

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CLÊNIO FERNANDES VIANA

**CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN, PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE
TESTOSTERONA NO EXTRATO FECAL, VARIAÇÃO DA MASSA CORPORAL E
VOLUME TESTICULAR DE MICOS-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*, LINNAEUS, 1758)
MANTIDOS EM CATIVEIRO SOB CONDIÇÕES AMBIENTAIS CONTROLADAS**

Campos dos Goytacazes - RJ

Setembro de 2012

CLÊNIO FERNANDES VIANA

**CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN, PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE
TESTOSTERONA NO EXTRATO FECAL, VARIAÇÃO DA MASSA CORPORAL E
VOLUME TESTICULAR DE MICOS-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*, LINNAEUS, 1758)
MANTIDOS EM CATIVEIRO SOB CONDIÇÕES AMBIENTAIS CONTROLADAS**

**Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Clara Caldas Bussiere

Co-orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

Campos dos Goytacazes - RJ

Setembro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 012/2013

Viana, Clênio Fernandes

Características do sêmen, perfil da concentração de testosterona no extrato fecal, variação da massa corporal e volume testicular de micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*, Linnaeus, 1758) mantidos em cativeiro sob condições ambientais controladas / Clênio Fernandes Viana. – 2013.

88 f. : il.

Orientador: Maria Clara Caldas Bussiere

Dissertação (Mestrado - Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Bibliografia: f. 79 – 88.

1. Primatas não humanos 2. *Saimiri sciureus* 3. Características do sêmen 4. Fisiologia da reprodução do macho 5. Testosterona 6. Sazonalidade I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

Cutter – V 654c



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-9/11

Certificamos que o protocolo (P-73/10-2), intitulado "Colheita e avaliação de sêmen de micos de cheiro (*Saimiri sp*) pertencentes ao Cecal/ Fiocruz.", sob a responsabilidade de TATIANA KUGELMEIER, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/12/2014 e inclui o uso total de :

Saimiri sciureus

- 69 Machos, Peso: 1000,0000 Grama(s).

Saimiri ustus

- 8 Machos, Peso: 1000,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2010

**Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA**

CLÊNIO FERNANDES VIANA

**CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN, PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE
TESTOSTERONA NO EXTRATO FECAL, VARIAÇÃO DA MASSA CORPORAL E
VOLUME TESTICULAR DE MICOS-DE-CHEIRO (*Saimiri sciureus*, LINNAEUS, 1758)
MANTIDOS EM CATIVEIRO SOB CONDIÇÕES AMBIENTAIS CONTROLADAS**

**Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo del Rio do Valle (Doutor, Reprodução) - UNIP

Prof^a. Dr^a. Sheyla Farhayldes Souza Domingues (Doutora, Ciência animal) - UFPA

Dr^a. Tatiana Kugelmeier (Doutora, Ciências) - Fiocruz

Dr^a. Valéria Amorim Conforti (Doutora, Ciência Animal) - Instituto Pró-carnívoros

Prof^a. Dr^a. Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora, Ciências) - UENF
(Orientadora)

Dedico ao vô Liô, vó Rita, mãe Enedina e Prof. Rovilson, *in memoriam*.
Dedico em especial, ao meu filho Lucas Viana,
minha esposa, Branca e
meu pai, Valdemar Fernandes Viana.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça que recebo em minha trajetória de vida.

Aos meus orientadores, Prof^a. Dr^a Maria Clara Caldas e Prof. Dr^a Aulus Cavalieri Carciofi.

Às Instituições e órgãos de fomento: Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - Capes, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF e Universidade Estadual Paulista – Unesp/Jaboticabal.

À banca examinadora pela honra da presença e pelas valiosas contribuições.

Aos funcionários do Cecal/Fiocruz, em especial a equipe do SCPrim pelo apoio e contribuições.

À empresa Poytara pelo processamento da ração experimental utilizada no estudo e aos profissionais do Laboratório de Nutrição Clínica da Unesp, em especial, o Dr. Fabiano Sá.

À equipe do LRMGA/UENF, em especial, a Prof^a. Dr^a Célia Quirino, Prof. Dr. Ângelo Burla, Prof. Dr. José Frederico Straggiotti, os veterinários, Dr^a Carla Sobrinho, Dr. Marcus Barreto, Dr^a Márcia Faes, Dr. Fausto de Carvalho e as técnicas, Bruna, Vânia e Mariane.

Aos professores, funcionários e alunos da Uenf, em especial, o Prof. Dr. Ricardo Mendonça, Prof. Dr. Humberto Penna, a Sr^a Vângela, os alunos, Rodrigo Fortunato, Bruno Pena e Wlaison Sampaio. À Coordenação de Pós-graduação, Prof. Dr. Olney Vieira e as funcionárias, Jovana Campos e Conceição dos Santos pela competência e gentileza.

A todos os profissionais e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, em especial, a Sr^a Aparecida Kugelmeier, Dr^a Tatiana Kugelmeier, Dr^a Márcia Andrade, Dr. Rodrigo del Rio, Dr. Israel dos Santos, Dr^a Ana Carolina Leal, Dr^a Isabella Folhadela, Gabriel Moraes e Markus Juno Cabral.

Muito obrigado!

"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."

Ayrton Senna

RESUMO

VIANA, Clênio Fernandes, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Setembro de 2012; Características do sêmen, perfil da concentração de testosterona no extrato fecal, variação da massa corporal e volume testicular de micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*, Linnaeus, 1758) mantidos em cativeiro sob condições ambientais controladas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Clara Caldas Bussiere

Os micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) são primatas neotropicais de pequeno porte, com ciclo reprodutivo sazonal, marcado por alterações morfofisiológicas em machos e fêmeas. São criados em cativeiro principalmente como modelos para a pesquisa biomédica. São bem estudados quanto à nutrição, fisiologia, comportamento, no entanto, a fisiologia reprodutiva ainda necessita de conhecimentos para melhorar o manejo *ex situ*. O objetivo deste estudo foi avaliar a variação de massa corporal, volume testicular, a concentração de testosterona no extrato fecal e características do sêmen em animais mantidos sob condições ambientais controladas (temperatura luminosidade e umidade). Durante 12 meses, os machos (n = 12) de 7 a 13 anos foram mantidos em dupla, sem contato visual, olfativo ou auditivo com fêmeas da espécie. Foram obtidas a massa corporal, volume testicular e amostras de sêmen por vibroestimulação peniana (VEP) a cada 15 dias. Amostras de fezes foram colhidas a cada mês para a mensuração de testosterona no extrato fecal por quimioluminescência. Sete animais responderam ao procedimento de VEP e destes, dois animais ejacularam regularmente ao longo do estudo. O sêmen foi avaliado sem dissolução do coágulo. Conclui-se que é possível colher sêmen de *S. sciureus* durante todo o ano por VEP em animais mantidos em condições ambientais controladas. As características das amostras de sêmen são compatíveis com o descrito para a espécie. Ajustes no tubo de colheita elevaram a taxa de sucesso na obtenção de ejaculados por VEP. As análises não mostraram uma variação de massa corporal, volume testicular e testosterona no extrato fecal que evidenciasse as alterações descritas nos machos na estação de acasalamentos em estudos prévios. O conhecimento gerado pelo estudo pode contribuir como base para a manutenção de machos em condições de cativeiro para a colheita de sêmen com potencial para aplicação em biotécnicas reprodutivas e tornar as criações mais eficientes e autossustentáveis para fins de pesquisa biomédica ou de conservação.

Palavras-chave: Primatas não humanos; *Saimiri sciureus*; características do sêmen; fisiologia da reprodução do macho, testosterona, sazonalidade.

ABSTRACT

Characteristics of semen, testosterone level profile in fecal extract, variation of body weight and testicular volume of captive squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*, Linnaeus, 1758) under controlled environmental conditions.

Squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) are small neotropical primates with seasonal reproductive cycle, marked by morphophysiological changes in males and females. They are raised in captivity primarily as models for biomedical research and have been well-studied on nutritional, physiological, and behavioral aspects; however, the reproductive physiology still requires knowledge to improve the handling *ex situ*. Thus, this study aimed to assess the variation in body weight, testicular volume, testosterone level profile in fecal extract, and semen characteristics in captive squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) under controlled environmental conditions (temperature, artificial lighting, and humidity). During 12 months, adult males (n = 12) from 7 to 13 years of age were housed in pairs with no visual olfactory or auditory contact with females of the species. Body weight and testicular volume were assessed and semen samples were collected by vibratory penile stimulation (VPS) every 15 days. Fecal samples were collected every month for the measurement of testosterone levels via chemiluminescence. Samples were achieved from seven animals and two of them ejaculated regularly throughout the whole study. Samples were analysed with no dissolution of the seminal clotting. Characteristics of semen were comparable to those observed in healthy individuals. Adjustments in the collection tube improved sample collection success by VPS in the longitudinal monitoring of body mass, testicular volume, as well as fecal testosterone levels. Besides, no seasonal changes were observed. Therefore, this manuscript offers a promising protocol for semen collection in the study species, which could potentially contribute to further research as well as to future strategies of assisted reproduction technologies to this and possibly to other simian species.

Key words: nonhuman primates; *Saimiri sciureus*; semen characteristics; reproductive physiology in male; testosterone; seasonality

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abr	Abril
Ago	Agosto
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB	Diaminobenzidina
Df	Defeito
Dez	Dezembro
EEJ	Eletroejaculação
Fev	Fevereiro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
Hz	Hertz
IMA	Integridade de membrana acrossomal
IMP	Integridade de membrana plasmática
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Jan	Janeiro
Jun	Junho
Jul	Julho
IPS	International Primatological Society
Kg	Quilograma
Mai	Maio
Mar	Março
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto

MPL	Movimento progressivo linear
NRC	National Research Council
Nov	Novembro
OMS	Organização Mundial da Saúde
Out	Outubro
P	Níveis de Significância
pH	Potencial de hidrogênio
R	Coefficiente de correlação
SAS	Statistic Analysis System
Set	Setembro
VEP	Vibroestimulação peniana
X	Veze
°C	Grau centígrado

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVOS	17
3.	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1.	A espécie <i>Saimiri sciureus</i>	18
3.1.1.	Hábitos alimentares e nutrição em cativeiro.....	19
3.1.2.	Aspectos reprodutivos do gênero <i>Saimiri</i>	20
3.1.3.	O sêmen do gênero <i>Saimiri</i>	21
3.1.4.	Sazonalidade reprodutiva.....	22
3.1.5.	Fisiologia reprodutiva de machos do gênero <i>Saimiri</i>	25
4.	METODOLOGIA GERAL.....	26
4.1.	Os animais.....	27
4.2.	Instalações.....	28
4.3.	Manejo	29
4.4.	Contenção para pesagem, biometria testicular e colheita de sêmen	29
4.5.	Avaliação da massa corporal e biometria testicular.....	30
4.6.	Colheita de sêmen.....	31
4.7.	Avaliação do sêmen	33
4.8.	Colheita de fezes e mensuração de testosterona no extrato fecal	35
4.9.	Validação fisiológica dos ensaios hormonais	36
4.10.	Análise estatística	37
5.	DESENVOLVIMENTO.....	38
5.1.	ARTIGO I.....	38
	Massa corporal, biometria testicular e concentração de testosterona no extrato fecal de micos-de-cheiro (<i>Saimiri sciureus</i>, Linnaeus, 1758) mantidos sob condições ambientais controladas ao longo de doze meses	38
	RESUMO.....	38
	ABSTRACT.....	39
	INTRODUÇÃO	40
	MATERIAL E MÉTODOS	41

Os animais	41
Instalações.....	42
Manejo	42
Contenção para pesagens e biometria testicular	43
Colheita de fezes e mensuração de testosterona no extrato fecal	44
Validação fisiológica dos ensaios hormonais	45
Análise estatística	45
RESULTADOS	46
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
5.2. ARTIGO II	57
Características do sêmen de micos-de-cheiro (<i>Saimiri sciureus</i>) obtido por vibroestimulação peniana de animais mantidos sob condições ambientais controladas...	57
5.2.1. RESUMO.....	58
5.2.2. ABSTRACT.....	59
5.2.3. INTRODUÇÃO	60
5.2.4. MATERIAL E MÉTODOS	60
5.2.4.1. Seleção dos animais	61
5.2.4.2. Manejo.....	61
5.2.4.3. Colheita do sêmen.....	61
5.2.4.4. Avaliação do sêmen	62
5.2.4.5. Análise estatística.....	64
5.2.5. RESULTADOS.....	64
5.2.6. DISCUSSÃO.....	68
5.2.7. CONCLUSÃO	73
5.2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
6. CONCLUSÃO GERAL.....	76
7. APÊNDICE A.....	77
8. APÊNDICE B.....	78
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

Os primatas não humanos são clinicamente relevantes como modelos para a pesquisa biomédica, pois eles compartilham muito mais semelhanças anatômicas, genéticas e fisiológicas com o ser humano do que outras espécies animais (WOLF, 2008). No entanto, quando comparados a outras espécies convencionais de biotérios, o custo de manutenção de primatas não humanos é mais elevado (PISSINATTI; ANDRADE, 2010).

