



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO AGROPECUÁRIO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Klena Sarges Marruaz da Silva

**“Avaliação Andrológica e Criopreservação de Sêmen de *Ateles* (macaco-aranha)
mantidos em Cativeiro”**

Belém

2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO AGROPECUÁRIO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Klena Sarges Marruaz da Silva

“Avaliação da Eficácia dos diluentes TES e Ringer Lactato na Criopreservação de Sêmen de *Ateles* (macaco-aranha) mantidos em Cativeiro”

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação (Mestrado) em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro

Belém

2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO AGROPECUÁRIO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Klena Sarges Marruaz da Silva

“Avaliação da Eficácia dos diluentes TES e Ringer Lactato na Criopreservação de Sêmen de *Ateles* (macaco-aranha) mantidos em Cativeiro”

BANCA EXAMINADORA:

Data 19/12/2005

Professor Doutor Haroldo Francisco Lobato Ribeiro

Instituto de Saúde e Produção Animal / Universidade Federal Rural da Amazônia (ISPA/UFRA)

PRESIDENTE DA BANCA

Professora Doutora Diva Anelie de Araújo Guimarães

Centro de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Pará (CCB/UFPA)

MEMBRO TITULAR

Dr. Reinaldo de Amorim Carvalho

Centro Nacional de Primatas / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde (CENP-SVS/MS)

MEMBRO TITULAR

Prof. Dr. William Gomes Valle

Instituto de Saúde e Produção Animal / Universidade Federal Rural da Amazônia (ISPA/UFRA)

MEMBRO SUPLENTE

A Deus e Nossa Senhora de Nazaré.

Aos meus pais, exemplo de vencedores e grandes colaboradores do meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu marido Marcelo, grande amor e companheiro.

Aos meus filhos Bárbara e Henrique e enteado Marcelinho, por fazerem minha vida muito feliz.

Aos macacos do Centro Nacional de Primatas.

Dedico.

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro, meu orientador nessa dissertação, pelo convite inicial que muito me honrou e pela orientação neste projeto. Obrigada, principalmente, pela paciência e confiança depositada.
- Aos professores Diva Anelie e William Vale por aceitarem avaliar este trabalho e contribuírem para sua melhoria.
- Ao Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas pela apreciação e aprovação do projeto.
- Ao Centro Nacional de Primatas pela autorização de execução do projeto em suas instalações. Minha gratidão especial aos tratadores que auxiliaram na contenção dos animais; ao colega veterinário Paulo Castro, por toda força; à equipe do Setor de Clínica e Cirurgia: Seu Paulo X, D. Rosa e Jean, pelo apoio total enquanto eu precisava dispensar meu tempo à execução deste trabalho e pela amizade dedicada e ao Sr. Osvaldo, pelo auxílio na organização do material utilizado.
- Ao Museu Paraense Emílio Goeldi, na pessoa da diretora do Parque Zoobotânico, Vera Bastos. Pela cessão das onças e total apoio, quando o projeto inicialmente pretendia estudá-las.
- Ao colega veterinário e amigo Dr. Humberto Ferreira, pelas sugestões, pelo empréstimo do eletroejaculador e confecção da probe utilizados neste projeto, enfim, pela solicitude de sempre e amizade. Sou eternamente grata.
- Ao colega e amigo Rodrigo Valle. Pelas sugestões, bibliografias cedidas e co-orientação *via MSN* durante a execução do projeto.

- Aos professores José Silva de Sousa e Aluizio Otávio da Silva, veterinários responsáveis pela Central de Biotecnologia Reprodutiva da Universidade Federal do Pará (CEBRAN/UFPA), por toda colaboração dada do início ao fim. Agradeço desde a cessão dos diluentes utilizados, até as sugestões, enfim, por todo o aprendizado e total atenção dispensada.
- Agradeço também às funcionárias do CEBRAN, Lucilene e Auxiliadora, pela atenção sempre oferecida à minha pessoa.
- Ao Prof. Dr. Cláudio Vieira de Araújo (UFRA) pelo auxílio na análise estatística e grande dedicação a todos os alunos deste curso de pós-graduação.
- Aos estagiários do Centro Nacional de Primatas e futuros profissionais de medicina veterinária e biologia: Vivian Almeida , Aline Imbeloni, Marcelo Koury, Romir Barata, Nazaré, Carol, Luiza de Araújo, Ivan de Andrade e Selma Cunha pela ajuda no “corre-corre” do momento das colheitas, anotações e fotos realizadas.
- À monitora Elisabeth Barbosa pelo auxílio na avaliação e processamento dos sêmens colhidos e pela disposição desde as primeiras horas matutinas até o final da tarde em dias de colheita.
- Aos meus colegas e amigos Dr. Reinaldo Carvalho, diretor do Centro Nacional de Primatas, e Antônio Messias Costa, veterinário do Parque Zoobotânico do Museu Goeldi. Pelas palavras e atitudes de incentivo, por aprender muito com suas convivências, pelo apreço demonstrado sempre. Considero-os meus mestres.
- Aos colegas e amigos colaborador e pós-graduandos do Centro Nacional de Primatas, Dr. Washington Pereira, Frederico Ozanan, Tatiana Kugelmeir, Laila Torres e Délia , pelo incentivo e rica convivência.
- Ao colega Paulo Holanda, doutorando da Universidade de São Paulo, pela troca de idéias, pelo envio do corante e pela amizade.

- Aos meus filhos Bárbara e Henrique, pela compreensão quando a “mamãe” não pôde dar atenção e por serem o maior estímulo na minha qualificação profissional e pessoal.
- Ao meu marido Marcelo, por sempre fomentar minha auto-estima e incentivar o enriquecimento profissional, por ficar do meu lado nos momentos difíceis com a paciência de sempre, pelo amor e amizade.
- À minha mãe, Prof. Dra. Naná Sarges, meu exemplo de dignidade e mulher bem sucedida profissionalmente. Por estar sempre ao meu lado de alguma maneira.
- À amiga Rosilda do Carmo por ter cuidado da minha casa e meus filhos sempre que precisei.
- À minha irmã Keyla e meu pai Kleber, pelas palavras de incentivo.
- Aos animais utilizados neste experimento e a todos os animais com o qual já tive a oportunidade de trabalhar em projetos ou atender clinicamente, os grandes contribuidores da minha qualificação profissional. Minha gratidão e respeito a eles.

“O macaco chega onde a onça não alcança”.
Provérbio popular paraense

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS E FIGURAS-----	v
RESUMO-----	vi
ABSTRACT-----	vii
1. INTRODUÇÃO-----	01
2.REVISÃO DE LITERATURA-----	05
2.1. ASPECTOS DA BIOLOGIA DE ATELES-----	06
2.1.1. Dados Biológicos Gerais-----	06
2.1.2. Dados Reprodutivos-----	09
2.1.3. Situação Populacional -----	09
2.2. CONTENÇÃO QUÍMICA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS-----	10
2.3. CARACTERÍSTICAS DO TRATO REPRODUTOR MASCULINO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS -----	10
2.4. MÉTODOS DE COLHEITA DE SÊMEN EM PRIMATAS NÃO HUMANOS-----	12
2.5.COAGULAÇÃO SEMINAL EM PRIMATAS NÃO HUMANOS E CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN-----	15
2.5.1. Coagulação Seminal em Primatas não humanos -----	15
2.5.2. Características Físico-químicas do sêmen de primatas não humanos-----	18
2.6. PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS EM SÊMEN DE PRIMATAS NÃO HUMANOS-----	21
2.7. DILUENTES UTILIZADOS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN PRIMATAS NÃO HUMANOS-----	22
3. OBJETIVOS-----	25
3.1.OBJETIVO GERAL-----	26
3.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	26
4.MATERIAIS E MÉTODOS-----	27
4.1.ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO-----	28
4.2. CONTENÇÃO QUÍMICA E FÍSICA-----	30

4.3. AVALIAÇÃO CLÍNICA-ANDROLÓGICA E BIOMETRIA TESTICULAR-----	30
4.4. ELETROEJACULAÇÃO-----	31
4.5. AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SÊMEN A FRESCO-----	33
4.6. DILUENTES UTILIZADOS -----	34
4.7. AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE E VIGOR DO SÊMEN A FRESCO E DILUÍDO --	34
4.8. DILUIÇÃO E CONGELAÇÃO DOS SÊMENS OBTIDOS-----	34
4.9. PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS-----	35
4.10. TESTE DE TERMO RESISTÊNCIA (<u>T.T.R.</u>)-----	36
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	36
6. RESULTADOS-----	37
6.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA-ANDROLÓGICA E BIOMETRIA TESTICULAR-----	38
6.2. RESULTADOS DAS COLHEITAS POR ELETROEJACULAÇÃO-----	39
6.3. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SÊMEN-----	40
6.4. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE E VIGOR DO SÊMEN A FRESCO E DILUÍDO-----	42
6.5. RESULTADOS DO TESTE DE TERMO RESISTÊNCIA (<u>T.T.R.</u>)-----	43
6.6. PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS ENCONTRADAS-----	44
7. DISCUSSÃO-----	47
8. CONCLUSÃO-----	53
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	55
ANEXOS-----	66

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1: Valores mínimo, máximo, média, desvios-padrões e coeficientes de variação de biometria testicular para *Ateles paniscus* e *Ateles marginatus* do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVSMS).....Pg 38
- Tabela 2: Valores mínimo, máximo, média, desvios-padrões e coeficientes de variação de biometria testicular para primatas não humanos *Ateles* do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS-MS).....Pg 41
- Tabela 3: Valores encontrados de média, desvio-padrão, valores mínimos e máximos, de volumes de ejaculado obtidos nas colheitas realizadas para primatas não humanos *Ateles* do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS-MS).....Pg 41
- Tabela 4: Valores encontrados de média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo, de concentração espermática de ejaculados de primatas não humanos *Ateles* do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS-MS).....Pg 42
- Tabela 5: Resultado da avaliação de motilidade e vigor do sêmen a fresco e diluído do animal AK-AAD.....Pg 42
- Tabela 6: Resultado da avaliação de motilidade e vigor do sêmen a fresco e diluído do animal AI-AAB.....Pg 43

Tabela 7: Resultado da avaliação de motilidade e vigor do sêmen a fresco e diluído do animal AI-AAD.....	Pg 43
Tabela 8: Resultado do teste de termo-resistência do animal AK-AAD	Pg 43
Tabela 9: Resultado do teste de termo-resistência do animal AI-AAB.....	Pg 43
Tabela 10: Resultado do teste de termo-resistência do animal AI-AAD.....	Pg 44
Tabela 11: Patologias espermáticas encontradas nos ejaculados da 1ª colheita de <i>Ateles</i> do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS-MS).....	Pg 45
Tabela 12: Patologias espermáticas encontradas nos ejaculados da 2ª colheita de <i>Ateles</i> do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS-MS).....	Pg 49
Figura 1: Exemplar de <i>Ateles paniscus</i>	Pg 08
Figura 2: Exemplar de <i>Ateles marginatus</i>	Pg 08
Figura 3: Aspectos da gaiola onde são mantidos os exemplares de <i>Ateles</i> no CENP.....	Pg 29
Figura 4: <i>Ateles marginatus</i> mantido em cativeiro no CENP.....	Pg 29
Figura 5: Mensuração de testículo em <i>Ateles</i>	Pg 30

Figura 6: Eletroejaculador MSF 95.....	Pg 31
Figura 7: Probe utilizada no experimento.....	Pg 32
Figura 8: Posicionamento do pênis no tubo coletor.....	Pg 32
Figura 9: Minitubo identificado utilizado para envasamento do sêmen.....	Pg 35
Figura 10: Pênis de <i>Ateles</i> relaxado momentos antes da colheita.....	Pg 39
Figura 11: Pênis ereto de <i>Ateles</i> apresentando glande aumentada no momento da ejaculação.....	Pg 39
Figura 12: Aspecto gelatinoso consistente de ejaculado em <i>Ateles</i> do Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS/MS).....	Pg 40
Figura 13: Espermatozóide normal de ejaculado de <i>Ateles</i> do Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS/MS) (microscopia de contraste de fase x100, ph2).....	Pg 45
Figura 14: Caudas fortemente dobradas encontradas em espermatozoides de ejaculado de <i>Ateles</i> do Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS/MS) (microscopia de contraste de fase x100, ph2).....	Pg 46

RESUMO

A biotecnologia aplicada à reprodução é uma ferramenta também importante para conservação de espécies ameaçadas de extinção. Algumas espécies de primatas não-humanos neotropicais têm sido amplamente agredidas por ações antrópicas, ocasionando a inclusão de 26 espécies brasileiras na lista oficial de animais ameaçados de extinção do IBAMA. As espécies de primatas não humanos *Ateles belzebuth* e *Ateles paniscus*, participantes do gênero *Ateles*, popularmente chamados de macaco-aranha, encontram-se particularmente ameaçadas. Poucos estudos são realizados acerca do status populacional destas espécies e menos ainda sobre dados reprodutivos e reprodução assistida. O presente trabalho pretendeu avaliar as características andrológicas de exemplares de primatas não humanos do gênero *Ateles* em cativeiro e comparar a performance dos diluentes TES e CEBRAN II, este último à base de ringer lactato, como criopreservadores de sêmen destas espécies. O experimento foi realizado utilizando 06 exemplares machos de primatas não humanos do gênero *Ateles* (02 exemplares de *Ateles marginatus* e 04 exemplares de *Ateles paniscus*) mantidos sob as mesmas condições de cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS/MS), em Ananindeua, Pará. Os animais utilizados foram submetidos a exame clínico-andrológico e biometria testicular, antes da colheita seminal realizada por eletroejaculação. Foram realizadas avaliações físico-químicas e de patologias espermáticas, além de avaliação de motilidade e vigor no sêmen a fresco e pós-diluição com os diluentes TES e CEBRAN II. As alíquotas de sêmen diluídas com os dois diluentes, na proporção 2:1, foram envasadas em minitubos com capacidade para 0,25 ml e criopreservados em nitrogênio líquido. Após descongelação, as doses envasadas foram avaliadas em teste de termo-resistência (T.T.R.). As médias de volume e concentração espermáticas obtidas foram, respectivamente, 1,94 ml ($\pm 0,83$) e 3.020.000 spz/ml ($\pm 275,97$). O pH 8 foi observado em todas as amostras e todos os exemplares apresentaram coagulação seminal. O índice de patologias espermáticas encontrados foi alto (69,8% $\pm 9,05$) indicando que pode haver influência da sazonalidade reprodutiva nas características seminais encontradas nos animais deste experimento. Os resultados de avaliação de motilidade e vigor do sêmen a fresco, diluído e no T.T.R. não puderam ser analisadas estatisticamente, pois somente o sêmen de 03 animais demonstrou espermatozóides viáveis pós-descongelação, com resultados que sugerem que o diluente TES apresenta melhor eficiência na preservação de sêmen de *Ateles* do que o diluente CEBRAN II.

