	25 mg
Solução de KCl	P-5405 (Sigma)	9,5 ml
Solução de CaCl ₂ -2H ₂ O	C-7902 (Sigma)	8,5 ml
Solução de MgCl ₂ -6H ₂ O	M-0250 (Sigma)	2,05 ml
Solução de NaHCO ₃	S-5761 (Sigma)	75 ml
Solução de NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O/ Glicose ^b	S-9638 (Sigma)	8,5 ml
Solução de NaCl	S-5886 (Sigma)	Q.S.P. 500 ml
pH	-	7,3-7,5
Osmolalidade	-	285-295

^a1 ml de xarope de ácido lático a 60% para 35 ml de água Milli Q

^bDissolver 140 mg de NaH₂PO₄-H₂O em 50 ml de solução de glicose

TALP complete

Para preparo do meio TALP complete, separa-se 100 ml da solução estoque (TALP) e adicionam-se 0,30 g de BSA e 0,006 g de piruvato de sódio. Quando o meio estiver pronto deve ser filtrado em filtro Nalgene de 0,2 µm para 150 ml³⁵ antes de ser armazenado. Esse meio é estável por uma semana em geladeira a 4°C. O meio deve ser equilibrado em incubadora a 37°C por pelo menos 2-3 h antes do uso.

³⁵ Catalog #150-0020, Thermo Fisher Scientific, Inc.- Waltham, Massachusetts, USA

APÊNDICE E - Solução ativadora para espermatozoides

Para preparo da solução ativadora, deve-se colocar 0,002 g de cafeína e 0.005 g de dbcAMP em um tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml, seguido da adição de 1 ml de solução salina a temperatura ambiente (22°C). Após o preparo da solução, esta deve ser mantida sobre uma placa aquecedora a 37°C.