A espécie *Saimiri sciureus* é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um dos principais modelos para estudos da malária. Esses animais apresentam sintomatologia semelhante ao homem, quando acometidos pela doença, mesmo não sendo hospedeiro natural do parasito (COURA, 2008; REY, 2008). Devido à sua importância para a pesquisa biomédica (PISSINATTI; ANDRADE, 2010) e de suas características físicas favoráveis para a manutenção em cativeiro, como o pequeno porte e o fácil manejo, (BENNETT, 1967; DUKELOW, 1983), o gênero *Saimiri* está entre os primatas neotropicais mais utilizados (PISSINATTI; ANDRADE, 2010).

O Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro/RJ iniciou a criação de *S. sciureus* em 1987 com animais originários da Amazônia Brasileira (ANDRADE et al., 2004). Em janeiro de 2009 houve ampliação do plantel com a importação de 222 indivíduos doados pelo Centro de Primatas do Instituto Pasteur na Guiana Francesa.

A reprodução desta espécie é caracterizada por um alto índice de abortamento e morte neonatal (DUKELOW, 1983). O baixo índice reprodutivo de uma espécie pode se relacionar tanto ao macho quanto à fêmea (LEJEUNE; DELVAUX, 2010). Assim, para a melhoria desses índices torna-se necessário a implantação de um programa reprodutivo eficiente, o qual envolve um melhor conhecimento da fisiologia reprodutiva tanto de machos quanto de fêmeas da espécie. O sistema de criação adotado para *S. sciureus* no Cecal compreende a formação de grupos sociais que respeitam a relação de cinco a dez fêmeas por macho. Os machos reprodutores são mantidos nos grupos por até duas gerações, posteriormente são substituídos com o intuito de manter a heterozigose em circulação no genótipo. A troca de machos reprodutores em determinado grupo social é um momento crítico do manejo e alguns procedimentos devem ser adotados para

aumentar as chances de sucesso, tais como: a seleção dos machos reprodutores, a introdução dos machos antes da estação de acasalamento e o monitoramento do animal no novo grupo. Até o presente momento, a seleção dos machos reprodutores tem sido realizada apenas por meio de observação comportamental e exame clínico, dentro de um critério de rodízio de machos entre recintos.

Dessa forma, toda e qualquer necessidade de se manter esses animais em cativeiro deve ser acompanhada pelo conhecimento de toda a biologia da espécie para que se alcance o aperfeiçoamento das diversas atividades de manejo, na busca da eficiência da criação, sem deixar de assegurar os princípios do bem estar dos animais em cativeiro.

Sendo assim, a proposta do presente estudo é contribuir para o conhecimento da fisiologia reprodutiva de machos da espécie *S. sciureus*, a condição física dos animais quando isolados de fêmeas em ambiente controlado e o aprimoramento do método de seleção de reprodutores por meio da avaliação de características físicas, como massa corporal, volume testicular e da qualidade do sêmen.

2. OBJETIVOS

Geral

Estudar a fisiologia da reprodução do macho da espécie *S. sciureus* ao longo de 1 ano em condições ambientais controladas por meio da avaliação da massa corporal, volume testicular, concentração de testosterona no extrato fecal e das características do sêmen.

Específicos

Colher o sêmen de *S. sciureus* por vibroestimulação peniana e avaliar as características físicas, morfológicas e funcionais do sêmen desses animais mantidos em cativeiro sob condições ambientais controladas.

Verificar o efeito do mês sobre a massa corporal, volume testicular, qualidade espermática e concentração de testosterona no extrato fecal.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Os primatas não humanos apresentam uma variedade de tamanho e diferenças fisiológicas, que se refletem na organização social da espécie, no comportamento, hábitos alimentares e forma de ocupar o ambiente (SMITH; JUNGERS, 1997).

Os Primatas neotropicais estão distribuídos em 19 gêneros e 199 espécies e subespécies (RYLANDS; MITTERMEIER, 2009).

3.1. A espécie *Saimiri sciureus*

Os primatas neotropicais da família Cebidae, subfamília Saimiriinae, gênero *Saimiri* (Voigt, 1831) (GROVES, 2005), são conhecidos no Brasil como micos-de-cheiro ou mão-de-ouro (AURICCHIO, 1995). Esse gênero é composto por cinco espécies, *Saimiri sciureus*, *S. ustus*, *S. boliviensis*, *S. oerstedii*, *S. vanzolinii* (RYLANDS; MITTERMEIER, 2009). Todas as espécies do gênero apresentam declínio populacional em vida livre (RYLANDS et al., 2000). De acordo com a IUCN (2009), *S. oerstedii* e *S. vanzolinii* são espécies consideradas vulneráveis e outra espécie, *S. ustus*, está em iminente ameaça.

Os micos-de-cheiro apresentam pelagem acinzentada a um tom esverdeado e tons do amarelo ao alaranjado nas patas, que variam conforme a espécie (GROVES, 2005). A boca apresenta contornos na cor preta e pelos brancos circundam os olhos formando uma máscara branca que com a pelagem escura da cabeça, forma um arco que se divide em dois grupos: grupo “gótico”, pêlos brancos ao redor dos olhos e escuros na cabeça formam um profundo “V” entre os olhos e o grupo “romano”, com pêlos brancos ao redor dos olhos e pêlos escuros na cabeça formando um padrão arredondado entre os olhos (INGBERMANN; STONE; CHEIDA, 2008).

Todas as espécies do gênero *Saimiri* apresentam porte pequeno. Os machos e fêmeas podem apresentar aumento de massa corporal na estação de acasalamentos, porém esse fenômeno é mais evidente nos machos (DUMOND; HUTCHINSON, 1967; BENNETT, 1967).

São animais com grande agilidade manual (LASKA et al., 2007), quadrúpedes, arborícolas e de hábitos diurnos (INGBERMANN; STONE; CHEIDA, 2008). Sua ocorrência prevalece na Região Amazônica, mas eles podem ser encontrados do sul do México e América Central até o norte da Argentina, na América do Sul (DUKELOW, 1983; GOODALL e MITTERMEIER, 1999). Habitam vastas regiões florestais, onde são

encontrados preferencialmente no dossel e nas florestas de borda primárias ou secundárias. Ocorrem em grupos de dezenas e até centenas de animais (BALDWIN, 1985).

Em estudos realizados na Fiocruz, Rio de Janeiro, com a obtenção de dados fora da estação de acasalamentos, *S. sciureus* mantidos em grupos sociais sob condições ambientais naturais apresentaram massa corporal de 664 ± 71 g (média \pm DP) para as fêmeas e 851 ± 119 g (média \pm DP) para os machos adultos (ANDRADE et al., 2004).

3.1.1. Hábitos alimentares e nutrição em cativeiro

No ambiente natural, a dieta dos animais é composta por frutas, cereais, larvas de insetos, pequenos vertebrados, além de goma, flores e castanhas (THORINGTON, 1968; JANSON; BOINSKI, 1992; MENDOZA, 1999; STONE, 2007). Os insetos representam parcela significativa da dieta, principalmente na estação seca, quando há menor disponibilidade de frutas (LIMA; FERRARI, 2003; STONE, 2007). Na Fiocruz, a dieta dos micos-de-cheiro ao longo dos anos foi composta por ração industrializada adicionada de produtos hortifrutigranjeiros (ANDRADE et al., 2004). Recentemente, houve melhoria no manejo nutricional da espécie com alterações na composição, no processamento e nas características dos alimentos que compõem a dieta (VIANA et al., 2009). Alimentos *in natura* e insetos podem ser adicionados como suplementos nutricionais e como enriquecimento ao ambiente do cativeiro, porém, requer maior controle para que não interfira negativamente na saúde dos animais (MOURA et al., 2010).

A utilização de primatas em laboratório ocorre há décadas em experimentos biomédicos e comportamentais (PISSINATTI; ANDRADE, 2010). Em função dessa demanda e da necessidade da conservação de espécies *ex situ*, percebeu-se a relevância do cativeiro e, com ele, a necessidade de informações sobre o conhecimento da biologia das espécies, bem como de suas exigências para a manutenção no cativeiro (ZIMBLER-DELORENZO; STONE, 2011). Percebe-se que nos centros de experimentação há uma necessidade ainda maior do uso de um alimento completo e específico para o gênero *Saimiri*, capaz de mantê-los saudáveis durante todo o curso dos experimentos biomédicos, principalmente pelo fato de que na experimentação os animais estão mais expostos ao estresse em função das atividades relacionadas aos procedimentos da pesquisa e a intensificação das atividades de manejo de rotina (VIANA et al., 2009). Com a demanda por informações sobre a exigência nutricional de primatas, dados resultantes de anos de trabalhos experimentais para diferentes espécies foram compilados no National Research Council - Nutrient requirements of nonhuman

primates (NRC, 1978). A versão mais atual é de 2003, nela encontram-se os valores nutricionais recomendados para a produção de alimentos para o gênero *Saimiri*, além de diversas informações que demonstram que esses animais são extremamente exigentes, quando comparados a outros primatas não humanos (NRC, 2003).

3.1.2. Aspectos reprodutivos do gênero *Saimiri*

Os micos-de-cheiro são animais poligâmicos, vivem de forma social em grupos de múltiplos machos e múltiplas fêmeas (GOODALL; MITTERMEIER, 1999; FORTMAN et al., 2002).

A maturidade sexual das fêmeas ocorre aproximadamente aos dois anos e meio de vida (BALDWIN, 1985). As fêmeas ciclam num intervalo de aproximadamente nove dias (WOLF; CONNOR; ROBINSON, 1977). A gestação é em média de 156 dias (WIEBE et al., 1988). Atenção especial deve ser dada às fêmeas no terço final de gestação e início de lactação devido ao aumento das necessidades nutricionais e de água (ROSENBLUM, 1968). A massa corpórea do filhote ao nascer aproxima-se de 15% da massa corporal materna, o que se traduz num grande desgaste para a fêmea durante a gestação. O que pode justificar a concepção de um único filhote por ano (BALDWIN, 1985). O desenvolvimento dos infantis é rápido, o processo de independência alimentar inicia-se nos primeiros meses de vida e aos seis ocorre redução na lactação que culminará no desmame natural (ROSENBLUM, 1968).