Palavras-chave: biotecnologia reprodutiva, características seminais, *Ateles*.

ABSTRACT

Biotechnology reproductive is a tool also important for conservation of endangered species. Some neotropicals no humans primates no-humans have been attacked thoroughly by human activities, causing the inclusion of 26 brazilian species in the official list of endangered animals of IBAMA. The species of primates *Ateles belzebuth* and *Ateles paniscus*, participants of the genus *Ateles*, popularly called spiders monkeys are particularly threatened. Few studies are accomplished concerning the population status of these species, mainly about reproductive data and assisted reproductive techniques. The present study intends evaluate andrologic characteristics of non human primates of genus *Ateles* in captive and compare the performance of the diluents TES and CEBRAN II, this last one to the base of ringer lactato, as cryopreservatives of semen of these species. The experiment was accomplished using 06 male monkeys of primates no humans genus *Ateles* (02 *Ateles marginatus* and 04 *Ateles paniscus*) maintained in the same captivity conditions in the National Center of Primates (CENP-SVS/MS), Ananindeua, Pará. These animals were submitted to clinical and andrological exams and testicular measurements, before the seminal collection by electroejaculation. Physiochemical evaluations were accomplished and spermatoc abnormalities too, besides motility and forward movement evaluation in the fresh semen and semen dilution with the diluents TES and CEBRAN II. The ejaculates diluted with the two diluents (2:1 proportion) and were packed in plastic straws with capacity for 0,25 ml, cryopreserved in liquid nitrogen. After thawing, the packed ejaculates were appraised in term-resistance test (T.T.R.). The volume averages and concentration obtained were, respectively, 1,94 ml (0,83) and 3.020.000 spz/ml (275,97). THE pH 8 was observed in all of the samples and all animals presented seminal coagulation. The index of abnormalities spermatoc found was loud (69,8% 9,05) indicating that can have influence of the seasonal breeding in the seminal characteristics found in the animals of this experiment. The results of motility evaluation and forward movement of the fresh and diluted semen and in T.T.R. could not be analyzed by statistical method, because only the semen of 03 animals demonstrated viable spermatozoids in thawing, with results that suggest that the TES diluent presents better efficiency in the preservation of semen of *Ateles* than CEBRAN II.

Key-words: reproductive biotechnology, seminal characteristics, *Ateles*.

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia aplicada à reprodução é uma ferramenta importante não só para pesquisas alternativas de reprodução de animais importantes com valor econômico ao ser humano, como também para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (WILDT *et al.*, 1993).

As vantagens da reprodução assistida nestas espécies são, ainda, somar no contexto da ciência da criopreservação. Muito se discute sobre a criação de bancos de recursos genéticos, contendo esperma, óvulos e embriões congelados, que poderiam ser utilizados para preservar a diversidade genética por gerações através de "infusões genéticas", realizadas sempre que necessário nas populações selvagens. A criopreservação também é aliada contra catástrofes como epidemias, que podem dizimar uma população inteira em curto espaço de tempo. Para que esta estratégia de conservação seja garantida, também é necessário estudar aspectos reprodutivos básicos como a caracterização do ejaculado, função endócrino-testicular, resposta ovariana aos hormônios exógenos, assim como, também, a eficácia de diluentes utilizados atualmente para criopreservação de sêmen de animais.

Algumas espécies de primatas não-humanos neotropicais têm sido amplamente agredidas por ações antrópicas, ocasionando a inclusão de 26 espécies brasileiras na lista oficial de animais ameaçados de extinção do IBAMA. Dentre este total, 11 encontram-se na Amazônia e nove em cativeiros espalhados pelo Estado do Pará. São elas: *Alouatta belzebul belzebul*, *Ateles belzebuth*, *Ateles paniscus*, *Callimico goeldii*, *Cebus apella xanthosternos*, *Chiropotes satanas utahicki*, *Chiropotes satanas satanas*, *Lagothrix lagotricha* e *Saguinus imperator* (IBAMA, 2003).

A manutenção em cativeiro destas espécies com o intuito de reproduzi-las não tem obtido sucesso em algumas espécies através do acasalamento natural. Nestes casos, as biotecnologias reprodutivas podem servir como alternativa aos programas de reprodução. A

criopreservação de gametas permite que o material genético seja preservado antes mesmo de haver técnicas protocoladas para utilização de biotecnologias reprodutivas, contribuindo com a manutenção das espécies ameaçadas e preservando a diversidade genética das populações futuras.

As espécies de primatas não humanos *Ateles belzebuth* e *Ateles paniscus*, pertencentes ao gênero *Ateles*, popularmente chamados de macaco-aranha, encontram-se particularmente ameaçadas. Poucos estudos são realizados acerca do *status* populacional destas espécies, e menos, ainda sobre os dados reprodutivos e a reprodução assistida. No Brasil, a Sociedade de Zoológicos do Brasil (SZB) divulgou em seu censo realizado em 1995 que atualmente existem 22 exemplares de *Ateles marginatus* e o *Stud Book* Brasileiro para macacos-aranha publicou em 2003 a existência de somente 16 machos e 30 fêmeas da espécie *Ateles paniscus* mantidos em cativeiro no país, tendo sido registrados somente dois nascimentos, um no zoológico de Sorocaba e outro no Zôo de São Paulo. Milton realizou estudo em 1981 sobre o *status* populacional da espécie *Ateles geoffroyi* nas florestas da região central do Panamá, entretanto os números publicados são imprecisos e referem-se somente a animais provenientes de um grupo reintroduzido em vida livre na década de 60.

Apesar de haver potencial importância da utilização da criopreservação de espermatozoides nas técnicas de reprodução assistida para primatas não-humanos, particularmente para programas reprodutivos, poucos estudos sistemáticos têm sido realizados para desenvolver técnicas apropriadas a cada espécie, especialmente espécies neotropicais.

Um dos grandes problemas do uso rotineiro de programas de reprodução assistida é o custo elevado de alguns equipamentos e materiais necessários à conservação dos gametas e embriões, como os diluentes. O custo do TES, por exemplo, é oito vezes maior que o custo do diluente Ringer Lactato, ainda não experimentado para primatas não-humanos.

Desta forma, propomos o estudo comparativo dos diluentes TES e Ringer Lactato como criopreservadores de sêmen destas espécies, experimento que pretende não só somar para o sucesso na criopreservação, mas também auxiliar a diminuir os custos de projetos ligados à biotecnologia aplicada à conservação de animais em situação de risco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- ASPECTOS DA BIOLOGIA DE ATELES

2.1.1. Dados Biológicos Gerais

O gênero *Ateles* pertence à tribo Atelini, subfamília Atelinae, família Atelidae, Infraordem Platyrrhini, Subordem Anthropeidea, Ordem Primates e possui seis espécies: *Ateles paniscus*, *Ateles belzebuth*, *Ateles marginatus* e *Ateles chameck*, *Ateles geoffroyi* (RYLANDS *et al.*, 2000). Os primatas pertencentes a este gênero são popularmente chamados de macaco-aranha ou, ainda, coatás e estão entre os maiores primatas da América.

Vivem em florestas altas, chuvosas, inundáveis ou terra firme formando grandes grupos sociais, com mais de 30 indivíduos, divididos em sub-grupos. Raramente encontra-se, em vida livre, grupos formados somente com fêmeas e mais raramente ainda subgrupos formados somente por machos (CHAPMAN, 1989). Apresentam uma densidade de 20 indivíduos por km² e biomassa de 175 kg por km². É comum observar indivíduos deslocando-se sós, porém encontrando outros, várias vezes por dia. As únicas associações estáveis são entre fêmeas e filhotes (AURICCHIO, 1995).

Parece ser o mais frugívoro primata sul-americano considerando-se frutos separados de sementes. Alimentam-se também de brotos, folhas, casca de árvore, flores, néctar e térmitas. Habitam copas altas, movimentando-se habilmente, utilizando a cauda preênsil como um quinto membro (AURICCHIO, 1995). Um estudo comparativo entre macacos-aranha e chipanzés (*Pan sp.*) demonstrou haver um sistema de fissão-fusão social onde os grupos agregados unem-se e separam-se várias vezes ao dia para forragear (CHAPMAN, 1989).

Os exemplares de *Ateles paniscus* (figura 1), também chamados na região amazônica

de coatás da cara vermelha, possuem a face rosada e exibem algum dimorfismo sexual, onde os machos têm compleição física mais avantajada que as fêmeas (MCFARLAND SYMINGTON, 1988).

Esta espécie é encontrada na América Central e do Sul, norte do Rio Amazonas e Leste do Rio Negro (WHITE, 1986). *Ateles paniscus* gasta boa parte do seu tempo descansando. Um estudo calculou que 45% do tempo dispensam ao descanso, com a alimentação ocorrendo em 29% do tempo e 26% gastos em deslocamento (MCFARLAND SYMINGTON, 1988). São principalmente frugívoros e usam uma grande variedade de frutas em sua dieta, podendo usar frutas em diferentes estágios de maturação o que reduz a competição com outros animais frugívoros. São importantes dispersores de sementes nas florestas tropicais (NORCONK; KINZEY, 1994).

Ateles marginatus é caracterizado por possuir pêlos totalmente negros, exceto uma faixa de pêlos brancos na testa em forma triangular e listras no lado da face (figura 2). É endêmico no Brasil, ocorrendo no norte e oeste do Estado do Pará, a oeste do Baixo Tocantins e Araguaia e a leste dos Rios Tapajós e Teles Pires (AURICCHIO, 1995).



Figura 1: Exemplar de *Ateles paniscus* (Luiz Claudio Marigo)



Figura 2: Exemplar de *Ateles marginatus* (Luiz Claudio Marigo)

2.1.2. Dados Reprodutivos

Segundo Auricchio (1995), a última reprodução em exemplares de *Ateles* ocorre, em média, aos 25 anos. São animais de hábitos poligâmicos onde encontra-se um grupo normalmente formado por 15 fêmeas adultas e 05 machos e vários indivíduos sub-adultos e infantis. Embora o autor supracitado afirme que acasalamentos ocorrem fortuitamente, sem dominância hierárquica, Symington (1987) cita dominância do macho adulto em um grupo reprodutivo e sugere que esta dominância está relacionada ao tamanho deste macho em relação aos demais do grupo.

O período gestacional para *Ateles* é de, em média, 07 meses e meio e o intervalo entre partos de 25 a 42 meses, um dos mais longos entre as espécies neotropicais. A maturidade sexual ocorre entre os 3 a 4 anos de idade (MCFARLAND SYMINGTON, 1988).

Existem poucos estudos que relatem a fisiologia reprodutiva de *Ateles*, alguns estudos realizados com *Ateles geoffroy* sugerem que há sazonalidade reprodutiva para estes primatas (HÉRNANDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2002a; MILTON, 1981) e outras espécies (EWING, 1982).

2.1.3. Situação Populacional

Nas comunidades interioranas da Amazônia é comum a predação destes animais para alimentação, como animais de estimação e como isca para caça de outros animais, como as onças. Por possuírem maturação sexual tardia e produzirem poucos filhotes durante sua vida útil, têm a manutenção da população comprometida (MCFARLAND SYMINGTON, 1988). Outro problema para a conservação das espécies de *Ateles* é a grande possibilidade de cruzamentos híbridos em cativeiro, reduzindo o valor conservativo da espécie.