Nos machos, a maturidade sexual ocorre aos cinco anos de idade (MENDOZA, 1999). Os animais apresentam uma bolsa escrotal semi pendulosa e assimétrica, proporcionalmente grande pelo seu porte (STEINBERG et al., 2005). O testículo e o epidídimo juntos formam uma massa relativamente pequena e globular. O pênis é cilíndrico, mede 35 mm de comprimento, encoberto por prepúcio retrátil, apresenta osso peniano e algumas espículas queratinizadas vestigiais laterais ao seu corpo (STEINBERG et al., 2005).

Na borda ventral do testículo podem ser observadas veias helicoidais e proeminentes. As vesículas seminais são tubulares e não ramificadas. A próstata localiza-se na parte proximal da uretra, imediatamente distal à bexiga (HILL, 1960).

3.1.3. O sêmen do gênero *Saimiri*

O primeiro procedimento com sucesso na colheita de sêmen de primatas não humanos foi a eletroestimulação peniana. Dois eletrodos de corrente monofásica foram utilizados, um foi aplicado na base do pênis e outro na superfície ventral da glândula (MASTROIANNI; MANSON, 1963 *apud* BENNETT, 1967). Dois anos mais tarde, foi utilizada a corrente elétrica em uma sonda retal em primatas do Velho Mundo (BENNETT, 1967). No mesmo período, sondas foram especialmente desenhadas para colheita de sêmen em micos-de-cheiro (BENNETT, 1967). Esse método, a eletroejaculação (EEJ), tornou-se o mais comum para obtenção de sêmen em primatas não humanos e é o responsável pela maioria dos trabalhos com sêmen em micos-de-cheiro (YEOMAN; 1998). No entanto, mais recentemente, tem sido utilizado um novo método de colheita de sêmen em pequenos primatas, a vibroestimulação peniana (VEP) (YEOMAN et al., 1998; KUEDERLING et al., 2000; SCHNEIDERS et al., 2004; VALLE et al., 2008; KUGELMEIER, 2011).

Segundo Yeoman et al. (1998), as características do sêmen de micos-de-cheiro podem variar conforme o método empregado na colheita. Em amostras obtidas por eletroejaculação, Bennett (1967) obteve fração líquida e coagulada, cujas massas somadas variaram de 45,2 a 397,7 mg e concentração de 106×10^6 espermatozoides/ mL. Com o mesmo método, Gage e Freckleton, (2003) obtiveram ejaculados de *S. sciureus* com volume de 50,79 a 81,29 μ L.

Nos primatas não humanos é comum a rápida coagulação do ejaculado logo após a colheita, o que dificulta as avaliações do sêmen (DUKELOW, 1983; KUGELMEIER, 2011; WOLF, 2009). Trabalhando com a espécie *Saimiri boliviensis*, Yeoman et al. (1998), obtiveram ejaculados de $436 \pm 90 \mu$ L colhidos por vibroestimulação peniana (VEP) e de $205 \pm 25 \mu$ L colhidos por eletroejaculação retal (EEJ). Na tabela 1 são apresentadas as características do sêmen de micos-de-cheiro obtido pelos métodos de VEP e EEJ.

Tabela 1: Características do sêmen de micos-de-cheiro, obtidos por diferentes métodos de colheitas.

Espécie	Colheita	Volume (µL)	Concentração (x 10 ⁶ spz/mL)	Motilidade (%)	Referências
<i>S.boliviensis</i>	VEP	436 ± 90 ^A	77,1 ± 20,4 ^A	80,6 ± 4,3 ^A	(Yeoman et al., 1998)
<i>S.boliviensis</i>	EEJ	205 ± 25 ^A	2,8 ± 1,7 ^A	44,1 ± 11,4 ^A	(Yeoman et al., 1998)
<i>S. sciureus</i>	EEJ	50,79 - 81,29 ^B			(Bennett, 1967)
<i>S. sciureus</i>	EEJ	159,5 ± 57 ^A	127,3 ± 160,6 ^A	55,85 ± 15,35 ^A	(Denis et al., 1976)
<i>S. sciureus</i>	EEJ	80 - 300 ^B			(Dukelow, 1983)

VEP – vibroestimulação; EEJ – eletroejaculação; spz – espermatozoides; *S. sciureus* – *Saimiri sciureus*; *S. boliviensis* – *Saimiri boliviensis*

*Legenda: ^A - dados apresentados pelas médias ± os desvios padrões das médias; ^B - dados apresentados como intervalos entre os valores mínimos e máximos.

Muitos autores descreveram a biometria dos espermatozóides de micos-de-cheiro. Segundo Bennett (1967), os comprimentos da cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozóides medem, respectivamente, 6, 12 e 60 µm. Gage e Freckleton, (2003) obtiveram espermatozóides de *S. sciureus* com um tamanho total de 69,2 µm. Dukelow (1983) descreveu o comprimento da cabeça do espermatozóide de 5,11 ± 0,2 µm; largura da cabeça 3,51 ± 0,01 µm; peça intermediária 9,03 ± 0,12 µm, cauda 55,34 ± 0,13 µm e comprimento total de espermatozóides de 69,24 ± 0,15 µm. O espermatozóide de micos-de-cheiro apresenta a cabeça estreita, com uma reduzida área superficial e saliência apical. A margem posterior do acrossoma tem aparência serrilhada ou microvilosidades. A peça intermediária insere-se de forma excêntrica na parte posterior da cabeça (DUKELOW, 1983). As mitocôndrias vistas em corte transversal apresentam-se muito finas e contornam a peça intermediária em aproximadamente 53 voltas (DUKELOW, 1983).

3.1.4. Sazonalidade reprodutiva

Animais de reprodução sazonal podem ser classificados em espécies de dias longos e de dias curtos (SENGER, 2003). A percepção da variação do comprimento do dia é um dos mais notáveis sinais de referência da estação do ano e pode modular o ciclo reprodutivo de muitas espécies (NELSON et al., 1990). O período mais adequado para a atividade reprodutiva em geral, leva ao nascimento da progênie no período mais favorável a sua sobrevivência, devido à disponibilidade de alimentos (NELSON et al., 1990; MALPAUX, 2006).

O mecanismo de ação do fotoperíodo sobre o controle do ritmo de reprodução sazonal envolve dois componentes principais: o primeiro refere-se ao ciclo claro/escuro e a produção circadiana de melatonina; o segundo, ao ritmo de produção de melatonina e a regulação da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (MALPAUX, 2006). Os fatores extrínsecos que mediam mudanças na atividade reprodutiva, primariamente agem no eixo hipotálamo-hipofisário que, secundariamente, alteram a atividade gonadal (NELSON et al., 1990). Os hormônios hipofisários são regulados pelo hipotálamo. A liberação desses hormônios ocorre em pulsos que atingem a célula alvo em maior ou menor frequência, fazendo com que a concentração plasmática dos hormônios por eles estimulados module os ciclos biológicos dos organismos (SENGER, 2003).

A sazonalidade reprodutiva em micos-de-cheiro é bem estabelecida (COE; ROSENBLUM, 1978; BALDWIN, 1985). Variáveis ambientais como índice pluviométrico, fotoperíodo, latitude e temperatura podem influenciar a sazonalidade reprodutiva destes animais (COE; ROSENBLUM, 1978; BALDWIN, 1985), embora a função de cada variável não seja completamente entendida (TREVINO, 2007). Segundo Coe e Rosenblum (1978), em adição aos fatores ambientais, diversos processos fisiológicos e comportamentais regulam o padrão anual do ciclo reprodutivo desses primatas.

A relação entre sazonalidade reprodutiva e índice pluviométrico foi sugerida por Dumond e Hutchinson, (1967) pelo fato de que os micos-de-cheiro habitam regiões de baixa latitude com altos níveis de precipitação. Nas populações de vida livre na Amazônia Brasileira, os acasalamentos ocorrem na estação seca e os partos na estação chuvosa, cada evento reprodutivo ocorre em intervalos de cerca de dois meses no ano (STONE, 2007).

A sazonalidade reprodutiva de micos-de-cheiro persiste no cativeiro, mas há o alargamento da estação de partos, que tende a ocorrer seis meses mais tarde no Hemisfério Norte em relação ao período registrado nas populações de vida livre na América do Sul (DUMOND, 1968; TAUB; ADAMS; AUERBACH, 1978; DUKELOW, 1985). Além disso, diferentes condições ambientais no cativeiro podem interferir no grau de sazonalidade reprodutiva (TREVINO, 2007). Animais sob condições ambientais controladas apresentaram maior distribuição de acasalamentos e partos nos meses ao longo do ano, do que animais em cativeiro sob condições naturais (TREVINO, 2007). Numa análise entre os fatores ambientais sobre a sazonalidade reprodutiva de *S. sciureus*, houve alta correlação entre temperatura e fotoperíodo sobre a distribuição de acasalamentos e partos em animais mantidos em cativeiro (TREVINO, 2007); o número de acasalamentos foram significativamente maiores em meses

do ano de temperaturas mais baixas e de menor fotoperíodo e o número de partos foi maior nos meses com de temperatura e fotoperíodo mais elevados (TREVINO, 2007). O índice de chuva não foi visto como um importante indicador de estação de acasalamentos e partos de *S. sciureus* no cativeiro nas condições ambientais naturais (TREVINO, 2007).

A formação de grupos sociais de indivíduos adultos, uma vez estabelecida, tende a marcar a dinâmica reprodutiva em estações de acasalamentos, gestação, parto e lactação de forma cíclica e sazonal, relacionada à data de sua formação (THORINGTON, 1968; COE; ROSENBLUM, 1978; MENDOZA, 1999; SCHIML et al., 1999).

Próximo e durante a estação de acasalamentos, ocorrem alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais em fêmeas e machos. Nos machos, é bem característico o aumento da massa corporal (“*fattening*”), principalmente na região dorsal e membros superiores (DUMOND; HUTCHINSON, 1967; COE; ROSENBLUM, 1978; CHEN et al., 1981; MENDOZA, 1999). Foi detectado um aumento de volume testicular que acompanhou a flutuação da massa corporal em machos reprodutivamente intactos (COE; ROSENBLUM, 1978).

Nos grupos sociais, ocorrem mudanças na relação entre os indivíduos, como o aumento da interação macho-fêmea nos meses de acasalamentos que parece fundamental para o sucesso reprodutivo da espécie (COE; ROSENBLUM, 1978; BALDWIN, 1985). Os machos tornam-se mais reativos ao ambiente e apresentam *display* genital, com a ereção do pênis e manifestam ações de socialização e proximidade das fêmeas (DUMOND; HUTCHINSON, 1967; CHEN et al., 1981). Fora da estação reprodutiva, o macho perde a condição de *fattening*, reduz o interesse pela fêmea e toma uma posição mais periférica dentro do grupo social (BALDWIN, 1985). Nesse momento, o grupo torna-se de domínio maternal (DUMOND; HUTCHINSON, 1967), mas, com frequência, os machos apresentam comportamentos sexuais, como ereção e tentativa de cópula, que são repelidas ativamente pelas fêmeas (LATTA; HOPF; PLOOG, 1967; WILSON, 1977).

Como mudanças fisiológicas, observa-se variação na concentração de esteróides gonadais e cortisol em machos e fêmeas (CHEN et al., 1981; SCHIML et al., 1999; MOORMAN et al., 2002). Wilson, Brown e Wilson (1978) não encontraram uma relação direta entre a variação dos níveis de testosterona e as modificações fisiológicas do macho na estação de acasalamentos. Em estudos posteriores com *S. boliviensis*, os autores afirmaram que há uma ativação anual hipotálamo-hipófise-adrenal na estação de acasalamentos. A androstenediona de origem predominantemente adrenal estaria relacionada ao aumento da

massa corporal e a redução dos níveis de testosterona acarreta declínio na frequência de cópulas e de ejaculações dos animais (WIEBE et al., 1988). Esse padrão de sazonalidade na função testicular persistiu mesmo na ausência de fêmeas (CHEN et al., 1981; SCHIML et al., 1999).

Há indícios de que as fêmeas sejam mais sensíveis aos estímulos ambientais e que suas respostas fisiológicas poderiam afetar os machos (BALDWIN, 1970). Fêmeas mantidas individualmente apresentaram maior sensibilidade a sinais externos, como odor e olfato, emanados por grupos sociais, do que machos na mesma condição (SCHIML et al., 1999).

3.1.5. Fisiologia reprodutiva de machos do gênero *Saimiri*

O conhecimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é a chave do entendimento da fisiologia reprodutiva do macho. A ação dos hormônios hipotalâmicos (GnRH) sobre a hipófise anterior desencadeia a produção de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteizante (LH). A produção da testosterona dá-se pela ação do LH sobre as células de Leydig nos espaços intersticiais dos testículos (HARRISON; KUBISCH, 2005; ASA, 1984). Uma porção menor é produzida pelo córtex adrenal (ASA, 1996).

O controle da concentração de testosterona pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal ocorre por *feedback* negativo em dois níveis; o andrógeno das células de Leydig age sobre o hipotálamo e reduz os pulsos de GnRH. Por outro lado, o estradiol, obtido pela conversão da testosterona, age na hipófise, tornando as células gonadotróficas menos sensíveis ao GnRH. Ambos os processos reduzem a concentração de LH (HARRISON; KUBISCH, 2005).

Com a aproximação da puberdade no macho, aumenta os pulsos de GnRH e inicia o aumento da concentração de hormônios gonadotróficos. Esse processo de desenvolvimento parece ter como fator limitante a estimulação dos neurônios que controlam os pulsos geradores de GnRH (HARRISON; KUBISCH, 2005).

A testosterona é um hormônio esteróide cuja estrutura química é composta por dezenove carbonos com peso molecular variando entre 300 e 400 Dáltons, uma hidroxila ou um oxigênio no C3 e C17 e uma dupla ligação no C4. Sua função está associada ao desenvolvimento de glândulas sexuais acessórias, estímulo das características sexuais secundárias, comportamento sexual e espermatogênese. Também tem efeito anabólico (HAFEZ, 2001). As temperaturas ambientais elevadas e a idade podem afetar a produção desse hormônio nos animais (ASA, 1996).

A testosterona circula na corrente sanguínea ligada por uma α -globulina. Nessa forma, é encontrada a maior proporção do andrógeno no corpo. Uma pequena porção, cerca de 2%, permanece livre na circulação para os processos de fluxo celular e conseqüente conversão em dihidrotestosterona (DHT) nos tecido alvos (HARRISON; KUBISCH, 2005). Os testículos de organismos adultos são grandes produtores de testosterona; esses órgãos produzem em menor quantidade androstenediona, que é mais proeminente em testículos pré-púberes.

Nos testículos ocorre também a espermatogênese, que é a proliferação da célula germinativa primitiva até o estágio de espermatozóide maduro (BARR, 1973). Esse processo ocorre em estruturas (túbulos seminíferos) que são sustentadas pelas células de Sertoli (ASA, 1996).

A espermatogênese inicia-se pela divisão das espermatogônias. Considera-se que haja dois tipos dessas células nos grandes primatas: o tipo escuro (AD) e o tipo pálido (AP), os dois tipos são células germinativas diplóides indiferenciadas. A partir do processo mitótico, parte dessas células (AP) torna-se diferenciada em espermatogônias tipo B, que são as células que vão formar os espermátócitos primários. Esses, por sua vez, sofrem meiose e geram espermátócitos secundários na primeira meiose e espermátides na segunda divisão meiótica; portanto, cada espermátócito gera quatro espermátides. Estas células, a partir desse estágio, não mais se dividem e sofrem diferenciação até se tornarem espermatozoides maduros (HARRISON; KUBISCH, 2005). Em *S. sciureus*, o processo completo tem aproximadamente 39 dias (BARR, 1973).

Em estudos com o epitélio germinativo testicular de *S. sciureus*, foram observadas alterações nos tecidos, como o aumento no diâmetro dos tubos seminíferos, que evidenciaram a ativação da espermatogênese na estação e inativação fora da estação de acasalamentos, que acompanhou as alterações fenotípicas descritas nos machos nas duas estações (DUMOND; HUTCHINSON, 1967; PASQUALINI; COLILLAS; RIVAROLA, 1986).

4. METODOLOGIA GERAL

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (LW-9/11). Todos os experimentos foram realizados no criadouro científico da Fiocruz, Serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim), localizado em Mangueiras (22°52'39.06" S e 43°14'46.20" W) no Rio de Janeiro, RJ, cadastrado no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) sob o nº 77933.

4.1. Os animais

Foram utilizados doze animais machos adultos, com idade entre 7 e 13 anos, nascidos em cativeiro. Os animais foram monitorados de fevereiro de 2011 a janeiro de 2012. Os dados foram avaliados mês a mês e, quando pertinentes, comparados à estação de acasalamentos dos grupos sociais da criação de micos-de-cheiro da Fiocruz. A estação de acasalamentos foi determinada por meio do cálculo médio (últimos três anos), obtido pela contagem retroativa (meses do primeiro ao último parto no ano) e considerando o tempo de gestação de cinco meses (Wiebe et al., 1988).

Antes do estudo, os animais foram mantidos em grupos isossexuais em instalações e condições de manejo como descrito por Moura et al. (2010), (Figura 1 A, B e C).



Figura 1. (A, B) Animais no interior dos recintos. (C) Visão panorâmica dos recintos.

Fonte: SCPrim/Fiocruz – Rio de Janeiro, 2011.

Os machos foram selecionados por meio da avaliação de características fenotípicas e parâmetros sanguíneos normais para a espécie, conforme Andrade et al. (2004). Adicionalmente, realizou-se avaliação da genitália externa (pênis, prepúcio, bolsa escrotal, consistência, mobilidade, simetria e biometria dos testículos), segundo o Manual de exame andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) (Figura 2A). Foi realizado ainda exame ultrassonográfico da cavidade abdominal e testículos para assegurar a inexistência de sinais de enfermidades ou má formação, (Figura 2B).



Figura 2. (A) Biometria dos testículos por meio do paquímetro universal. (B) Exame ultrassonográfico para avaliação da cavidade abdominal e aparelho reprodutor. Fonte: SCPrim/Fiocruz – Rio de Janeiro, 2011.

4.2. Instalações

Os animais foram mantidos em dupla, seguindo as recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 2011), em recintos (gaiolas) de aço inox (65 x 65 x 80 cm de altura), equipados com poleiros e plataformas para enriquecimento ambiental. Os recintos foram instalados em sala (3,30 x 3,40 x 3,00 m) com equipamentos para monitorização de condições ambientais, (Figura 3 A).

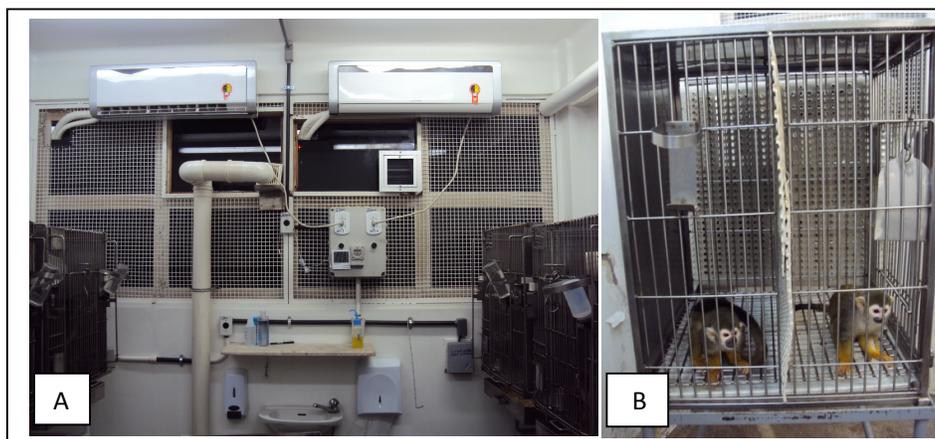


Figura 3. (A) Sala dos animais mostrando a disposição dos recintos (gaiolas) e o controle de iluminação, temperatura e umidade. (B) Vista do recinto mostrando os animais separados para a colheita de fezes. Fonte: SCPrim/Fiocruz – Rio de Janeiro, 2011.

A iluminação foi controlada (CE 12:12h) por timer (Coelmatic L ®, RTST/20, Manaus/AM, Brasil), temperatura (24 a 26° C) e umidade relativa do ar (60 a 70%) mantidas por aparelho de ar condicionado (Hi Wall Diamond Springer Carrier®, Canoas/RS, Brasil), exaustor (Cata®, Dut in-line, 100/270, São Paulo/SP, Brasil) e monitoradas por um termo-

higrômetro digital (Incoterm®, Porto Alegre/RS, Brasil). Os machos de diferentes recintos mantiveram contato visual, olfatório e auditivo entre si, porém sem contato com fêmeas.

4.3. Manejo

A cada dupla de animais foi disponibilizada ração experimental (200 g), com 24 % de proteína bruta (PTN), 10 % de extrato etéreo (EE) e 3,83 % de fibra bruta (FB), 1,2 % de cálcio (Ca) e 0,80 % fósforo (P), formulada conforme as recomendações do National Research Council, Nutrient requirements of nonhuman primates (NRC, 2003), formulação no apêndice A. A dieta foi complementada por 220 g de alimentos *in natura* (banana, manga, melancia e jiló) e água *ad libitum*.

A lavagem completa dos recintos ocorreu em dias alternados com água sobre pressão (Lavadora Tekna® HLX 95V Nordtech, Curitiba/PR, Brasil) e sabão neutro (Detergente Neutro Cordex®, Cordeiro de Medeiros Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro/RJ - Brasil). Ocorria diariamente a higienização das bandejas de recolhimento de dejetos, bebedouros, comedouros e elementos utilizados no enriquecimento ambiental. Os recintos e utensílios foram secos antes de serem devolvidos para uso.

Diferentes itens foram disponibilizados para enriquecimento ambiental no decorrer do estudo, a fim de proporcionar-lhes estímulos visuais, táteis, auditivos, gustativos e olfativos e contribuir para o bem estar no cativeiro, como sons que mimetizam o ambiente de floresta e música clássica, balanços, poleiros e plataformas em polipropileno. Como estímulos gustativos e sensoriais, foram oferecidos cana-de-açúcar (*Saccharum sp*), pipocas, larvas de insetos (*Tenebrio molitor*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), hortelãs (*Menthas sp*), flores de hibisco-colibri (*Malvaviscus arboreus*) em quantidade e frequência, conforme programação prévia.

4.4. Contenção para pesagem, biometria testicular e colheita de sêmen

Para avaliação da massa corporal, biometria testicular e colheita de sêmen, os animais eram retirados dos recintos em caixas de contenção e transporte. Depois, as caixas contendo os animais, eram levadas até a sala de manejo, que foi mantida com iluminação reduzida e temperatura de 24° C. O tempo de contenção de cada animal não ultrapassou 30 min. Esses procedimentos foram repetidos a cada 15 dias por animal (Figura 4A e B).

A contenção foi feita com luvas de couro adaptada com uma fita de velcro que envolvia a região torácica do animal. Essa luva foi sobreposta por luvas de aço e látex. O

animal foi posicionado sobre o um suporte de aço inoxidável que possuía um aparato vertical em lona, que reduzia o campo de visão entre o animal e o operador (Kugelmeier, 2011). Durante todos os procedimentos, o animal permaneceu com as mãos livres para manipular os alimentos que foram disponibilizados (pedaços de bananas e larvas de insetos *Tenebrio molitor*), (Figura 4C e D).