2.2- CONTENÇÃO QUÍMICA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

Primatas não-humanos que são utilizados para colheita de sêmen por eletroejaculação devem ser contidos quimicamente a um nível próximo ao plano cirúrgico. Um dos primeiros experimentos realizados utilizando a colheita por eletroejaculação em primatas não humanos relata o uso de fenciclidina, em dose de 2 mg/kg, um derivado piperidínico e precursor do cloridrato de ketamina, hoje com uso restrito por haver relação de seu uso com dependência química humana (ROUSSEL; AUSTIN, 1967; VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Atualmente, para primatas não-humanos é recomendada a associação de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina nas dosagens de 7 a 10 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente. (DINIZ, 1998). Alguns indivíduos podem necessitar de administração de atropina, no caso de bradipnéia e bradicardia, ou de diazepam (Valium), para reverter mioclonias que por ventura ocorram pela sensibilidade à ketamina. O uso de atropina pode interferir no volume do ejaculado, diminuindo-o (MORATO; BARNABE, 1998). Já a utilização de diazepam pode causar um relaxamento excessivo da musculatura levando à contaminação do sêmen por urina, além de uma rápida diminuição da motilidade espermática como relatado para algumas espécies de mamíferos carnívoros (HOWARD , 1993).

2.3- CARACTERÍSTICAS DO TRATO REPRODUTOR MASCULINO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

Os órgãos reprodutivos de machos de primatas não humanos são semelhantes tanto em anatomia quanto em fisiologia aos órgãos sexuais de machos humanos. O pênis dos primatas não humanos, semelhante a humanos, é um órgão sensorial especializado que possui receptores sensoriais incluindo receptores especializados como os corpúsculos de Meiss, que estão distribuídos pela glândula do órgão tendo sua localização já descrita para chimpanzés,

babuínos, macacos Rhesus e calitriquídeos. Chimpanzés e *Callithrix* possuem espículas penianas em torno dos receptores corpusculares do pênis distal que contribuem para maximizar sua habilidade copulatória ao permitir a maximização do estímulo sexual no momento da cópula (COLD *et al.*, 2000). O macaco Rhesus apresenta poucos corpúsculos receptores na glândula, assim como humanos, entretanto, humanos possuem inervações finais predominantes que conferem sensibilidade protopática, ou seja, menos sensível à pressão e dor (COLD; MCGRATH, 1999).

Além do prepúcio, a genitália externa de primatas possuem várias outras estruturas especializadas e presentes para todos os primatas como o corpo cavernoso do pênis. Outras estruturas presentes na genitália masculina, mas somente relatadas para algumas espécies são: prepúcio e/ou saco escrotal coloridos em *Clorocebus*, *Mandrillus*, *Papio* e *Pongo*; papilas córneas em chimpanzés e babuínos. Estudos sugerem que as evoluções destas estruturas presentes na genitália influenciam na escolha da fêmea e que a morfologia peniana pode contribuir para melhoria da competição espermática (COLD; MCGRATH, 1999).

As glândulas acessórias encontradas em primatas não humanos também têm forma e função semelhantes às encontradas em humanos. A vesícula seminal possui importantes funções nos primatas não humanos, principalmente sintetizar o líquido ou fluido seminal, onde os espermatozóides estarão suspensos na ejaculação. Este líquido contém várias substâncias nutritivas que aumentam a viabilidade espermática como a frutose e proteínas que reagem com a enzima prostática (vesiculase) e causam a coagulação seminal produzindo um *plug* copulatório firme após a ejaculação. O líquido seminal de primatas costuma apresentar pH alcalino em uma estratégia para viabilizar os espermatozóides na vagina de pH ácido da fêmea de primata não humano (DIXSON, 1998). Estudo comparativo realizado entre *Erythrocebus patas* e humanos indica que a próstata de primatas não humanos também

apresenta similaridade anatômica no lobo caudal e zona periférica do órgão (LEWIS *et al.*, 1981).

2.4- MÉTODOS DE COLHEITA DE SÊMEN EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

A colheita de sêmen em primatas não-humanos através da eletroejaculação tem sido utilizada e testada há algumas décadas. Nos anos 60, um dos primeiros métodos utilizados foi o de estimulação peniana direta, onde o animal recebia estímulos elétricos diretos no pênis (MASTROIANNE; MANSON, 1963; VALERIO *et al.*, 1969). Para realizar este tipo de eletroestimulação, o animal não era sedado e era contido em uma cadeira adaptada. O método indicou resultados com bom volume de ejaculado e alta concentração de espermatozóides no ejaculado comparado ao método retal. Estes resultados, segundo VandeVoort (2004), podem estar correlacionados a melhor estimulação do trato reprodutivo por inteiro e diminuição de problemas com contaminação por urina, porém requer condicionamento e aclimação dos animais à cadeira de contenção. Utilizando esta técnica, Van Pelt e Keyser (1970) realizaram a colheita em exemplares de *Macaca fascicularis* e *Macaca mulatta*, onde os animais recebiam 3 séries de estímulos com voltagem inicial de 20 volts e 20 impulsos por minuto, chegando até 80 volts, se necessário, até obterem ejaculado. Settlege e Hendrickx (1974) também utilizaram o método em *Macaca mulatta* com protocolo de estímulos semelhante, porém chegavam até 45 volts, mas os animais nunca alcançavam ereção total e um deles desenvolveu fístula uretral.

Algumas espécies de primatas não humanos possuem atualmente a colheita seminal com protocolos já testados e avaliados através da estimulação retal por probe ou eletrodo como: *Macaca fascicularis* (LI *et al.*, 2005); *Gorilla gorilla* (SEAGER *et al.*, 1982); *Macaca nigra* (THOMSON, 1992); *Pan troglodytes* (YOUNG *et al.*, 1995); *Papio anubis*

(AMBOKA; MWETHERA, 2003); *Alouatta caraya* (MORELAND *et al.*, 2001); *Cebus apella* (BARNABE *et al.*, 2002); *Ateles geoffroyi* (HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2002).

Apesar de ainda não haver um protocolo de estímulos elétricos estabelecido para a maior parte das espécies, principalmente as neotropicais, a sequência de estímulos utilizadas para algumas espécies podem ser repetidos para espécies correlatas. A maior parte dos trabalhos realizados preconiza que os estímulos elétricos podem ser repetidos até seis vezes em uma mesma voltagem, com duração de 1 a 2 segundos na voltagem máxima e retorno para 0 volts. Lang (1967) alcançou bons resultados para colheita seminal em *Saimiri sciureus* ao utilizar voltagem variando entre 0,95 e 1,15 volts, obtendo tempo médio para ejaculação entre 2 a 3 minutos. Barnabe e colaboradores (2002) estimularam exemplares de *Cebus apella* com 5 séries de 20 estímulos cada, em um nível progressivo de intensidade, percorrendo de 50 a 300 mA. Já Valle e seus colaboradores (2004a) utilizaram estímulos variando de 0 a 8 volts para *Alouatta caraya* com aumentos subsequentes de 0,5 V a cada série de 30 estímulos. Estes estímulos duravam cerca de 2 a 3 segundos com intervalo de 1 a 2 segundos a cada um. Para a espécie *Ateles geoffroyi* foram utilizados estímulo de 1 volt e 10 mA aumentando até 7 volts e 100mA, aumentado 1 volt a cada duas ou três sucessivas tentativas, o que era acompanhado de estimulação manual do pênis (HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2002).

Para realizar a introdução da probe retal recomenda-se utilizar lubrificação desta com gel ou pomada de vaselina antes da introdução com o objetivo de eliminar a possibilidade de injúrias ao reto (SEAGER *et al.*, 1982).

O aparelho eletroejaculador e a probe recomendados para colheita de sêmen nestas espécies, variam de acordo com alguns autores. Van Pelt e Keyser (1970) utilizaram em seu experimento com exemplares de *Macaca fascicularis* e *Macaca mulatta* dois tipos de aparelho: um comercialmente industrializado para uso em bovinos e outro protótipo

desenvolvido para primatas e também dois tipos de probes: uma com características para bovinos, porém de tamanho menor e outra utilizada nos experimentos preconizadores de Weisbroth e Young¹. Barnabe e colaboradores (2002) e Valle e seus colaboradores (2004a) também utilizaram um eletro-ejaculador desenvolvido para bovinos, o primeiro grupo acoplou-o a uma probe retal bipolar de 9 mm de diâmetro para utilização em *Cebus apella*, enquanto o segundo grupo utilizou uma probe retal com tira circular metálica medindo 11,4 cm de comprimento e 1,2 cm de diâmetro para *Alouatta caraya*. Denis e seus colaboradores (1976) utilizaram um estimulador fisiográfico desenvolvido pela Narco Bio Systems, nos Estados Unidos, para coletar sêmen de *Saimiri sciureus*.

Outros métodos de colheita de sêmen já utilizados em primatas não humanos são: vagina artificial, lavagem vaginal, punção de epidídimo, masturbação e estimulação vibratória peniana.

A vagina artificial pode ser utilizada para colheita de sêmen de algumas espécies como o chimpanzé (*Pan troglodytes*) (YOUNG *et al.*, 1995) e o gorila (*Gorilla gorilla*) (GOULD *et al.*, 1985). Tanto a utilização de vagina artificial quanto a masturbação são métodos que requerem condicionamento do animal, já que é necessário realizar a masturbação pelo animal (vagina artificial) ou permitir que o próprio animal o faça (masturbação). Ambos eliminam a necessidade de contenção química, diminuindo as interferências na qualidade do ejaculado (VALLE, 2002).

O uso de lavagem vaginal para obtenção de sêmen já foi realizada em *Callithrix jacchus* utilizando meio TEST-gema de ovo. Para tal, imediatamente após a cópula, a fêmea é contida e colocada em posição inclinada de cabeça para baixo e 100 µl do meio Konstant são introduzidos na vagina e retirados em seguida com auxílio de pipeta plástica. O sêmen

¹ Referência sem data registrada

colhido por esta técnica demonstrou ser de boa qualidade (KUEDERLING *et al.*, 1996; MORRELL *et al.*, 1996 *apud* VALLE, 2002).

A micropunção de cabeça e cauda de epidídimo já foi utilizada em chipanzés (*Pan troglodytes*) (YOUNG *et al.*, 1994), *Macaca fuscata* (SANKAI *et al.*, 1997), *Macaca fascicularis* (MAHONY *et al.*, 1993) e *Callithrix jacchus* (MORRELL *et al.*, 1997). É um método mais utilizado com animal recém-morto ou durante eutanásia, mas em chipanzés foi realizado através de sedação do animal.

O método de estimulação vibratória peniana é outro método de colheita mais recente e vem sendo utilizado para colheita seminal em espécies de primatas não-humanos de pequeno porte como *Callithrix jacchus* (YEOMAN *et al.*, 1998) e *Saimiri sciureus* (KUEDERLING *et al.*, 2000; SCHNEIDERS *et al.*, 2004). Este método também requer condicionamento do animal, uma vez que também não necessita anestesia.

Alguns trabalhos foram realizados comparando um ou mais métodos de colheita seminal. Gould e Young (1996) estudaram parâmetros funcionais de sêmen de ejaculados coletados de chimpanzés com eletroestimulação retal e vagina artificial e concluíram que os resultados não apresentavam diferenças significativas.

2.5- COAGULAÇÃO SEMINAL EM PRIMATAS NÃO HUMANOS E CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN

2.5.1 Coagulação Seminal em Primatas não humanos

O ejaculado proveniente de primatas não-humanos normalmente aparenta uma mistura incompleta de duas frações: uma fração opaca e viscosa, mais aparente na primeira porção do ejaculado e outra mais volumosa e clara. A coagulação transforma a inicialmente porção mais

clara do ejaculado em uma massa branca clara e resistente em forma de gel. Embora usualmente esta coagulação ocorra alguns momentos após a ejaculação, em amostras de algumas espécies de primatas há gelificação imediata, causando uma massa irregular que solidifica no final do pênis (VAN PELT; KEYSER, 1970). Este fenômeno deve-se à reação que ocorre entre as secreções provenientes do lobo cranial da próstata e da vesícula seminal (AMBOKA; MWETHERA, 2003). Alguns autores denominam este sêmen com aspecto gelatinoso firme de *plug* copulatório e relatam que este se molda no contorno da vagina da fêmea após a cópula e, presumivelmente, age como uma barreira que impede ou obstrui a inseminação por outros machos. O *plug* ou coágulo também pode servir como um veículo para realizar a transferência dos espermatozóides para dentro da cérvix da fêmea, minimizando a perda de esperma, tanto como barreira física como química, pois apresenta pH alcalino, aumentando o índice de sobrevivência dos espermatozóides no meio ácido vaginal (DIXSON; ANDERSON, 2002; HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2002). Van Pelt e Keyser (1970) ao realizarem colheitas em *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis* utilizando eletroejaculação retal e peniana, comparativamente, para observar o aspecto e características do sêmen, relataram que a forma do coágulo depende de onde ocorre a coagulação: dentro da uretra, na extremidade do pênis ou no frasco de coleta, e que logo após a coagulação, gotas minúsculas formam-se na superfície do coágulo. Estes também observaram que o sêmen obtido pelo método que utiliza probe retal demonstrou já estar coagulado no momento da ejaculação, com suas frações já misturadas, enquanto no método de estimulação peniana podia se observar duas frações incompletamente misturadas que coagulavam após a ejaculação.