Figura 4. (A) Transferência do animal do recinto para a gaiola de contenção/transporte. (B) Captura do animal na gaiola de contenção. (C) Animal contido recebendo larva de inseto. (D) Animal comendo pedaços de frutas ofertados sobre suporte em lona. Fonte: SCPrim/Fiocruz – Rio de Janeiro, 2011.

4.5. Avaliação da massa corporal e biometria testicular

Para avaliação da massa corporal, os animais foram pesados quinzenalmente em balança digital com precisão de 20 g, pesagem mínima de 400 e máxima de 60 Kg (W-100/2, Welmy®, Indústria e Comércio Ltda., Santa Bárbara do Oeste/SP, Brasil). O valor de massa corporal foi obtido pelo peso da caixa com o animal, descontado o peso da caixa vazia, conforme descrito por Kugelmeier (2011).

As medidas de largura e comprimento dos testículos foram obtidas por meio de paquímetro universal. Para a obtenção do volume dos testículos, utilizou-se a equação do

elipsóide $V = 4/3\pi ab^2$, em que “a” corresponde à metade do comprimento do testículo e “b” à metade da largura (PASQUALINI; COLILLAS; RIVAROLA, 1986).

4.6. Colheita de sêmen

Foi utilizado o método de vibroestimulação peniana (VEP) (aparelho FertiCare®, Multicept, Copenhagen, Dinamarca) com um tubo adaptado à base do aparelho conforme descrito para *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997; 1998) e *Callithrix jacchus* (Kuederling et al., 2000 e adaptado por Valle et al., 2008), (Figura 5A e B).



Figura 5. (A) Estimulação dos animais por meio do vibroestimulador. (B) Tubo adaptado ao vibroestimulador recobrendo todo o pênis do animal. (C) Coagulado seminal preso ao pênis do animal. (D) Coágulo seminal sendo retirado da glândula do animal com uso de pinça. Fonte: SCPrim/Fiocruz – Rio de Janeiro, 2011.

Inicialmente, utilizou-se um tubo de vidro com 50 mm de comprimento por 10 mm de diâmetro interno com fundo esférico, (Figura 6A). Após o primeiro mês de estudo, foram realizadas adaptações neste tubo com o intuito de aumentar o contato sobre o pênis do animal.

Uma tentativa foi preenchê-lo com água a 37° C até a metade do seu volume e uma película de látex de preservativo para uso humano, sem lubrificante e autoclavada, cobriu-o internamente, com bordas presas na parte externa do mesmo, similar a uma de vagina artificial, (Figura 6B). Aos seis meses de estudo, o tubo foi substituído por outro com mesmo comprimento, porém com 8 mm de diâmetro interno, sem látex, (Figura 6C). Aos sete meses de estudo, um animal teve a cauda solta casualmente durante a contenção física para o procedimento de colheita. Após esse episódio, o animal mostrou-se confortável durante o procedimento, de forma que essa condição foi adotada para todos os animais até o final do experimento.

Ao nono mês de estudo, o tubo de colheita de vidro foi substituído por um microtubo de polipropileno com 40 mm comprimento e 10 mm de diâmetro interno na proximidade da borda, porém com fundo cônico (Figura 6D). Todos os tubos foram mantidos em banho-maria a 37° C até o início do procedimento de colheita.

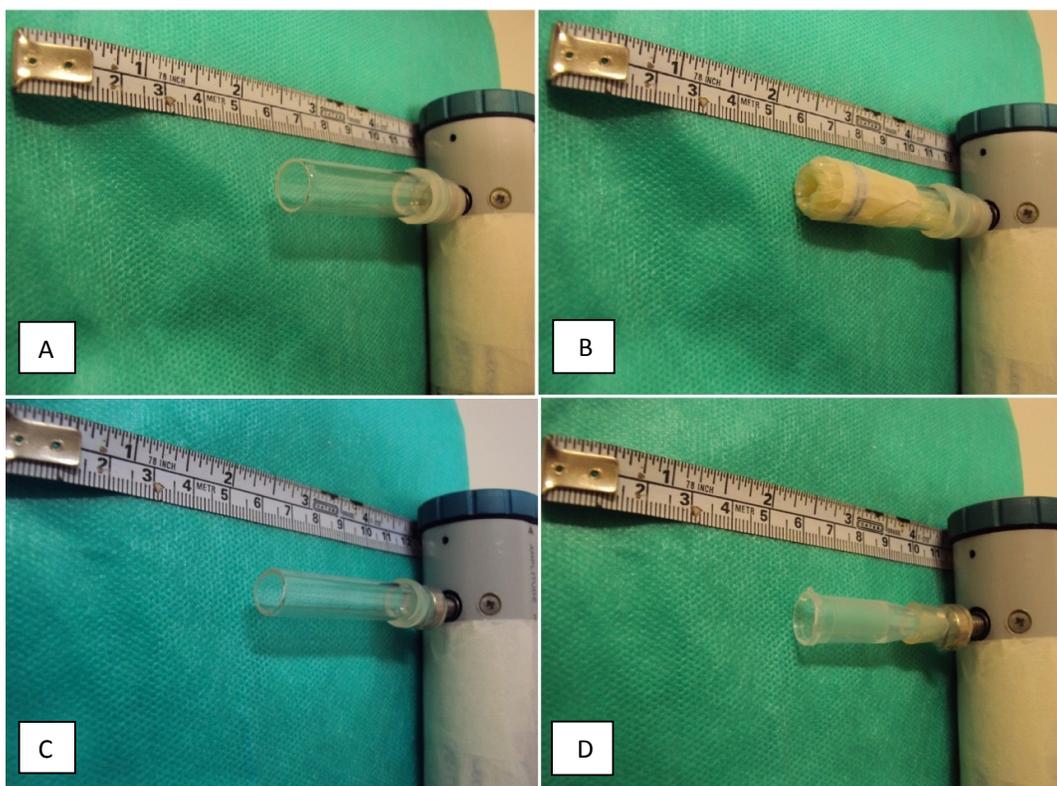


Figura 6. (A) Tubo de vidro de 10 mm de diâmetro. (B) Tubo de vidro de 10 mm de diâmetro com a adaptação de película de látex. (C) Tubo de vidro de 8 mm de diâmetro. (D) Tubo de polipropileno com fundo cônico. Fonte: SCPrim/Fiocruz – Rio de Janeiro, 2011.

4.7. Avaliação do sêmen

A qualidade espermática foi avaliada pela motilidade, (MPL), grau de motilidade, concentração, morfologia, IMP, IMA, atividade mitocondrial, pH e volume do ejaculado. Quando coagulado sobre o pênis do animal, o ejaculado foi retirado com o auxílio de um pinça e depositado sobre o meio de diluição, (Figura 5C e D).

O pH foi avaliado no plasma seminal imediatamente após a colheita, antes da diluição do sêmen, por meio de fita colorimétrica (Spezial-Indikatorpapier, Machery-Nagel[®], Der Dalheimer Wiese, Mainz –Mombach, Alemanha). O volume do ejaculado foi mensurado em microtubo graduado pela diferença entre o volume total (amostra com meio diluidor) e a alíquota do meio adicionado (TALP HEPES).

As amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C durante o fracionamento para as avaliações. Para as análises de motilidade total, espermatozóides com MPL, (escala de 0 a 100%) e grau de motilidade (escala de 0 a 5), adaptado de Yeoman et al., (1997; 1998), uma amostra diluída (20 µL) foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas (mesa aquecedora, Mod. NT338D, Novatécnica[®], Piracicaba/ SP, Brasil), para avaliação de forma subjetiva em microscopia de campo claro com aumento de 400 X (microscópio óptico Eclipse 50i, Nikon[®], Japão). A concentração espermática foi determinada na câmara de Neubauer, após a diluição da amostra (proporção 1:10) em formol salino tamponado a 37° C.

A morfologia espermática foi avaliada pela técnica de preparação úmida, após a diluição da amostra em formol salino (proporção 1: 10). Foram avaliadas 200 células por lâmina em microscopia de contraste de fase em 1000 X (Eclipse 80i, Nikon[®], Japão). A classificação foi baseada no Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998).

Para a avaliação IMP, foi utilizada a coloração de eosina-nigrosina e, para avaliação da IMA, foi utilizada a coloração descrita por Pope et al. (1991) (kit de coloração Spermac[®], Stain Enterprises, África do Sul), ambas validadas para uso em sêmen de primatas (Valle et al., 2008). Às alíquotas de 5 µL da amostra de sêmen foram adicionados 5 µL de eosina (1 %) e 5 µL de nigrosina (1%), após intervalo de 30 segundos. Duzentas células foram lidas em microscopia de campo claro no aumento de 400 X. Os espermatozóides não corados foram considerados com membrana plasmática íntegra e os espermatozóides com coloração rósea, considerados com membrana não íntegra. Para a avaliação de IMA, utilizou-se 5 µL da amostra e 5 µL do corante, seguiu-se a incubação por 90 segundos a 37° C em microtubo

âmbar. As lâminas contendo o esfregaço foram avaliadas em microscopia de campo claro com aumento de 100 X (microscópio óptico Eclipse 50i, Nikon®). Espermatozoides com o acrossoma íntegro apresentaram o acrossoma com coloração mais escura e espermatozoides com o acrossoma não íntegro não tiveram a coloração diferenciada nessa região, (Figura 7 A e B).

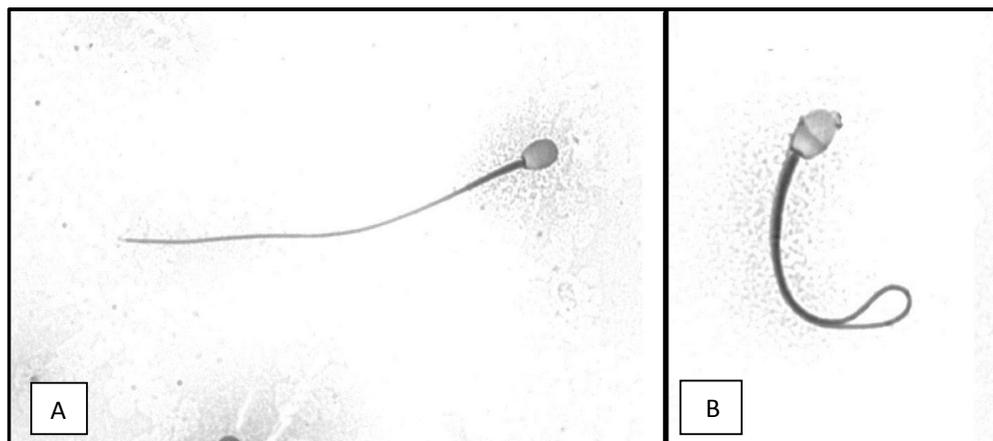


Figura 7. (A) Espermatozóide apresenta a membrana acrossomal íntegra. (B) Espermatozóide apresenta a membrana acrossomal não íntegra. Fonte: SCPrim/Fiocruz – Rio de Janeiro, 2011.

A atividade mitocondrial foi determinada pelo método de coloração descrito por Hrudka (1987). Uma alíquota de 10 μ L da amostra de sêmen foi adicionada a 10 μ L da solução de 3,3' de diaminobenzidina (DAB) a 37° C (1mg de DAB: 1 mL de PBS) e depositada em microtubo de polipropileno âmbar. Após a incubação em banho-maria por 1h e 30 min, foi realizado esfregaço da mistura. Em seguida, a lâmina foi seca em temperatura ambiente na ausência de luz e depois fixada em formaldeído (10%) por 10 minutos e seca nas mesmas condições. A leitura foi feita em microscopia de luz direta, aumento de 100 X (Microscópio óptico Eclipse 50i Nikon®, Japão) e classificada de I a IV. Classe I: maioria das mitocôndrias ativas (coloração castanha), conferindo à bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente; classe II: a bainha mitocondrial fragmentada, com segmentos ativos (corados) e inativos (não corados), com predominância de segmentos corados; classe III: apresentam menos da metade da bainha mitocondrial ativa e corada com poucos segmentos corados e dispersos; classe IV: apresentam bainha mitocondrial completamente inativa, não corada.

4.8. Colheita de fezes e mensuração de testosterona no extrato fecal

As colheitas de fezes ocorreram uma vez ao mês, sempre nas segundas-feiras pela manhã (7:00 às 10:00 h). Os animais foram separados nos recintos por uma placa em polipropileno, (Figura 3B). As fezes foram recolhidas nas bandejas previamente higienizadas e transferidas para microtubos de polipropileno, com capacidade para 1,5 mL (Labcon® North America, Petaluma, C.A., USA, 2010), identificados com a data e número do animal. As amostras foram mantidas congeladas (-20° C), até a obtenção do extrato fecal.

Utilizou-se a metodologia de extração hormonal adaptada de Graham et al. (2001). As amostras foram descongeladas e homogeneizadas no microtubo com o uso de espátula de polipropileno. Em seguida, uma alíquota de 0,3 g do homogeneizado foi obtida em balança digital (Shimadzu®, modelo BL 320 H, Presidente Prudente/SP, Brasil) e depositada em tubos de polipropileno tipo Falcon de 15 mL (JPROLAB®, Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda, São José dos Pinhais, PR). Três mililitros de etanol a 70 % (Álcool Etilico Absoluto ISO FAR®, Indústria e Comércio de Produtos Químicos, Ltda, Duque de Caxias/RJ, Brasil) foram adicionados a cada alíquota de fezes e agitados por 30 segundos (Agitador AP 56, Phoenix Lufferco, Araraquara, SP, Brasil). A seguir, os tubos foram homogeneizados simultaneamente, por 16 horas, em homogeneizador de soluções (APP 22, Phoenix Lufferco®, Araraquara, SP, Brasil), (Figura 8A). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min (Centrífuga 802B, marca Centribio®, Equipar Ltda, Boqueirão, Curitiba, PR) e o sobrenadante obtido foi recolhido, em duplicata, em microtubos de polipropileno (capacidade 1,5 mL) hermeticamente fechados e estocados em freezer a -20° C, para a dosagem de testosterona no extrato fecal.

Para as dosagens utilizou-se o sistema automatizado de quimioluminescência (Listed Laboratory Equipment 7 C20 UL®, MH 15423, série 3975, DPC Immulite I) e o conjunto diagnóstico comercial para Testosterona total (Immulin® 1000 Systems, Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd, Glyn Rhonwy, Llbamberis, Gwynedd LL55 4 EL, Reino Unido), (Figura 8B). O método baseia-se em um imunoenensaio competitivo de fase sólida, com tecnologia de quimioluminescência direta com sensibilidade de 15 ng/ dL ou 0,15 mg/ mL e coeficiente de variação intra e interensaios de 6,8 a 13 % e total de 7,7 a 16,4 %. Os resultados das leituras no aparelho, expressos em ng/ dL, foram convertidos em µg/ g de fezes úmidas, conforme Ziegler e Wittwer (2005).

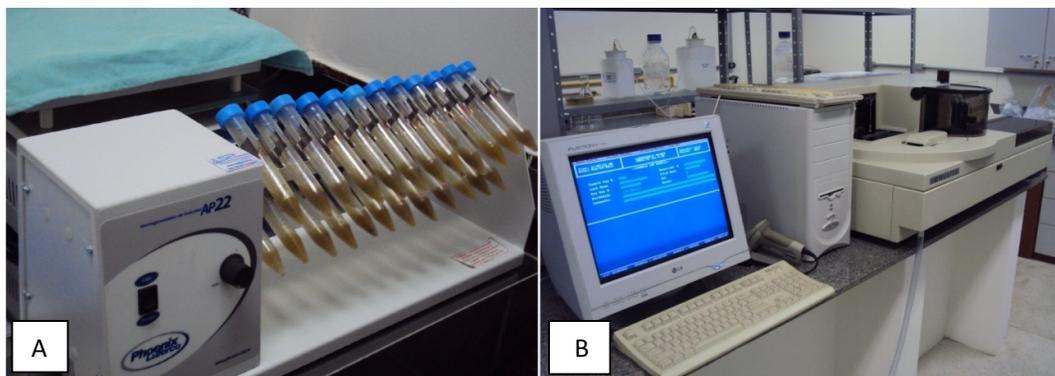


Figura 8. (A) Processo de homogeneização de fezes. (B) Sistema automatizado de mensuração de testosterona por quimioluminescência. Fonte: SCPrim/Fiocruz – Rio de Janeiro, 2011.

4.9. Validação fisiológica dos ensaios hormonais

A validação fisiológica foi realizada por meio de desafio hormonal com a utilização de um análogo sintético de GnRH (Lecirelina, Gestran Plus[®], 25 µg/ mL, Tecnopec, São Paulo/ SP). Oito dos doze machos adultos, utilizados no estudo, participaram do desafio hormonal no período de 28 de março a 04 de abril de 2012. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de quatro animais (desafio e controle).

O ensaio foi realizado em oito dias consecutivos (D1 a D8). No D3, os animais foram desafiados com uma injeção intramuscular de lecirelina, na dose de 7,5 µg ou volume total de 0,3 mL/ animal, a fim de promover um pico fisiológico de testosterona. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de solução salina 0,9 %, também pela via intramuscular. As amostras de fezes (n = 64) foram colhidas entre 8:00 e 10:00 h. A obtenção do extrato fecal e a dosagem de metabólitos foram descritas acima.

Comparou-se o perfil hormonal e os valores de pico (média + 1,5 DP) dos grupos no D1 ao D8. As médias e DPs dos grupos controle e desafiado foram, respectivamente, 180,58 ± 65,30 e 247 ± 202,87 µg/ g de fezes úmidas. Observou-se ocorrência de pico nas concentrações de testosterona no extrato fecal apenas no grupo desafiado, o qual ocorreu em 48 horas após a injeção do GnRh (D5) com queda gradativa a partir de 72 h, até a observação de valores basais no D8, (de 555,75 ± 538,46 para 98,53 ± 68,79 µg/ g de fezes úmidas), (Figura 9).

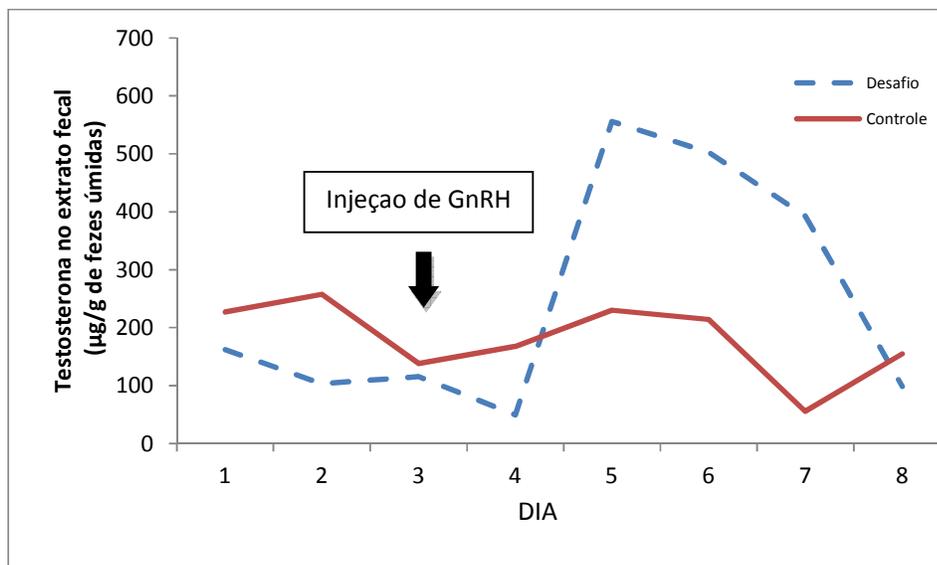


Figura 9: Gráfico de validação fisiológica: Perfil de testosterona no extrato fecal de animais desafiados (n=4) e controle (n=4) após injeção de GnRH no D3. No grupo desafiado observou-se um pico (média + 1,5 DP) na concentração de testosterona 48 h após a injeção de GnRH no D5, com queda gradativa a partir de 72 h até a observação de valores basais a partir do D8.

4.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os procedimentos (PROC MEANS, PROC FREQ, PROC UNIVARIANTE, SAS 2002, versão 8.0). Na avaliação da concentração de testosterona no extrato fecal, foi considerada como valores de pico a média acrescida de 1,5 vezes seus respectivos desvios padrões (Brown et al., 1996, Kugelmeier et al., 2011). Variação de massa corporal no período do estudo, quando superior a 15%, foi considerada picos nos respectivos meses em que esse aumento foi obtido. Para as características de massa corporal, volume testicular e concentração de testosterona no extrato fecal, os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média. Foi realizada a análise de variância e calculada a correlação de Pearson para essas características.

Para as características de sêmen, os resultados foram apresentados pela média e erro padrão da média. Foi realizada a análise de variância para as características pH, volume, motilidade, MPL, concentração, IMP, IMA, AM, para verificar o efeito da idade do animal. Foram consideradas duas categorias de faixa etária (idade I, animais de 7 anos, N=3) e (Idade II, animais de 11 e 13 anos, N=4). Para avaliação do grau de motilidade, utilizou-se o teste qui-quadrado. Para comparação das médias, utilizou-se o teste t de Student com nível de significância de 5%.

5. DESENVOLVIMENTO

5.1. ARTIGO I

Artigo I

(Formato ABNT)

Massa corporal, biometria testicular e concentração de testosterona no extrato fecal de micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*, Linnaeus, 1758) mantidos sob condições ambientais controladas ao longo de doze meses

VIANA, C. F.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; CARCIOFI, A. C.; KUGELMEIER, T.; QUIRINO, C. R.; LEAL, G. M.; FAES, M. R.; CABRAL, M. J. F.

RESUMO

Saimiri sciureus são pequenos primatas neotropicais com estações de acasalamentos e partos sazonais no ambiente natural e no cativeiro. Durante a estação de acasalamento, desenvolvem alterações morfofisiológicas e comportamentais como aumento de massa corporal, mais evidente na região anterior dos machos (*fattig*). Elevação do volume testicular e concentração de testosterona também foram descritos nos machos em estudos prévios. No Brasil, não houve nenhum trabalho que avaliasse a massa corporal, o volume testicular e concentrações de testosterona em micos-de-cheiro nas condições deste estudo. Desta maneira, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a manifestação de *fattig* em machos da espécie *S. sciureus* (n = 12) de 7 a 13 anos de idade, por meio da avaliação da massa corporal, do volume testicular e da concentração de testosterona em extrato fecal ao longo do ano, mantidos isolados de fêmeas e sob condições ambientais controladas (luminosidade, temperatura e umidade).