Entre os primatas não humanos, apenas o sêmen do gorila (*Gorilla* sp) não forma coágulos (GOULD *et al.*, 1993 apud MORRELL; HODGES, 1998). O sêmen de *Macaca*

mulatta obtido através de eletroejaculação peniana demonstrou possuir uma fração sólida (coágulo), que se liquefaz parcialmente depois de algum tempo, e uma pequena fração líquida contendo esperma (LANZENDORF *et al.*, 1990). Prossímios e várias espécies de primatas do velho mundo e neotropicais formam *plug* copulatório. Um estudo comparativo realizado entre os diversos tipos de coágulos seminais formados, sugere a classificação deste em quatro categorias variando de 1 a 4, onde em 1 estariam espécies sem formação de coágulo e em 4, espécies com *plug* copulatório sólido. Espécies monogâmicas como as pertencentes aos gêneros *Callithrix*, *Aotus*, *Saguinus*, *Callimico*, *Nomascus*, *Hylobates* e *Symphalangus* e espécies poligâmicas como *Erythrocebus*, *Gorilla* e *Homo*, estão classificados como coágulo seminal 2 e espécies que apresentam formações de subgrupos temporários como *Lemur*, *Eulemur*, *Ateles*, *Brachyteles* e *Pan* apresentam coágulo seminal 4. Ainda não há estudos que expliquem o porquê de somente algumas espécies formarem *plug* copulatório consistente e enquanto outras formam coágulos menos consistentes ou até não formam (DIXSON; ANDERSON, 2002).

Embora a formação de coágulo seminal dificulte a diluição e criopreservação do sêmen, esta é a parte que contém a maior concentração de espermatozóides (BUSH *et al.*, 1975), embora alguns pesquisadores não tenham encontrado correlação entre a quantidade de coágulo presente na amostra e a concentração espermática (LANZENDORF *et al.*, 1990). Para aproveitá-la e impedir que ela dificulte o processo de criopreservação muitos pesquisadores liquefazem esta porção através da imersão do tubo coletor em banho-maria a 37°C por 30 minutos (SANKAI *et al.*, 1994; LI *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2005). Outros pesquisadores sugerem a liquefação enzimática do coágulo com soluções contendo tripsina, embora esta enzima destrua a membrana espermática impedindo o sucesso na criopreservação (ACKERMAN; ROUSSEL, 1968; HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2002). Outras enzimas

utilizadas para liquefazer o coágulo são a pronase e a quimotripsina (BUSH *et al.*, 1975; MORRELL; HODGES, 1998). Espécies neotropicais demonstram possuir coágulo mais firme e resistente à dissolução em banho-maria do que as espécies do velho mundo. Roudebush e Mathur (1998) utilizaram diluição com meio PBS e incubação a 37°C em dióxido de carbono a 5% por 40 minutos para separar a fração líquida do coágulo em ejaculados obtidos de *Saimiri sciureus*. Algumas espécies como *Papio anubis* demonstram não precisar de qualquer tratamento para liquefação, desfazendo-se o coágulo à temperatura ambiente após 15 ou 30 minutos (LANZENDORF *et al.*, 1990; AMBOKA; MWETHERA, 2003).

2.5.2. Características físico-químicas do sêmen em primatas não humanos

A concentração espermática pode ser determinada pelo método manual usando a hematocimetria (câmara de NeuBauer) ou pelo método automático usando o contador deCoulter. Os valores de concentração espermática encontrados em algumas espécies de primatas não humanos podem ser influenciados por algumas variáveis como colheitas realizadas na estação reprodutiva ou fora desta, fração analisada, anestésico utilizado, *stress* e método de colheita. Van Pelt e Keyser (1970) realizaram análises tanto na fração líquida quanto na fração coagulada obtidas de ejaculados de primatas das espécies *Macaca nigra* e *Macaca mulatta* e observaram que a fração líquida possui maior concentração espermática (2,383 milhões/ml) do que a fração coagulada (649 milhões/ml). Utilizando somente exemplares de *Macaca nigra*, Thomson *et al.* (1992) encontraram a média de $33,8 \times 10^6$ /ml de espermatozóides em ejaculados de animais anestesiados com tiletamina-zolazepam e cloridrato de ketamina, separadamente. Embora relatem conseguir melhor relaxamento de musculatura com a associação tiletamina-zolazepam, estes afirmaram não encontrar diferenças significativas nas características seminais dos sêmens obtidos em animais

anestesiados com as drogas utilizadas. Para *Callithrix jacchus* foi encontrada concentração espermática média de $27,3 \times 10^4/\mu\text{l}$ ($\pm 14,8$) em animais que não foram submetidos a nenhum procedimento estresante, uma média maior que a encontrada nos exemplares desta espécie que passaram por colheitas de sangue contínuas (Cui, 1996). Nesta mesma espécie, foi relatada concentração espermática média de $34,3 \times 10^6/\text{ejaculado}$ para ejaculados de animais colheitados por vibroestimulação (KUEDERLING *et al.*, 2000). Lang (1967), quando realizou um dos primeiros experimentos com eletroejaculação retal em primatas neotropicais, encontrou concentração média de 200.000 spz/ml em ejaculados de *Saimiri sciureus*. Já Denis e colaboradores (1976) encontraram média de $532,8 \times 10^6/\text{ml}$ em ejaculados de animais da mesma espécie. Para *Cebus apella*, Barnabe e colaboradores (2002) encontraram valor médio de $56,169 \times 10^6/\text{ml}$ em ejaculados obtidos por eletroejaculação retal. Em *Ateles geoffroy* foi observada média variando de 48,6 a $61,7 \times 10^6/\text{ml}$ em ejaculados digeridos com tripsina e também obtidos através de eletroejaculação, nos meses de janeiro a agosto, na cidade do México (HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2002). Humanos apresentam maior concentração espermática ($128 \times 10^6/\text{ml}$) que a maioria das espécies de primatas não humanos já estudadas (GRIZARD *et al.*, 1999).

O pH do sêmen de primatas não-humanos tende a apresentar valores maiores que 7 podendo chegar até 8,9 (MORELAND *et al.*, 2001; CUI, 1996; AMBOKA, MWETHERA, 2003). Em felinos, o sêmen coletado pela eletroejaculação, geralmente, apresenta um grande volume e um pH mais elevado que aquele coletado com vagina artificial (HOWARD, 1993). Já em primatas somente podemos afirmar tal fenômeno para espécies que já tiveram estudos para os quais foram aplicadas as duas técnicas de colheita como para chimpanzé (*Pan troglodytes*) (YOUNG *et al.*, 1995).

A cor dos ejaculados das diversas espécies de primatas parecem não diferir muito. Van

Pelt e Keyser (1970) descrevem a cor do ejaculado de primatas do gênero *Macaca* como branco opaco a leitoso e algumas amostras obtidas como marrom bronzeado. Bush e colaboradores (1975) descrevem a cor do sêmen de *Cebus apella* praticamente com as mesmas características, só havendo uma outra variação denominada por estes de branco-palha.

A motilidade espermática e o vigor são parâmetros subjetivos e dependem do cuidado criterioso de quem o analisa para obter valores confiáveis. Variações na temperatura e a exposição a substâncias químicas podem interferir na avaliação (PRATT, 1996). A obtenção destes valores na avaliação seminal pode ser prejudicada pelo aspecto gelatinoso do ejaculado. A maior parte dos pesquisadores analisou estes valores ao observarem a fração líquida do ejaculado, quando presente nas espécies estudadas. Algumas vezes torna-se necessário diluir o sêmen com alguma solução rica em frutose ou glicose, como a solução de Norman-Jhonson, que demonstra manter em bom estado o sêmen de humanos, bovinos e primatas não humanos (VAN PELT e KEYSER, 1970). Bush e autores (1975) observaram motilidade média de 62% em *Cebus apella*, mas liquefizeram o sêmen destes com pronase 1% em meio Eagle. Para *Saimiri sciureus* foi observada motilidade de 63,6%, avaliada após diluição do sêmen com tripsina (DENIS *et al.*, 1976).

O volume de ejaculado em primatas não humanos pode depender do método de colheita, do período de descanso entre colheitas ou até mesmo do período de abstinência imposto ao animal e está diretamente relacionado ao tamanho da espécie. *Callithrix jacchus*, por exemplo, possui volume médio de 31,9µl (KUEDERLING *et al.*, 2000), enquanto babuínos (*Papio anubis*) possuem volume médio de 460µl (AMBOKA; MWETHERA, 2003). Lanzendorf e colaboradores (1990) compararam o volume e outras características seminais de ejaculados de macacos Rhesus obtidos através de eletroejaculação peniana em

duas metodologias: voltagem constante, onde a voltagem era aumentada a cada estímulo e a corrente foi de aproximadamente 50mA, e corrente constante, onde 1mA eram mantidos durante a estimulação. Os autores observaram que o volume obtido dos ejaculados era maior quando aplicado o primeiro método. Em *Alouatta caraya* e *Ateles geoffroy* foi observado maior volume do ejaculado durante o período do verão (MORELAND *et al.*, 2001; HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2002).

A longevidade dos espermatozóides de primatas não humanos costuma declinar rapidamente em meio externo. A presença do plasma seminal parece encurtar mais ainda o tempo de vida dos espermatozóides (MORELAND *et al.*, 2001), o sêmen contaminado por urina possui espermatozóides com longevidade também reduzida (LANZENDORF *et al.*, 1990).

2.6- PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS EM SÊMEN DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

Para avaliar o índice de patologias espermáticas de um ejaculado é necessário utilizar corantes específicos para corar os espermatozóides e destacá-los em sua morfologia. Os corantes mais utilizados para essa análise são hematoxilina e eosina, Wright's, Giemsa, Cavarett's (mistura de eosina B e fenol) (PRATT, 1996). O uso isolado da eosina B também pode ser válido para essa avaliação (HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2002).

Embora Amboka e Mwethera (2003) afirmem que o sêmen de primatas não humanos, ao contrário do sêmen de humanos, raramente apresente formas anormais, foi encontrado índice alto de patologias normais (96,8% \pm 1) em ejaculados de *Macaca nigra* obtidos através de eletroestimulação retal (THOMSON *et al.*, 1992). Barnabe e colaboradores (2002) encontraram médias de 33% de defeitos maiores e 28% de defeitos menores em ejaculados de *Cebus apella* obtidos por eletroejaculação, com somente 39% de espermatozóides normais. Em ejaculados obtidos por eletroestimulação de *Alouatta caraya*, Valle e colaboradores

(2004) foram encontrados índices de 21,3% de espermatozóides patológicos. No estudo feito por Moreland e colaboradores (2001) com a mesma espécie, o índice de patologias espermáticas também foi relativamente baixo (37,5%) e os defeitos mais encontrados nos espermatozóides foram os que envolvem peça intermediária e cabeça pequena. Para *Ateles geoffroyi* foi encontrado um alto índice (50,3%) de patologias espermáticas em ejaculados obtidos e analisados durante a estação chuvosa e um baixo índice (27%), durante a estação seca da cidade do México (HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2002).

2.7- DILUENTES UTILIZADOS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS

Os diluentes utilizados na criopreservação de sêmen de primatas não-humanos geralmente contêm gema de ovo, açúcares e os crioprotetores glicerol ou DMSO em proporções variadas (MORREL; HODGES, 1998). Durante a congelação, o crioprotetor é um componente importante do diluente para garantir a sobrevivência dos espermatozóides e, para primatas não humanos, tem sido realizados vários estudos de criopreservação de sêmen onde são testados ajustes nas fórmulas de diluentes de modo a otimizar a sobrevivência dos espermatozóides pós-descongelação do sêmen.

O glicerol é largamente utilizado e alguns trabalhos demonstram que este em concentrações excessivas pode causar diminuição na capacitação espermática (LI *et al.*, 2005a), demonstrado-se tóxico para espermatozóides de *Callitrix jacchus* (MORREL *et al.*, 1997 *apud* MORREL; HODGES, 1998). Si e colaboradores (2004) realizaram estudo comparativo da ação do glicerol e DMSO em diferentes concentrações (2%, 5%, 10% e 15%) atuando em sêmen de *Macaca mulatta* e o glicerol 5% demonstrou-se melhor que ele próprio em outras concentrações que o DMSO. Para Morrell e Hodges (1998), a concentração deste crioprotetor

quando presente na fórmula do diluente deve variar de 4 a 7% para revelar melhores efeitos. Fórmulas de diluentes contendo TES (ácido N-Trishidroximetil-metil-2-aminometano-sulfônico) e TRIS (hidroximetil aminometano) já foram utilizadas na criopreservação de sêmen de espécies de primatas do velho mundo como *Clorocebus aetiops* (SEIER *et al.*, 1993) e *Macaca fascicularis* (SANKAI *et al.*, 1994; LI *et al.*, 2005b; MAHONE; DUKELOW, 1978; TOLLNER *et al.*, 1990), não sendo encontrado nenhum relato do uso de diluentes a base de TES ou TRIS para sêmen de espécies do gênero *Ateles*.