A cada 15 dias, foram medidas a massa corporal e o volume testicular. Amostras de fezes foram colhidas mensalmente para a mensuração de testosterona no extrato fecal por quimioluminescência. Os valores mais elevados de massa corporal ocorreram em julho (981,00 ± 92,26 g), dezembro (964,17 ± 78,09 g), janeiro (965,33 ± 60,22 g) e fevereiro (957,92 ± 107,30 g), (p < 0,05). Houve diferença no volume testicular entre os meses de setembro (1664,1 ± 538,6 mm³) e fevereiro (1391,6 ± 400,2 mm³), (p < 0,05). O mês de pico (pico = média + 1,5 DP) da concentração de testosterona no extrato fecal foi abril (393,9 ± 53,3 µg/g). Nas condições em que os animais foram mantidos no presente estudo, não foi

observado uma sincronização da variação entre massa corporal, volume testicular e testosterona no extrato fecal com os meses correspondentes à estação de acasalamento dos grupos sociais de origem dos animais. Possivelmente esta ausência de sincronização se deve ao completo isolamento dos animais das condições ambientais naturais e de estímulos sensoriais (contato físico, odor, vocalização e visão) com animais dos grupos sociais. Essas evidências podem indicar que o controle das características avaliadas não é endógeno, porém, esse necessita ser melhor investigado em estudos futuros. Este estudo pode contribuir como base para a manutenção de micos-de-cheiro em cativeiro nas condições ambientais controladas.

Palavras chaves: Primatas não humanos, testosterona, fisiologia reprodutiva do macho, *fattening*, sazonalidade.

ABSTRACT

Body weight, testicular biometry, and testosterone level in the fecal extract of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*, Linnaeus, 1758) maintained under controlled environmental conditions during twelve months

Saimiri sciureus are small neotropical primates with markedly seasonal breeding behavior in the wild and in captive. During the breeding season, behavioral and morphophysiological changes occur, including an increased body mass, most evident in the upper body of males (*fattening*). Increase in testicular volume and testosterone levels in males during the breeding season have also been reported in previous studies. The aim of this study was to assess longitudinal changes in body mass, testicular volume, and testosterone levels in fecal samples of twelve captive male squirrel monkeys with ages varying between 7 to 13 years. In Brazil, there was no study on assessment of these parameters in the analyzed simian species under the conditions as described here. The animals were housed without visual, olfactory and auditory contacts with conspecific females. Body mass and testicular volume were measured every 15 days. Fecal samples were collected monthly to assess testosterone levels in fecal extract via chemiluminescence. The highest values of body mass occurred in July ($981,00 \pm 92,26$ g), December ($964,17 \pm 78,09$ g), January ($965,33 \pm 60,22$ g) and February ($957,92 \pm 107,30$ g) ($p < 0.05$). Differences in the mean of testicular volume between the months of September (1664.1 ± 538.6 mm³) and February (1391.6 ± 400.2 mm³) ($p < 0.05$) were observed. The

peak month (mean + 1,5 SD) of the of testosterone levels in the fecal extract was April ($393,9 \pm 53,3 \mu\text{g/g}$). Under conditions in which the animals were maintained in the present study, no synchronization of changes between body mass, testicular volume, and testosterone levels in the fecal extract were detected with the corresponding months of mating of the original social groups. Probably this lack of synchronization is due to the complete segregation of the animals and the natural environmental conditions of sensory stimuli (physical touch, smell, vocalization, and vision) from the original social groups. These evidences indicate that the control of characteristics evaluated is not endogenous and demonstrate further detailed investigation in future studies. This study can strongly contribute as a base for the maintenance of captive squirrel monkeys kept in controlled environmental conditions.

Key words: nonhuman primates, testosterone, reproductive physiology of male, fattening, seasonality.

INTRODUÇÃO

Os micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*, LINNAEUS, 1758) apresentam um padrão reprodutivo sazonal com estações definidas ao longo do ano (COE; ROSENBLUM, 1978; BALDWIN, 1981; SCHIML et al., 1996). Próximo e durante a estação de acasalamento ocorrem alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais em fêmeas e machos (DUMOND; HUTCHINSON, 1967; COE; ROSENBLUM, 1978; CHEN et al., 1981; COE et al., 1985; MENDOZA et al., 1999). O aumento de massa corporal é mais evidente nos machos, nos quais a região dorsal e membros superiores apresentam-se mais volumosos. A esse fenômeno foi dado o nome de *fattening* (DUMOND; HUTCHINSON, 1967). As mudanças na interação social entre os integrantes do grupo (BALDWIN, 1985) e a adequação de nicho alimentar em função da disponibilidade de alimentos (STONE et al., 2007) devem fazer do *fattening* uma vantagem adaptativa ao sucesso reprodutivo para esses animais no ambiente natural (BOINSKI, 1987).

O ganho médio de massa corporal pelos machos na estação de acasalamentos é de 15 % (ZIMBLER-DELORENZO; STONE 2011). Machos em grupos reprodutivos chegaram a ganhos de massa corporal acima de 230 g (DUMOND; HUTCHINSON, 1967; COE; ROSENBLUM, 1978; MENDONZA et al., 1978). O volume testicular também pode se elevar nessa estação em machos intactos, assim como a concentração de testosterona (COE;

ROSENBLUM, 1978; PASQUALINI et al., 1986; SCHIML et al., 1999) e androstenediona (WIEBE et al., 1988). Os andrógenos são responsáveis por comportamentos sexuais como a marcação de território, a agressão, a corte e o acasalamento (ASA, 1996). Em micos-de-cheiro, a concentração de testosterona dosada em soro e plasma foi superior a 100 ng/mL na estação de acasalamento (SCHIML et al., 1999; GROSS, et al., 2008). Grupos reprodutivos recém-formados estabeleceram um padrão de acasalamento e parto, com alterações morfofisiológicas em machos e fêmeas que se mantiveram em padrão sazonal nessas condições (quais condições?) (COE; ROSENBLUM, 1978; SCHIML et al., 1999). Machos em grupos reprodutivos apresentaram maior concentração de testosterona plasmática do que mantidos em pares heterossexuais, o que sugere uma evidência da influência da interação social sobre a concentração desse hormônio nestes machos e a manifestação do *fattig* (SCHIML et al., 1996). No entanto, Coe e Rosenblum (1978) verificaram que esses hormônios potencializaram o grau de *fattig* em machos intactos, mas a falta desses hormônios nos machos castrados não impediu a ocorrência de montas, comportamentos de corte e manifestação de dominância. Em grupos isossexuais, os machos apresentaram variações circanuais de massa corporal, volume testicular e testosterona que persistiram sob condições de luminosidade constantes (PASQUALINI; COLILLAS; RIVAROLA, 1986).

Desta maneira, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a manifestação de *fattig* em machos da espécie *S. sciureus*, mantidos isolados de fêmeas e sob condições ambientais controladas (luminosidade, temperatura e umidade) por meio da avaliação da massa corporal, do volume testicular e da concentração de testosterona em extrato fecal ao longo do ano.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (LW-9/11). Todos os experimentos foram realizados no criadouro científico da Fiocruz, Serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim), localizado em Manguinhos (22°52'39.06" S e 43°14'46.20" W) no Rio de Janeiro, RJ, cadastrado no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) sob o nº 77933.

Os animais

Foram utilizados doze animais machos adultos, com idade entre 7 e 13 anos, nascidos em cativeiro. Os animais foram monitorados de fevereiro de 2011 a janeiro de 2012. Os dados

foram avaliados mês a mês e, quando pertinentes, comparados à estação de acasalamentos dos grupos sociais da criação de micos-de-cheiro da Fiocruz. A estação de acasalamentos foi determinada por meio do cálculo médio (últimos três anos), obtido pela contagem retroativa (meses do primeiro ao último parto no ano) e considerando o tempo de gestação de cinco meses (WIEBE et al., 1988).

Antes do estudo, os animais foram mantidos em grupos isossexuais em instalações e condições de manejo como descrito por Moura et al., (2010). Os machos foram selecionados por meio da avaliação de características fenotípicas e parâmetros sanguíneos normais para a espécie, conforme Andrade et al. (2004), bem como avaliação da genitália externa (pênis, prepúcio, bolsa escrotal, consistência, mobilidade e simetria dos testículos), segundo o Manual de exame andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). Adicionalmente, foi realizado exame ultrassonográfico da cavidade abdominal e testículos para assegurar a inexistência de sinais de enfermidades ou má formação destas estruturas.

Instalações

Os animais foram mantidos em dupla, seguindo as recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 2011), em recintos (gaiolas) de aço inox (65 x 65 x 80 cm de altura), equipados com poleiros e plataformas para enriquecimento ambiental. Os recintos foram instalados em sala (3,30 x 3,40 x 3,00 m) com iluminação controlada (CE 12:12h) por timer (Coelmatic L®, RTST/20, Manaus/AM, Brasil), temperatura (24 a 26° C) e umidade relativa do ar (60 a 70%) mantidas por aparelho de ar condicionado (Hi Wall Diamond Springer Carrier®, Canoas/RS, Brasil), exaustor (Cata®, Dut in-line, 100/270, São Paulo/SP, Brasil) e monitoradas por um termo-higrômetro digital (Incoterm®, Porto Alegre/RS, Brasil). Os machos de diferentes recintos mantiveram contato visual, olfatório e auditivo entre si, porém sem contato com fêmeas.

Manejo

A cada dupla de animais, foi disponibilizada ração experimental (200 g), com 24 % de proteína bruta (PTN), 10 % de extrato etéreo (EE) e 3,83 % de fibra bruta (FB), 1,2 % de cálcio (Ca) e 0,80 % fósforo (P), formulada conforme as recomendações do National Research Council, Nutrient requirements of nonhuman primates (NRC, 2003), 220 g de alimentos *in natura* (banana, manga, melancia e jiló) e água *ad libitum*.

A lavagem completa dos recintos ocorreu em dias alternados com água sobre pressão (Lavadora Tekna® HLX 95V Nordtech, Curitiba/PR, Brasil) e sabão neutro (Detergente

Neutro Cordex[®], Cordeiro de Medeiros Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro/RJ - Brasil). Ocorria diariamente a higienização das bandejas de recolhimento de dejetos, plataformas, poleiros, brinquedos, bebedouros e comedouros. Os recintos e utensílios foram secos antes de serem devolvidos para uso.

Diferentes elementos foram disponibilizados para enriquecimento ambiental no decorrer do estudo, a fim de proporcionar-lhes estímulos visuais, táteis, auditivos, gustativos e olfativos e contribuir para o bem estar no cativeiro, como sons que mimetizam o ambiente de floresta e música clássica, balanços, poleiros e plataformas em polipropileno. Como estímulos gustativos e sensoriais, foram oferecidos cana-de-açúcar (*Saccharum sp*), pipocas, larvas de insetos (*Tenebrio molitor*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), hortelãs (*Menthas sp*), flores de hibisco - colibri (*Malvaviscus arboreus*) em quantidade e frequência, conforme programação prévia.

Contenção para pesagens e biometria testicular

Para avaliação da massa corporal, os animais eram retirados dos recintos em caixas de contenção e transporte e pesados em balança digital (W-100/2, Welmy[®], Indústria e Comércio Ltda, Santa Bárbara do Oeste/SP, Brasil), conforme descrito por Kugelmeier (2011). Depois, as caixas contendo os animais eram levadas até a sala de manejo, que foi mantida com iluminação reduzida e temperatura de 24° C. O tempo de contenção de cada animal não ultrapassou 30 min. Esses procedimentos foram repetidos a cada 15 dias por animal.

A contenção foi feita com luvas de couro adaptada com uma fita de velcro que envolvia a região torácica do animal. Essa luva foi sobreposta por luvas de aço e látex. O animal foi posicionado sobre um suporte de aço inoxidável que possuía um aparato vertical em lona, que reduzia o campo de visão entre o animal e o operador (Kugelmeier, 2011). Durante todos os procedimentos, o animal permaneceu com as mãos livres para manipular os alimentos que foram disponibilizados (pedaços de bananas e larvas de insetos *Tenebrio molitor*). As medidas de largura e comprimento dos testículos foram obtidas por meio de paquímetro universal para a obtenção do volume dos testículos pela equação do elipsóide $V = 4/3\pi ab^2$, em que “a” corresponde à metade do comprimento do testículo e “b” à metade da largura (PASQUALINI; COLILLAS; RIVAROLA, 1986).