Li e colaboradores (2003) realizaram experimento que demonstrou que a adição de aminoácidos como glicina, glutamina e prolina podem melhorar a performance de criodiluentes a base de TES e TRIS, por melhorar a habilidade de formar uma camada protetora sobre os espermatozóides a partir da combinação das moléculas potencialmente positivas com os grupos fosfato da membrana fosfolipídica espermática.

O TES (ácido N-trishidroximetil-metil-2-aminometano-sulfônico) é uma substância tampão não-eletrolítica, componente do diluente homônimo. O diluente TES é atualmente utilizado para diversas espécies de mamíferos como bovinos (CEBRAN, 2003)² e bubalinos (VALE, 1994). Segundo o CEBRAN (2003)², o TES apresenta um custo de aproximadamente vinte e cinco dólares por litro, contra um valor de três dólares por litro do Ringer-Lactato, representando um custo de aproximadamente 12% por dose produzida com uso do Ringer Lactato em comparação ao TES. Entretanto o Ham's F10, um criodiluyente já industrializado pela indústria Irvine Scientific, na Califórnia (EUA) (SWANSON *et al.*, 1994) e o TALP-HEPES (AGCA *et al.*, 2005), também são utilizados para espécies de primatas não-humanos, principalmente para espécies do velho mundo como os chimpanzés (GOULD; STYPEREK,

² Informação cedida pela Central de Biotecnologia e Reprodução Animal da UFPA.

1989).

O Ringer Lactato é uma solução utilizada mais comumente na terapia humana e veterinária, possui também lactose que, segundo Balieiro (1993), apresenta a propriedade de proteger as membranas celulares reduzindo o percentual de patologia dos espermatozóides, mas vem sendo mais recentemente utilizado como um eficiente diluente. A solução de Ringer-lactato já foi comprovada como bom diluidor de sêmen de búfalos no experimento de Silva *et al.* (2002), onde recebeu o nome de CEBRAN II, por ter sido desenvolvida uma formulação específica deste diluente nesta Central de Reprodução. Neste experimento, o Ringer Lactato se mostrou tão eficiente quanto o TES para manutenção da motilidade e vigor dos espermatozóides de bubalinos após descongelação, apresentando ambos índices similares. Ribeiro (2003)³ também encontrou um alto índice de eficiência (53,3%) do Ringer Lactato como diluente para sêmen de bubalinos, no uso a campo, porém este diluente ainda não foi testado em sêmen de espécies de *Ateles*, somente para *Alouatta caraya* em experimento realizado sem finalidade de criopreservação, tendo mostrado-se significativamente diferente para motilidade em relação ao diluente TES também testado neste experimento ($74\pm 20\%$ e $71\pm 20\%$, respectivamente) (VALLE *et al.*, 2004b).

³ Informação verbal obtida com o Prof.Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro

3. OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Contribuir para o estudo dos parâmetros andrológicos e a criopreservação de sêmen do primata não-humano neotropical do gênero *Ateles*.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer protocolo de colheita de sêmen em *Ateles* para eletroejaculação.
- Mensurar parâmetros andrológicos dos animais utilizados.
- Analisar as características físico-químicas dos sêmens colhidos.
- Avaliar motilidade, vigor e tempo de resistência relacionados à qualidade dos diluentes nas fases pré e pós-congelação com soluções a base de Ringer-Lactato e TES, comparativamente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO

Foram utilizados 06 exemplares machos adultos (variando de 07 a 10 anos), criados desde a idade infantil em cativeiro, e pertencentes ao gênero *Ateles*, espécies *Ateles marginatus* (02 animais) e *Ateles paniscus* (04 animais) mantidos em 03 (três) gaiolas no setor de exposição, medindo 48,18 m² cada, no Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS/MS).

Todos os exemplares eram mantidos em grupos reprodutivos, com uma ou mais fêmeas na mesma gaiola, sendo estes:

Grupo 1: 02 (dois) machos adultos (AI-AAB e AI-AAD).

Grupo 2: 02 (dois) machos adultos (AI-AAS e AI-AAL).

Grupo 3: 02 (dois) machos adultos (AK-AAD e AK-AAE).

Os animais estudados receberam dieta à base de frutas, legumes e verduras variadas, ovos e leite com suco de maracujá (três vezes por semana) e ração canina balanceada (Fox Junior®).

Os animais deste experimento puderam ser identificados através da leitura de seus microchips, implantados sub-cutaneamente próximo à região interescapular, e também através de tatuagem impressa na região interna do membro posterior direito, onde eram reconhecidos através de um protocolo de cinco letras, sendo as duas primeiras letras correspondentes à espécie a que pertencia o indivíduo.

Todos haviam recebido medicação profilática contra endoparasitas intestinais e apresentavam condições clínicas satisfatórias.



Figura 3: Aspectos de uma das gaiolas onde são mantidos os exemplares de *Ateles* no CENP



Figura 4: *Ateles marginatus* mantido em cativeiro no CENP

4.2- CONTENÇÃO QUÍMICA E FÍSICA

Os animais utilizados foram previamente anestesiados com Cloridrato de Ketamina, na dosagem de 10 mg/kg, e Cloridrato de Xilazina, dosagem de 1 mg/kg, associados, após contenção física com puçá. É importante frisar que os animais estiveram em jejum sólido 18 horas antes das aplicações de anestésicos.

4.3- AVALIAÇÃO CLÍNICA-ANDROLÓGICA E BIOMETRIA TESTICULAR

Todos os animais, após a anestesia, foram previamente avaliados sob a ótica clínica, através da mensuração da frequência cardíaca e respiratória, além de anamnese total, para que houvesse confirmação da sanidade destes e segurança na utilização da medicação anestésica.

No exame andrológico foram mensurados a consistência de testículos, mobilidade e reação cremaster e também foi realizada biometria testicular avaliando circunferência escrotal, com auxílio de fita métrica, comprimento e largura de testículos, com auxílio de paquímetro metálico profissional.



Figura 5: Mensuração de testículo em *Ateles*

4.4- ELETROEJACULAÇÃO

Foi utilizado um eletroejaculador modelo MSF 95, protótipo desenvolvido no laboratório de neurociências da Universidade Federal do Pará, com voltagem (de 1 a 14 V) e frequência ajustáveis. O eletrodo utilizado foi fabricado artesanalmente com tubo de silicone e duas tiras longitudinais metálicas de aço inoxidável, medindo 13 cm de comprimento (7cm de tiras metálicas e 6 cm de seringa plástica) x 0,85 cm de diâmetro. Após a mensuração de parâmetros andrológicos foram realizados os seguintes procedimentos:

- a- posicionamento do animal em decúbito lateral em mesa de procedimentos clínicos;
- b- exposição do pênis e limpeza deste com compressa de algodão umedecida com solução fisiológica e depois, compressa de algodão seca;
- c- Lubrificação do eletrodo com pomada de vaselina;
- d- Introdução do eletrodo no reto, direcionando ventralmente, para obter contato mais próximo possível com a próstata;
- e- Posicionamento do tubo coletor no pênis exposto;
- f- Início dos estímulos elétricos.



Figura 6: Eletroejaculador MSF 95.



Figura 7: Probe utilizada no experimento.



Figura 8: Posicionamento do pênis no tubo coletor

O protocolo sequencial de estímulos utilizados foi de 90 estímulos elétricos divididos em três séries de 30 estímulos, onde:

1ª série: 10 estímulos de 2V; 10 estímulos de 3V e 10 estímulos de 4V, todos em baixa frequência.

2ª série: 10 estímulos de 3V; 10 estímulos de 4V e 10 estímulos de 5V, com frequência crescente de baixa a média.

3ª série: 10 estímulos de 4V; 10 estímulos de 5V e 10 estímulos de 6V, com frequência crescente de média à contínua (nos três estímulos finais).

O protocolo utilizou metodologia adaptada à descrita por Valle e colaboradores (2004a). Foram realizadas três colheitas em cada exemplar deste experimento, espaçadas por um intervalo mínimo de 09 dias e máximo 15 de dias. Somente um exemplar não realizou a última colheita por ter vindo a óbito em data anterior a esta colheita.

4.5- AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SÊMEN

O volume total foi avaliado somando os ejaculados provenientes das 3 séries de estímulos elétricos, colhidos em um tubo coletor de plástico graduado de 50 ml. Após mensuração do volume, os ejaculados foram imediatamente analisados quanto a cor, aspecto e pH do conteúdo, utilizando fita reativa para pH, para descartar a presença de urina na amostra.

A concentração foi analisada em câmara de NeuBauer, para contagem hematocimétrica, utilizando 0,25 ml do ejaculado obtido de cada animal durante a 2ª colheita, diluídos em meio TES (2 diluente:1 sêmen) e homogeneizados a 2 ml de formol salino a 10%. Após contagem dos espermatozoides na câmara de NeuBauer, aplicou-se a fórmula a seguir para obtenção da concentração espermática em milhões/ml:

$$n^{\circ} \text{ de espermatozoides contados} \times 27 \times 10 \times 1000 = n^{\circ} \text{ de espermatozoides/ml}$$

onde 27 → fator de diluição.

10 → fator de medida da câmara utilizada.

1.000 → fator multiplicador para obtenção do resultado em ml.

4.6- DILUENTES UTILIZADOS

Os diluentes utilizados neste experimento foram o TES (anexo 1) e o diluidor a base de Ringer Lactato denominado CEBRAN II (anexo 2). Ambos foram preparados na Central de Biotecnologia Reprodutiva Animal da UFPA, conservados em freezer e descongelados a cada dia de colheita, trinta minutos antes do início das colheitas, em água a temperatura ambiente.

Para assegurar melhor qualidade os diluentes tiveram pH ajustados para valor 8.0 no momento da preparação da solução-mãe, de forma a aproximar-se do pH do sêmen dos animais.

4.7- AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE E VIGOR DO SÊMEN A FRESCO E DILUÍDO

20 µl de cada ejaculado obtidos a cada colheita foram adicionados à mesma quantidade dos diluentes TES e CEBRAN II, em lâmina pré-aquecida a 37°C, para avaliação de motilidade, vigor e do tempo de resistência dos espermatozóides nos diluentes.

Ao mesmo tempo, outros 20 µl do sêmen fresco eram colocados também em lâmina pré-aquecida a 37°C para avaliar motilidade, vigor e tempo de resistência dos espermatozóides em condições externas.

É importante ressaltar que estas análises só puderam ser realizadas em ejaculados com aspecto gelatinoso menos firme ou líquido.

4.8- DILUIÇÃO E CONGELAÇÃO DOS SEMENS OBTIDOS

Após a colheita, os ejaculados com maiores volumes foram diluídos, em proporção de 2:1, ainda nos próprios tubos coletores, tanto com o diluente TES como com o diluente a base

de Ringer Lactato (CEBRAN II). Os tubos eram levados à refrigeração durante 1 hora, para que fosse possível não parar a colheita para obtenção de novos ejaculados no mesmo animal. Após esta primeira hora, o produto da diluição foi envasado em minitubos (capacidade 0,25 ml) vedados com massa de modelar atóxica e devidamente identificados com a tatuagem do animal, diluente utilizado e data de envase.



Figura 9: Minitubo identificado utilizado para envasamento do sêmen.

Terminado o envasamento, os minitubos foram levados ao processo de congelamento seguindo protocolo utilizado pelo CEBRAN:

- Após refrigeração, os minitubos foram colocados em freezer (4°C) por 02 horas.
- 20 minutos imersos em vapor de nitrogênio líquido (-60°C) em uma caixa de isopor com capacidade de 30 litros, contendo grade de aço inoxidável suspensa a 10 cm do nível de nitrogênio líquido.
- Imersão dos minitubos em botijão contendo nitrogênio líquido (-196 °C).

4.9- PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS

Uma gota ou pequena fração de um dos ejaculados de cada animal foi colocada sobre lâmina de microscopia, para realização de esfregaço e posterior coloração com o método Cerovski para avaliação de patologias espermáticas.

Para confirmação das patologias espermáticas encontradas após esfregaço e coloração do sêmen a fresco, uma gota dos mesmos sêmens liquefeitos após as 48 horas em banho-maria a 37°C, foi colocada sobre uma lâmina de microscopia, para realização de esfregaço e posterior coloração também com o método Cerovski.

Na contagem utilizada foram observados 100 espermatozoides em microscopia de contraste de fase utilizando objetiva de 100x, em óleo de imersão, segundo a metodologia utilizada na CEBRAN e preconizada por Vale (1994; 1997).

4.10- TESTE DE TERMO RESISTÊNCIA (T.T.R.)

A descongelação das doses para avaliação de termo-resistência foi realizada no laboratório de processamento de sêmen da CEBRAN/UFPA.

Os minitubos congelados foram imersos em banho-maria a 37° C por 5 minutos e, posteriormente, uma gota de cada dose foi avaliada quanto a motilidade (%) e vigor, considerando uma escala de 1 a 5, utilizando microscópio de contraste de fase, correlacionando o meio criopreservador com o sêmen avaliado. Novas avaliações de motilidade e vigor foram observadas após meia hora. (RIBEIRO *et al.*, 1991).

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de biometria testicular, concentração espermática, os parâmetros físico-químicos dos sêmens frescos, diluídos e pós-TTR foram analisados através de média aritmética, desvio padrão e variação de valores mínimos e máximos encontrados.

Aos resultados de patologias espermáticas e volume obtido dos ejaculados de animais também foram aplicados média, desvio-padrão e variação, além do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

6.1- AVALIAÇÃO CLÍNICA-ANDROLÓGICA E BIOMETRIA TESTICULAR

Todos os exemplares apresentaram simetria e mobilidade dos testículos e reação cremaster normais (Tabela 1). Apenas um exemplar (AI-AAS) demonstrou ter consistência do testículo direito menos firme, em relação ao testículo esquerdo.

Em relação ao prepúcio e pênis, todos os exemplares não apresentaram quaisquer anormalidades. Somente em um exemplar (AI-AAL) foram observadas algumas pequenas pústulas nos bulbos capilares dos sacos escrotais.

Tabela 1: Valores mínimo, máximo, média, desvios-padrões e coeficientes de variação de biometria testicular para *Ateles paniscus* e *Ateles marginatus* do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS-MS).

	Circunferência escrotal (cm)		Comprimento (cm)		Largura (cm)	
	Testículo direito	Testículo esquerdo	Testículo direito	Testículo esquerdo	Testículo direito	Testículo esquerdo
<i>Ateles paniscus</i>						
Valor mínimo	7,0	6,5	2,5	2,6	1,9	2,1
Valor máximo	8,0	8,0	2,9	2,9	2,4	2,2
Média (cm) e DP	7,5 ±0,35	7,275 ±0,57	2,67 ±0,14	2,77 ± 0,12	2,12 ±0,19	2,17 ±0,04
<i>Ateles marginatus</i>						
Valor mínimo	5,8	6,0	2,4	2,6	1,8	1,8
Valor máximo	7,5	7,8	2,4	2,8	2,0	1,9
Média (cm) e DP	6,65 ±0,85	6,9 ±0,9	2,4 ±0	2,7 ±0,1	1,9 ±0,1	1,85 ±0,05

DP= Desvio-padrão

6.2- RESULTADOS DAS COLHEITAS POR ELETROEJACULAÇÃO

Todos os animais ejacularam em todas colheitas realizadas, pelo menos uma vez a cada série.

O tempo mínimo para obtenção de ejaculado, com o método utilizado, foi de 1 minuto e 11 segundos e o tempo máximo foi de 4 minutos e 17 segundos.

Observou-se que, próximo ao momento da ejaculação, o pênis apresentava ereção com aumento do tamanho da glândula em até 4 vezes o seu tamanho em estado não ereto.



Figura 10: Pênis de *Ateles* relaxado momentos antes da colheita.



Figura 11: Pênis ereto de *Ateles* apresentando glândula aumentada no momento da ejaculação.

A grande maioria dos ejaculados obtidos (85,18%) apresentava aspecto gelatinoso firme, característico de sêmen de primatas não humanos. Somente quatro ejaculados obtidos apresentavam aparência líquida, porém transformavam-se em poucos segundos em consistência gelatinosa firme. Somente um destes ejaculados líquidos não adquiriu posteriormente esta consistência e este, à observação em microscopia ótica, não apresentou nenhum espermatozóide presente, caracterizando tratar-se de líquido seminal.



Figura 12: Aspecto gelatinoso consistente de ejaculado em *Ateles* do Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS/MS)

6.3- RESULTADOS DA AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SÊMEN

A cor dos ejaculados obtidos variou de translúcido a branco leitoso. Todas as amostras apresentaram pH 8. A média geral de volume dos ejaculados obtidos nas 3 colheitas realizadas foi de 1,94 ml ($\pm 0,83$). A média de volume de ejaculado obtidos a cada colheita pode ser observada na Tabela 2. A estes resultados foi aplicado o teste Kruskal-Wallis que demonstrou não haver diferença estatística significativa entre as médias obtidas nas colheitas (1,07 onde P-value = 0,58). A média da concentração espermática dos ejaculados obtidos, somente na 2^a colheita, foi de 3.020.000 spz/ml ($\pm 275,97$) (Tabela 3).

Tabela 2: Valores encontrados de média, desvio-padrão, valores mínimos e máximos, de volumes de ejaculado obtidos nas colheitas realizadas para primatas não humanos *Ateles* do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS-MS)

COLHEITAS	1	2	3
Média (ml)	1,68	1,92	1,26
DP	1,02	1,21	1,55
Valor mínimo (ml)	0,35	0,25	0,30
Valor máximo (ml)	3,00	3,3	4,0
N	6	6	5*

DP= Desvio-padrão

n= números de animais utilizados

* o animal AI-AAL veio a òbito, não participando da terceira colheita.

Tabela 3: Valores encontrados de média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo, de concentração espermática de ejaculados de primatas não humanos *Ateles* do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS-MS)

	Concentração espermática (n° sptz x 10⁴/ml)
Valor mínimo	54
Valor máximo	810
Média	302
DP	275,97

DP= Desvio-padrão

Sptz = espermatozóides

6.4- RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE E VIGOR DO SÊMEN A FRESCO E DILUÍDO

Houve a possibilidade de realizar esta análise com ejaculados obtidos de apenas 03 animais (02 *Ateles paniscus* e 01 *Ateles marginatus*), pois somente estes ofereceram sêmen com pelo menos 01 ejaculado líquido ou com aspecto gelatinoso menos firme, em condições ideais para esta análise. Como há somente 03 amostras para descrever os resultados obtidos, não foi possível realizar análise estatística. Abaixo, observa-se em tabelas (Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6) a análise descritiva desta avaliação realizada nos animais AK-AAD, AI-AAB e AI-AAD; onde o momento 0 (zero) refere-se ao momento de análise logo após a ejaculação.

Tabela 4: Resultado da avaliação de motilidade e vigor do sêmen a fresco e diluído do animal AK-AAD

	Sptz in natura		Com TES		Com Ringer	
	motilidade	vigor	motilidade	vigor	Motilidade	Vigor
Momento 0 (zero)	60%	3	60%	3	60%	3
Após 30 minutos	0%	0	40%	2	10%	1
Após 3 horas	-	-	30%	2	0%	0

OBS: Os SPTZ avaliados nesta amostra com TES vieram à óbito 12 horas após a colheita. As lâminas eram mantidas em condições de temperatura ambiente (28°C).

Tabela 5: Resultado da avaliação de motilidade e vigor do sêmen a fresco e diluído do animal AI-AAB

	Sptz in natura		Com TES		Com Ringer	
	motilidade	vigor	motilidade	vigor	Motilidade	Vigor
Momento 0 (zero)	20%	1	0%	0	0%	0
Após 30 minutos	0%	0	0%	0	2%*	0

* Foram encontrados x espermatozóides se locomovendo na lâmina analisada.

Tabela 6: Resultado da avaliação de motilidade e vigor do sêmen a fresco e diluído do animal AI-AAD

	Sptz in natura		Com TES		Com Ringer	
	motilidade	vigor	Motilidade	vigor	Motilidade	Vigor
Momento 0 (zero)	30%	2	10%	1	0%	0
Após 30 minutos	2%	0	2%	1	0%	0

6.5- TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA

Os resultados deste teste demonstraram que somente as amostras com sêmen criopreservado dos mesmos 03 animais citados acima exibiram espermatozóides vivos e apresentando motilidade vigor. Semelhante à avaliação de motilidade e vigor do sêmen a fresco e diluído, não foi possível realizar análise estatística, devido ao baixo número de amostras com valores. Abaixo, observa-se em tabelas a análise descritiva desta avaliação nos animais AK-AAD, AI-AAB e AI-AAD; onde o momento 0 refere-se ao momento de análise logo após descongelamento (Tabela 7, Tabela 8 e Tabela 9).

Tabela 7: Resultado do teste de termo-resistência do animal AK-AAD

	Com TES		Com Ringer	
	motilidade	vigor	motilidade	Vigor
Momento 0 (zero)	20%	1	0%	0
Após 30 minutos	5%	1	0%	0

Tabela 8: Resultado do teste de termo-resistência do animal AI-AAB

	Com TES		Com Ringer	
	motilidade	vigor	motilidade	Vigor
Momento 0 (zero)	0%	0	0%	0
Após 30 minutos	0%	0	2%	0

Tabela 9: Resultado do teste de termo-resistência do animal AI-AAD

	Com TES		Com Ringer	
	motilidade	vigor	motilidade	Vigor
Momento 0 (zero)	10%	1	0%	0
Após 30 minutos	2%	1	0%	0

6.6- PATOLOGIAS ESPERMÁTICAS ENCONTRADAS

Todos os animais apresentaram alto índice de patologias espermáticas nos ejaculados observados (54% a 79%). A média de patologias espermáticas encontradas foi de 69,16% na 1ª colheita (Tabela 10) e de 70,75% na 2ª colheita (Tabela 11), observando que nesta última colheita não foi possível a avaliação em 02 animais (AI-AAL e AI-AAS) por estas amostras não terem apresentado espermatozóides no exame de esfregaço do ejaculado. Foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, onde não foi observada diferença estatística significativa entre as duas médias (0,1840 onde P-value = 0,6679).

A maior parte das patologias encontradas foram defeitos maiores (59,8% ± 8,4) como: cauda fortemente dobrada (figura 13), pequeno, piriforme e cabeça pequena. Sendo a cauda fortemente dobrada (28,16% ± 3,62 na 1ª colheita e 25,16% ± 18,46 na 2ª colheita) o mais freqüente entre estes. Os defeitos menores (40,19% ± 8,4) mais encontrados foram: gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal e cabeça isolada. Sendo a cabeça isolada (24,66% ± 6,59 na 1ª colheita e 10,66% ± 8,23 na 2ª colheita) o mais freqüente entre estes. A Figura 14 demonstra espermatozóide encontrado com aspecto normal, para efeito comparativo.

Tabela 10: Patologias espermáticas encontradas nos ejaculados da 1ª colheita de *Ateles* do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS-MS).

<i>N</i>	<i>Média (%)</i>	<i>D.P.</i>	<i>Valor mínimo (%)</i>	Valor máximo (%)
6	69,16	10,45	54,00	79,00

D.P.= desvio-padrão

Tabela 11: Patologias espermáticas encontradas nos ejaculados da 2ª colheita de *Ateles* do Centro Nacional de Primatas (CENP/SVS-MS)

<i>N</i>	<i>Média (%)</i>	<i>D.P.</i>	<i>Valor mínimo (%)</i>	Valor máximo (%)
4	70,75	7,85	59,00	75,00

D.P.= desvio-padrão

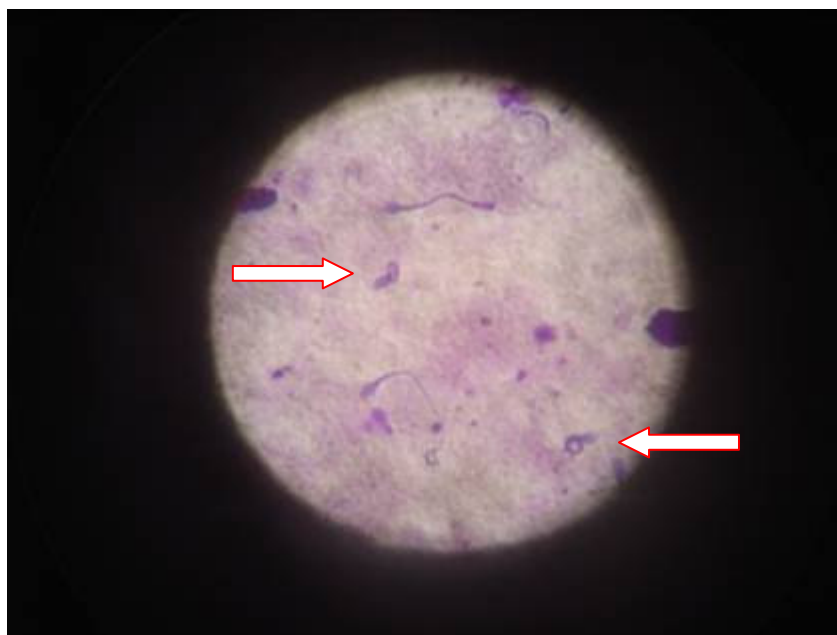


Figura 13: Caudas fortemente dobradas encontradas em espermatozoides de ejaculado de *Ateles* do Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS/MS) (microscopia de contraste de fase x100, ph2)

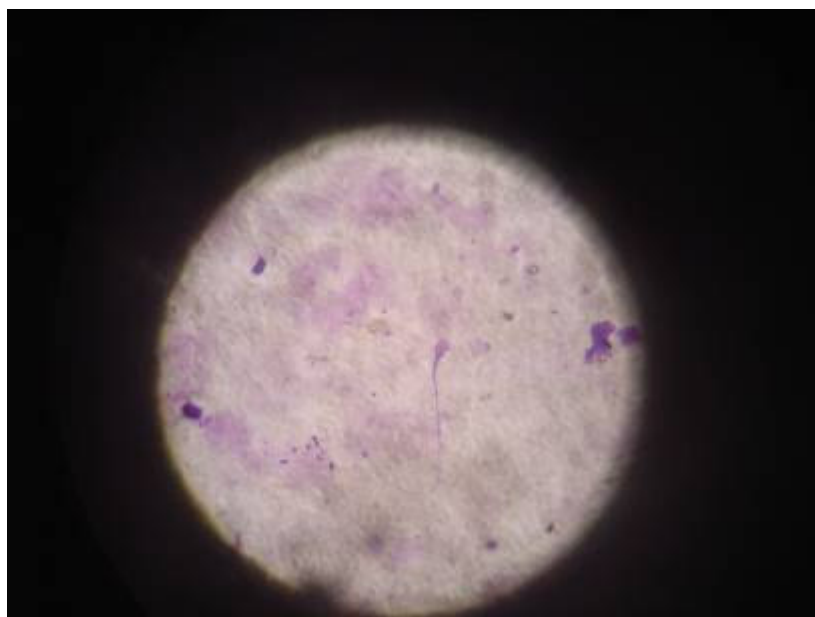


Figura 14: Espermatozóide normal de ejaculado de *Ateles* do Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS/MS) (microscopia de contraste de fase x100, ph2).

Os resultados encontrados na avaliação clínica e biometria testicular demonstram que todos os utilizados aparentavam estar em condições de utilização em programas de reprodução assistida. As médias encontradas nas medidas realizadas nos testículos direito e esquerdo não possuíram diferença significativa.

Foi alcançado sucesso na obtenção dos ejaculados, com nenhuma amostra contaminada por urina, em todas as colheitas realizadas, e com tempo médio para ejaculação menor que o relatado para espécies da mesma família (VALLE, 2002; MORELAND *et al.*, 2001, em *Alouatta caraya*). Desta forma, o protocolo de eletroestímulos utilizado demonstrou-se eficiente para primatas do gênero *Ateles*. Moreland e colaboradores (2001) realizaram protocolo semelhante em outra espécie de Atelídeo, *Alouatta caraya*, sendo que obtiveram 28% das amostras contaminadas por urina. Já Valle e seus colaboradores (2004) também utilizando protocolo semelhante, iniciando os estímulos com 02 volts, não obtiveram nenhuma amostra contaminada. O resultado indica que a posição da probe utilizada no experimento foi correta, pois a contaminação do sêmen com urina acontece quando há estimulação simultânea da bexiga e glândulas acessórias realizada pela probe mal posicionada (MORELAND *et al.*, 2001).

Houve coagulação seminal em todos os ejaculados colhidos, com exceção da amostra não coagulada relatada no capítulo Resultados (página 43), e, quando estes ejaculados apresentavam-se líquidos no momento da ejaculação, estes coagulavam rapidamente, o que também foi encontrado por Dixson e Anderson (2002) e Hernández-López e colaboradores (2002a; 2002b) em seus experimentos com *Ateles geoffroyi*, estes ainda observaram que a formação de coágulo em *Ateles* seja decorrente do encontro do fluido seminal com o fluido prostático que ocorre tanto na cópula natural ou masturbação quanto durante a eletroejaculação. Para desfazer o coágulo e realizar a análise seminal completa, os últimos

autores utilizaram solução a base de tripsina, entretanto observaram também que a sua utilização na liquefação do coágulo pode digerir a membrana espermática e aumentar significativamente os valores de concentração espermática. Neste experimento não foi utilizada tripsina para dissolução dos coágulos porque o seu uso poderia modificar os resultados provenientes da observação do comportamento do sêmen pós-diluído.

As médias de volume e concentração encontradas são menores que as encontradas por Hernández –López e colaboradores (2002) para *Ateles geoffroyi*, demonstrando uma possível má qualidade dos sêmens, porém é importante lembrar que não foi utilizado nenhum método enzimático para dissolução dos coágulos, o que possivelmente explica a diferença nos resultados deste trabalho e de outros mencionados. Os mesmos autores também sugerem que o sêmen nestes animais torna-se de melhor qualidade durante a estação seca, pois estes realizaram experimento comparativo entre as características seminais dos mesmos animais colhidos em duas estações da cidade do México: a estação seca e a estação chuvosa. Uma revisão realizada por Ewing (1982) descreve que à época de picos de nascimento e estação reprodutiva, os machos de primatas não humanos apresentam um incremento no comportamento sexual, índices de testosterona e espermatogênese e, ainda, que o fotoperíodo é um importante fator relacionado à indução da estação reprodutiva, tanto em primatas humanos como não humanos, sendo também a sazonalidade reprodutiva um importante complexo interativo entre o animal e o ambiente social. Milton (1981) descreve que há sazonalidade reprodutiva para *Ateles geoffroyi* e *Ateles belzebul* de vida livre.

As observações deste experimento acerca da qualidade do sêmen também sugerem que Symington (1987) pode estar correto quanto à dominância interferindo no sucesso reprodutivo. Observações realizadas durante o experimento, em cada gaiola/grupo dos animais utilizados, sugerem que havia um macho que apresentava caracteres e

comportamento de dominância em cada grupo (AI-AAD no Grupo 1, AI-AAS no Grupo 2 e AK-AAD no Grupo 3), embora estes machos não apresentassem as maiores medidas na biometria testicular, apresentavam maior concentração espermática no ejaculados analisados, sugerindo uma melhor qualidade de sêmen em relação ao outro macho do mesmo grupo. Symington (1987) sugeriu que os machos adultos de *Ateles* apresentam dominância identificada pelo comportamento e tamanho do corpo e que esta dominância é positivamente correlacionada com o sucesso reprodutivo, pois somente os machos dominantes ou alfa são hábeis em monopolizar as fêmeas em estro.

Hernández -López e colaboradores (2002) também encontraram valores de concentração espermáticas maiores para os machos alfa do experimento, mas não afirmaram tratar-se de consequência de supressão reprodutiva imposta ao macho ômega ou se são características idiossincráticas dos animais como baixo índice de testosterona, altos níveis de cortisol, etc.; pois não foram realizadas análises neste experimento que as confirmem. Em *Cebus apella* o mesmo fenômeno foi observado analisando-se sêmens de machos em cativeiro (BUSH *et al.*, 1975). Pesquisas direcionadas a esta hipótese são necessárias para confirmar esta possibilidade.

Vandevoort (2004) afirma que o método de colheita seminal pode interferir na qualidade do ejaculado e também o fato do animal ter se masturbado e ejaculado antes da colheita. Particularmente, neste experimento procuramos realizar as colheitas no período da manhã para evitar a ejaculação natural dos animais antes das colheitas, porém em um dos animais (AK-AAE) observamos coágulo seminal aderido ao seu pênis em duas das três colheitas realizadas.

O estresse contínuo imposto aos animais também pode interferir na qualidade do ejaculado (CUI, 1996). A contenção física realizada anterior à contenção química dos animais

causa estresse de contenção, o que também pode ter influenciado nas características dos sêmens aqui observadas.

Quanto ao resultado da avaliação de motilidade e vigor do sêmen a fresco e diluído e pós-descongelamento, apenas podemos sugerir que o diluente TES demonstra-se mais eficiente para viabilização de espermatozoides de *Ateles*, pois o número de amostras onde pudemos acompanhar estas análises foi insuficiente para realizar qualquer afirmação sobre a eficiência dos diluentes propostos. Diluentes a base de TES já demonstraram boa utilização na criopreservação de sêmen de outras espécies como *Clorocebus aetiops* (SEIER *et al.*, 1993) e *Macaca fascicularis* (SANKAI *et al.*, 1994; LI *et al.*, 2005b; TOLLNER *et al.*, 1990; VALLE *et al.*, 2004b).

Sabe-se que fatores como diferenças individuais, estação, método de colheita, componentes do diluente, o pH do diluente e a escolha do crioprotetor têm enorme influência sobre a viabilidade de espermatozoides pós-congelamento (AGCA *et al.*, 2005). O pH do diluente variando entre 7,2 a 8,0 leva a um melhor desempenho de motilidade dos espermatozoides após descongelamento (MAHONEY; DUKELOW, 1978).

A porcentagem de glicerol presente nos diluentes também pode influenciar. A porcentagem deste crioprotetor presente tanto no diluente CEBRAN II quanto no diluente a base de Ringer utilizados neste experimento foi de 7%. Si e colaboradores (2004) observaram que diluentes contendo 5% de glicerol mostraram-se mais eficientes atuando em sêmen de *Macaca mulatta*. Enquanto Tollner (1990) observou melhor performance deste crioprotetor em concentração a 3% em sêmen de *Macaca fascicularis*.

Sendo o Ringer lactato uma solução a base de sais minerais, esta composição pode ter influenciado nos resultados observados, pois Li e colaboradores (2005) relatam que na congelamento do sêmen de bovinos, ratos e macaco Rhesus, a motilidade caiu drasticamente na

pós-descongelamento devido a exposição à íons de sal.

Em relação ao alto índice de patologias espermáticas encontrado nos ejaculados deste experimento, podemos correlacioná-lo há vários fatores como o já citado *stress* imposto a animais de cativeiro, possível consangüinidade ou também à época em que as colheitas foram realizadas (novembro), que se insere no início da estação chuvosa e fim da estação seca na região amazônica, remetendo novamente à hipótese da sazonalidade reprodutiva já discutida nos resultados de análise seminal, embora a sazonalidade reprodutiva tenha sido relatada apenas em *Ateles geoffroyi* e *Ateles belzebul* de vida livre e aparentemente não se aplique a animais destas espécies em cativeiro (Milton, 1981).

Outros autores (LANZENDORF *et al.*, 1990) afirmam ainda que o sêmen obtido através de eletroejaculação revela valores significativamente mais altos de patologia espermática em relação àquele colhido com outros métodos, sendo observada principalmente a presença de gotas citoplasmáticas sugerindo a colheita de células imaturas.

CONCLUSÃO

8- CONCLUSÃO

- O protocolo de colheita de sêmen e a probe utilizados demonstraram ser eficientes para as espécies *Ateles paniscus* e *Ateles marginatus*.
- Todos os animais utilizados no experimento apresentaram boa avaliação andrológica dos órgãos sexuais.
- Há um alto índice de patologias espermáticas, sobretudo defeitos maiores, no sêmen de exemplares machos de *Ateles paniscus* e *Ateles marginatus* mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas.
- O diluente TES aparenta ser um bom diluente a ser utilizado na criopreservação de sêmen de primatas não humanos *Ateles*.
- Os resultados sugerem que o diluente CEBRAN II, a base de Ringer Lactato, não se demonstrou eficiente para criopreservação do sêmen de primatas não humanos do gênero *Ateles*. Porém, mais estudos são necessários para que se possa realmente afirmar que o diluente CEBRAN II não é eficiente para sêmen das espécies de *Ateles*. Alterações na sua composição são recomendadas de modo a otimizar não só a osmolaridade e pH necessários para preservação do sêmen destes primatas, mas também a concentração de crioprotetor mais próxima do ideal, assim como os antibióticos e açúcares utilizados e suas concentrações.
- É recomendável realizar colheitas nas estações chuvosa e seca nos animais utilizados para investigar a possibilidade de sazonalidade reprodutiva influenciando a qualidade seminal em animais destas espécies em cativeiro.

Referências Bibliográficas

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.

AMBOKA, J.N.O.; MWETHERA, P.G. Characterization of Semen from Olive Baboons. **Journal of Medical Primatology**, v. 32, n. 6, p. 325-329, 2003.

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

BALIERO, K.R. DE C. **Efeitos dos diluidores e das temperaturas de descongelamento sobre a motilidade progressiva e integridade acrossômica de espermatozóides de búfalos Murrah (*Bubalus bubalis*, Lin.)**. 1993. 47f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

BARNABE, R.C.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; OLIVEIRA, C.A.; BARNABE, A.H. Análise de alguns parâmetros normais de espermiograma de macaco-prego (*Cebus apella* Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n.6, 2002.

BUSH, D.F.; RUSSEL, L.H.; FLOWERS JR, A.I.; SORENSEN JR, A.M. Semen Evaluation in Capuchin Monkeys (*Cebus apella*). **Laboratory Animal Science**, v. 25, n. 5, p. 588-593, 1975.

BRASIL. Sociedade de Zoológicos do Brasil. **CENSO de Animais em Cativeiro**, 1995.

CHAPMAN, C. A.; FEDIGAN, L. M.; FEDIGAN, L.; CHAPMAN, L. J. Post-weaning resource competition and sex ratios in spider monkeys. **Oikos**, v. 54, p. 315-319, 1989.

COLD, J.C.; McGRATH, K.A. **Anatomy and Histology of the Penile and Clitoral Prepuce**. In Primates. In: *Male and Female Circumcision*. DENNISTON, G.C.; HODGES, F.M.; MILOS, M.F. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

COLD, J.C.; HUBBARD, G.B.; TARARA, R.P.; STRIBLING, L.J.V. Comparative Anatomy of the Specialized Sensory Receptors of the Primate Penis and Prepuce: Humans, Chipanzees, Baboons, Rhesus Monkey and Marmosets. **ABSTRACT**. The Apes. Challenges for the 21st Century. Chicago: Brookfield Zoo, 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.

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.

DINIZ, L.S.M. **Primatas em Cativeiro – manejo e problemas veterinários**. São Paulo: Ed. Ícone, 1997.

DINIZ, L. S. M.. **Anestesia em Animais Silvestres**. Belém: Curso de Especialização em Manejo de Animais Silvestres da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 1998. Apostila.

DIXSON, A.F.; ANDERSON, M.J. Sexual selection, Seminal coagulation and Copulatory plug formation in Primates. **Folia Primatologica**, v. 73, p. 63-69, 2002.

DIXSON, A.F. Sexual Selection and Evolution of the Seminal Vesicles in Primates. **Folia Primatologica**, v. 69, n. 5, p. 300-306, 1998.

EWING, L.L. Seasonal Variation in Primate Fertility with an emphasis on the male. **American Journal of Primatology**, v. 3, n. 1, p. 145-160, 1982.

GOULD, K.G.; MARTIN, D.E.; WARNER, H. Improved Methods for Artificial Insemination in the Great Apes. **American Journal of Primatology**, v. 8, p.61-67, 1985.

GOULD, K.G.; STYPEREK, R.P. Improved methods for freeze preservation of chimpanzee sperm. [American Journal of Primatology](#), v. 18, n. 4, p. 275 – 284, 1989.

GOULD, K.G.; YOUNG, L.G.; SMITHWICK, E.B.; PHYTHON, S.R. Semen Characteristics of the adult male chimpanzee (*Pan troglodytes*). **American Journal of Primatology**, v. 8, p. 61-65, 1993.

GOULD, K.G.; YOUNG, L.G. Functional parameters of chimpanzee (*Pan troglodytes*) sperm from ejaculates collected by rectal probe electrostimulation and by artificial vagina. **American Journal of Primatology**, v. 39, n. 2, p. 115-122, 1996.

GRIZARD, G.; CHEVALIER, V.; GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D.; BOUCHER, D. Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. **International Journal of Andrology**, v. 22, p. 190-196, 1999.

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, n. 1, p. 35-41, 2002.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; PARRA, G.C.; CERDA-MOLINA, A.L.; PÉREZ-BOLAÑOS, S.C.; SÁNCHEZ, V.D.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Digestion by Trypsin Enhances Assessment of Sperm Parameters in the Black-handed Spider Monkey (*Ateles geoffroyi*). **Laboratory Primate Newsletter**, v. 41, n. 3, p. 4-6, 2002.

HOWARD, J. G. Semen Collection and Analysis in Carnivores. In: FOWLER, M. E. **Zoo and Wild Animal Medicine**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. p. 390-398.

IBAMA. Anexo à Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003, do Ministério do Meio Ambiente. **Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção**.

KUEDERLING, I.; MORREL, 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.

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, 1967.

LANZENDORF, S.E.; GLESSMAN, 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.

LEWIS, R.W.; KIM, J.C.; IRANI, D.; ROBERTS, J.A. The prostate of the nonhuman primate: normal anatomy and pathology. **Prostate**, v. 2, n. 1, p. 51-70, 1981.

LI, Y.; SI, W.; ZHANG, X.; DINNYES, A.; JI, W. Effect of Amino Acids on Cryopreservation of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Sperm. **American Journal of Primatology**, v. 59, p. 159-165, 2003.

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

LI, Y.; CAI, K.; KOVACS, A.; JI, W. Effects of Various Extenders and Permeating Cryoprotectants on Cryopreservation of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 3, 2005.

MAHONE, J.P.; DUKELOW, W.R. Semen Preservation in *Macaca fascicularis*. **Laboratory Animal Science**, v. 28, n. 5, p. 556-561, 1978.

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

MASTROIANNI, L.; MANSON, W.A. Collection of Monkey Semen by Electroejaculation. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 112, p. 1025-1027, 1963.

MCFARLAND SYMINGTON, M. Demography, Ranging Patterns, and Activity Budgets of the Black Spider Monkeys (*Ateles paniscus chamek*) in the Manu National Park, Peru. **American Journal of Primatology**, n. 15, p. 45-67, 1988.

MILTON, K. Estimates of Reproductive Parameters of Free-ranging *Ateles geoffroyi*. **Primates**, v. 4, n. 22, p. 574-579, 1981.

MORATO, R.G. & BARNABE, R. C. Biotécnicas de Reprodução Aplicadas à Preservação de Felídeos Selvagens. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano III, n. 12, p. 24-26, 1998.

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.

MORREL, J.M.; KUEDERLING, 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.

MORREL, J.M.; NOWSHARI, M.; ROSENBUSCH, J.; NAYUDU, P.L.; HODGES, J.K. Birth of offspring following artificial insemination in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. **American Journal of Primatology**, v. 41, n.1, p. 37-43, 1997.

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

NORCONK, M., W. KINZEY. Challenge of Neotropical Frugivory: Travel Patterns of Spider Monkeys and Bearded Sakis. **American Journal of Primatology**, n. 34, p. 171-183, 1994.

PRATT, P.W. Laboratory Procedures for Veterinary Technicians. 3 ed. St Louis: Mosby, 1996. p. 597-604.

RIBEIRO, H.F.L.; SILVA, A.O.A.; SOUSA, J.S. & VALE, W.G. The use of thermoresistance teste for water buffalo semen (preliminary report). In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 1991, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: 1991.

ROUSSEL, J.D.; AUSTIN, C.R. Improved electro-ejaculation of primates. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.19, p.22-32, 1968.

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

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

SANKAI, T.; TERAOKA, K. et al. Cryopreservation of Spermatozoa from Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 101, p. 273-278, 1994.

SANKAI, T.; SHIMIZU, K.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y. In vitro Fertilization of Follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in Japanese Monkeys (*Macaca fuscata*). **Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 58-62, 1997.

SEAGER, S.W.J.; WILDT, D.E.; SCHAFFER, N.; PLATZ, C.C. Semen Collection and Evaluation in Gorilla gorilla gorilla. **American Journal of Primatology**, v. 3, n. 1, p. 13, 1982.

SCHNEIDERS, A.; SONKSEN, J.; HODGES, J.K. Penile Vibratory Stimulation in the Marmoset Monkey: a practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality. **Journal of Medical Primatology**, v. 33, n.2, p. 98-104, 2004.

SETTLAGE, D.S.F.; HENDRICKX, A.G. Electro-ejaculation technique in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Fertility & Sterility**, v.25, p.157-9, 1974.

SILVA, A.O.A., MOTA, A.V.; RIBEIRO, H.F.L., REIS, A.N. ; VALE, W.G. Preliminary Report on Ringer-Lactate Solution as an alternative diluter for Buffalo Semen. In: Buffalo Symposium of Américas, 1., 2002, Belém. **Proceedings...** Belém: 2002. p. 467-470.

SYMINGTON, M. M. Sex ratio and maternal rank in wild spider monkeys: When daughters disperse. **Behavioural Ecology and Sociobiology**, v. 20, p. 421-425, 1987.

THOMSON, J.A.; ILIFF-SIZEMORE, S.A.; GLIESSMAN, P.M.; WOLF, D.P. Collection and Fertilization Potential of Sperm from the Sulawesi Crested Black Macaque (*Macaca nigra*). **American Journal of Primatology**, v.28, n. 4, p. 289-297, 1992.

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

VALE, W.G.; SWANSON, W.F., HOWARD, J.G.; ROTH, T.L.; BROWN, J.L.; ALVARADO, T.; Collection, processing and deep freezing of buffalo semen. **Buffalo Journal**, v.2, p. 65-81, 1994.

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

VALLE, R. R. ; ZACARIAS, F. C. ; MIRANDA, R. P. ; MUNIZ, J. A. P. C. ; RIBEIRO, H. F. L. . Evaluation of Howler monkeys (*Alouatta caraya*) semen after cooling at 4 C using two different extenders. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro - BA. 15th International Congress on Animal Reproduction - **ABSTRACTS**. Belo Horizonte - MG: Brazilian College of Animal Reproduction, v. 2, p. 531-531, 2004a.

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, 2004b.

VANDEVOORT, C.A. High Quality Sperm for nonhuman primate ART: production and assessment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 33, 2004.

VASCONCELOS, S.M.M; ANDRADE, M.M.; SOARES, P.M.; CHAVES, B.G.; PATROCÍNIO, M.C. A. ; SOUSA, F.C.F.; MACEDO, D.S. Cetamina: aspectos gerais e relação com a esquizofrenia. **Revista Psiquiatria Clínica**, v.32, n.1, 2005.

VALERIO, D.A. et al. Collection of semen from macaques by electro-ejaculation. **Laboratory Animal Care**, v.19, p. 250-2, 1969.

VAN PELT, L.F.; KEYSER, P.E. Observations on semen collection and quality in macaques. **Laboratory Animal Care**, v.20, 1970. p. 726-33.

WEISBROTH, S.; YOUNG, F.A. The Collection of Primate Semen by Electroejaculation. **Fertil. Steril.**, v. 16. p. 229-235. s/data.

WILDT, D.E.; SEAL, U. S. & RALL, W. F. Genetic Resource Banks and Reproductive Technology for Wildlife Conservation. In: CLOUD, J. G. **Genetic Conservation of Salmonid Fishers**. New York: Thorgaard Plenum Press, 1993. p. 159-173.

WHITE, F. Census and Preliminary Observations on the Ecology of the Black-faced Black Spider Monkey (*Ateles paniscus chamek*) in Manu national Park, Peru. **American Journal of Primatology**, n.11, p. 125-132, 1986.

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.

YOUNG, L.G.; HINTON, B.T.; SMITHWICK, E.B.; GOULD, K.G. Sodium, Potassium and Protein Concentrations and 2D-SDS-PAGE of epididymal luminal and ejaculated seminal fluids of the adult chimpanzee (*Pan troglodytes*). **American Journal of Primatology**, v. 34, p. 249-259, 1994.

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.

Anexo 1. Diluidor TES para sêmen bubalino

Seção 1.01 Solução A (500 ml)	
TES	24,5 g
TRIS (Tris-hydroxy-methyl-amino-ethan)	5,3 g
D.Frutose	1,08 g
Penicilina	70 mg ou 1.0000 UI
Estreptomicina	700 mg ou 1.000.000 UI
Água Bi-Destilada (completar até)	500 ml
Seção 1.02 Solução B	
11% de leite desnatado aquecido	
Seção 1.03 Solução Final (100 ml)	
Solução A	36,5 ml
Solução B	36,5 ml
Glicerol	7 ml
Gema de ovo Os ovos utilizados devem ser do dia (fresco).Sendo necessário a filtração da solução final.	20 ml

Fonte: Vale, 1994.

Anexo 2.Características físico-químicas do Ringer-Lactato (em g/100ml):

Substâncias	Quantidade
Cloreto de sódio	0,6 g
Cloreto de cálcio	0,022 g
Cloreto de potássio	0,03 g
Lactato de sódio	0,31 g
Na+	130,0 MEq/l
Ca++	3,0 MEq/l
K+	4,0 MEq/l
Cl	110,0 MEq/l
Lactato	28,0 MEq/l
Osmolaridade	273,20 mOsm/l
Solvente (água p/ injeção q.s.p.)	100 ml

Fonte: bula do produto – ENDOMED

Anexo 3: Composição do Diluidor CEBRAN II

Seção 1.04 <u>Solução A</u>	
TRIS	5,3g
D-frutose	1,08 g
Penicilina	70 mg ou 1000 UI
Estreptomicina	700 mg ou 1.000.000 UI
Ringer-lactato q.s.p.	500 ml
Seção 1.05 <u>Solução B</u>	
11% de leite desnatado aquecido a 80°C	
Seção 1.06 <u>Solução Final</u>	
Solução A	36,5 ml
Solução B	36,5 ml
Glicerol	7 ml
Gema de ovo	20 ml

Fonte: Silva et al., 2002

Anexo 4: Técnica de coloração de esfregaço seminal - Método Cerovski

- 1- Colocar corante vermelho do congo sobre toda a lâmina onde foi realizado o esfregaço seminal.**
- 2- Esperar 30 segundos e realizar lavagem da lâmina. Esperar secar.**
- 3- Colocar corante violeta de genciana sobre toda a lâmina onde foi realizado o esfregaço seminal.**
- 4- Esperar 30 segundos e realizar lavagem da lâmina. Esperar secar para análise em microscopia.**