Colheita de fezes e mensuração de testosterona no extrato fecal

A colheita de fezes ocorreu uma vez ao mês, sempre na segunda-feira pela manhã (7:00 às 10:00 h). Os recintos foram divididos por uma placa em polipropileno para manter os animais individualizados para o procedimento. As fezes foram recolhidas nas bandejas previamente higienizadas e transferidas para microtubos de polipropileno, com capacidade para 1,5 mL (Labcon® North America, Petaluma, C.A., USA, 2010), identificados com a data e número do animal. As amostras foram mantidas congeladas (-20° C) até a obtenção do extrato fecal.

Utilizou-se a metodologia de extração hormonal adaptada de Graham et al., (2001). As amostras foram descongeladas e homogeneizadas no microtubo com o uso de espátula de polipropileno. Em seguida, uma alíquota de 0,3 g do homogeneizado foi obtida em balança digital (Shimadzu®, modelo BL 320 H, Presidente Prudente/SP, Brasil) e depositada em tubos de polipropileno tipo Falcon de 15 mL (JPROLAB®, Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda, São José dos Pinhais, PR). Três mililitros de etanol a 70 % (Álcool etílico absoluto ISO FAR®, Indústria e Comércio de Produtos Químicos, Ltda, Duque de Caxias/RJ, Brasil) foram adicionados a cada alíquota de fezes e agitados por 30 seg (Agitador AP 56, Phoenix Lufferco, Araraquara, SP, Brasil). A seguir, os tubos foram homogeneizados simultaneamente por 16 h em homogeneizador de soluções (APP 22, Phoenix Lufferco®, Araraquara, SP, Brasil). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min (Centrífuga 802B, marca Centribio®, Equipar Ltda, Boqueirão, Curitiba, PR) e o sobrenadante obtido foi recolhido em duplicata em microtubos de polipropileno (capacidade 1,5 mL), hermeticamente fechados e estocados em freezer a -20° C, para a dosagem de testosterona no extrato fecal.

Para a mensuração de testosterona, utilizou-se o sistema automatizado de quimioluminescência (Listed Laboratory Equipment 7 C20 UL®, MH 15423, série 3975, DPC Immulite I) e o conjunto diagnóstico comercial para Testosterona total (Immulite® 1000 Systems, Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd, Glyn Rhonwy, Llamberis, Gwynedd LL55 4 EL, Reino Unido). O método baseia-se em um imunoenensaio competitivo de fase sólida, com tecnologia de quimioluminescência direta com sensibilidade de 15 ng/ dL ou 0,15 mg/ mL e coeficiente de variação intra e interensaios de 6,8 a 13 % e total de 7,7 a 16,4 %. Os resultados das leituras no aparelho, expressos em ng/ dL, foram convertidos em µg/ g de fezes úmidas, conforme Ziegler e Wittwer (2005).

Validação fisiológica dos ensaios hormonais

A validação fisiológica foi realizada por meio de desafio hormonal com a utilização de um análogo sintético de GnRH (Lecirelina, Gestran Plus[®], 25 µg/ mL, Tecnopec, São Paulo/ SP). Oito dos doze machos adultos, utilizados no estudo, participaram do desafio hormonal. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de quatro animais (desafio e controle).

O ensaio foi realizado em oito dias consecutivos (D1 a D8). No D3; os animais foram desafiados com uma injeção intramuscular de lecirelina, na dose de 7,5 µg ou volume total de 0,3 mL/ animal, a fim de avaliar se os animais iriam responder à administração do GnRH com a síntese e liberação de testosterona. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de solução salina 0,9 %, também pela via intramuscular. As amostras de fezes (n = 64) foram colhidas entre 8:00 e 10:00 h. A obtenção do extrato fecal e a mensuração de testosterona foram descritas acima.

Comparou-se o perfil hormonal e os valores de pico (média + 1,5 DP) dos grupos no D1 ao D8. As médias e DPs dos grupos controle e desafiado foram $180,58 \pm 65,30$ e $247 \pm 202,87$ µg/ g de fezes úmidas, respectivamente. Observou-se ocorrência de pico na concentração de testosterona apenas no grupo desafiado, o qual ocorreu em 48 h após a injeção do GnRh (D5), com queda gradativa a partir de 72 h até a observação de valores basais no D8, (de $555,75 \pm 538,46$ para $98,53 \pm 68,79$ µg/ g de fezes úmidas).

Análise estatística

Foi realizada a consistência dos dados e a estatística descritiva das características por meio da média e desvio padrão, utilizando os procedimentos (PROC MEANS, PROC FREQ, PROC UNIVARIANTE, SAS 2002, versão 8.0). Na avaliação da concentração de testosterona no extrato fecal, foi considerada valor de pico a média acrescida de 1,5 vezes seus respectivos desvios padrão (Brown et al., 1996; Kugelmeier et al., 2011). Variação de massa corporal no período do estudo superior a 15% foi considerada picos nos respectivos meses em que esse aumento de massa corporal foi obtido. Foi realizada a análise de variância e calculada a correlação de Pearson pelo PROC CORR (SAS, 2002, versão 8.0) para as características de massa corporal, volume testicular e concentração de testosterona no extrato fecal. Utilizou-se o teste t de Student com nível de significância de 5% para comparação das médias. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média.

RESULTADOS

Os valores mínimos e máximos de massa corporal e testosterona no extrato fecal de cada animal e os respectivos meses de pico para essas características estão apresentados na tabela 1. Os valores de médias de massa corporal, volume testicular e testosterona no extrato fecal dos animais, obtidos mês a mês, estão apresentados na tabela 2.

Os maiores valores de massa corporal ocorreram em julho ($981,00 \pm 92,26$ g), dezembro ($964,17 \pm 78,09$ g), janeiro ($965,33 \pm 60,22$ g) e fevereiro ($957,92 \pm 107,30$ g), ($p < 0,05$), tabela 2.

Houve diferença nas médias de volume testicular entre os meses de setembro ($1664,1 \pm 538,6$ mm³) e fevereiro ($1391,6 \pm 400,2$ mm³), ($p < 0,05$, tabela 2).

O mês que ocorreu o pico (média + 1,5 DP) da concentração de testosterona no extrato fecal foi abril ($393,9 \pm 53,3$ µg/g, Figura 1), porém não diferiu estatisticamente dos meses de maio ($333,63 \pm 182,67$ µg/g), dezembro ($303,25 \pm 209,24$ µg/g), setembro ($284,36 \pm 213,56$ µg/g), março, ($274,25 \pm 177,71$ µg/g), outubro ($267,04 \pm 155,89$ µg/g), agosto ($258,58 \pm 178,26$ µg/g) e junho ($254,83 \pm 290,11$ µg/g), ($p < 0,05$, tabela 2).

Tabela 1. Variação de massa corporal (g) e (%), concentração de testosterona no extrato fecal ($\mu\text{g/g}$ fezes) e meses de pico por indivíduo ao longo do estudo.

Animal	Massa corporal		Testosterona no extrato fecal		
	Varição (g)	Amplitude de variação (g) (%)	Meses de pico	Varição ($\mu\text{g/g}$ fezes)	Meses de pico
1	860 - 1090	230 - 26,7	jan - fev	30,35 - 331,5	NI
2	900 - 1127	227 - 25	jan - jul	132 - 646,0	mai
3	980 - 1067	87- 8,9	NI	19,50 - 642,5	abr
4	880 - 970	90 - 10,2	NI	38,35 - 775,0	jun
5	887 - 1060	173 - 19,5	fev - jul	22,1 - 348,5	dez
6	780 - 930	150 - 19,2	abr	36,05 - 648	mai - set
7	870 - 1020	150 - 17,2	out	47,9 - 730,5	jun
8	865 - 1000	135 - 15,6	jan	42,45 - 711	abr
9	840 - 970	130 - 15,4	fev	73,5 - 531	abr - set
10	800 - 920	120 - 15	dez	35,25 - 663,50	dez
11	980 - 1100	120 - 12,2	NI	10,55 - 426	mar - mai
12	880 - 1010	130 - 14,7	NI	39,05 - 731,50	mar

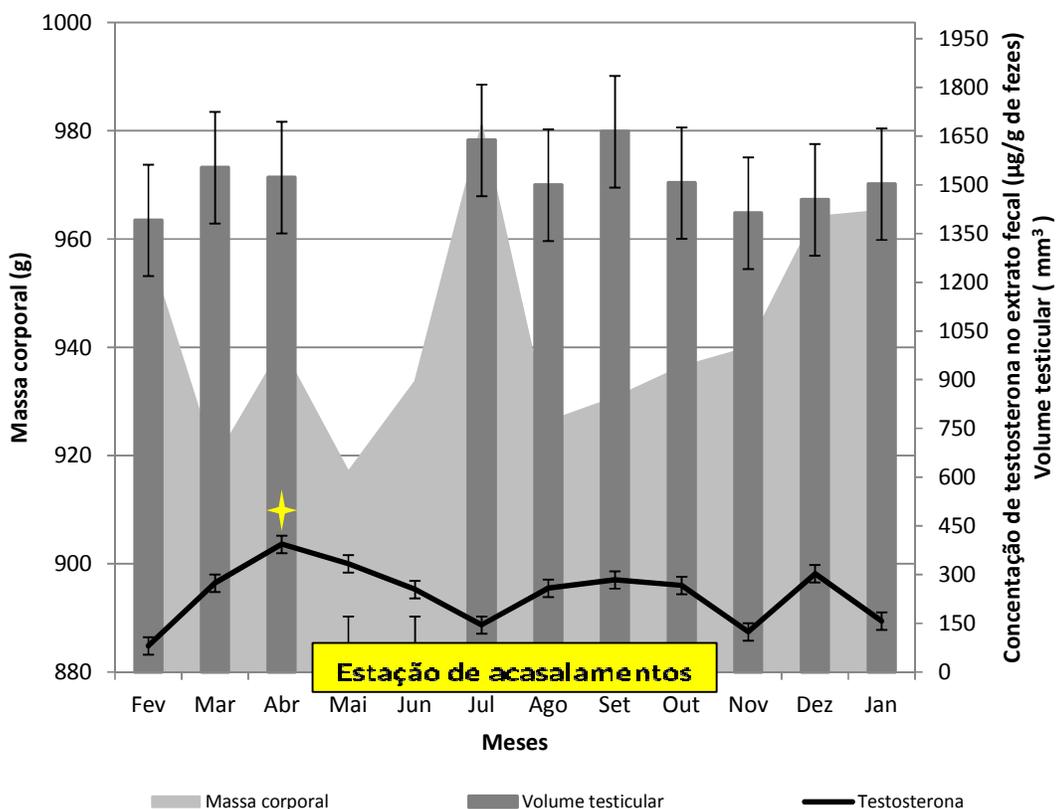
Meses de pico da concentração de testosterona no extrato fecal obtidos pela média + 1,5 DP
Pico de massa corporal, meses em que a média de massa corporal foi acima de 15% sobre a menor média no período. NI, não identificados picos nos critérios avaliados.

Tabela 2. Médias \pm desvios padrão da massa corporal, volume testicular e concentração de testosterona no extrato fecal dos doze animais, apresentados mês a mês.

Mês/ano	Massa (g)	n	Volume testicular (mm ³)	n	Testosterona no extrato fecal (μ g/g de fezes)	n
fev/11	957,92 \pm 107,30 ^{ABC}	24	1391,6 \pm 400,2 ^B	24	81,15 \pm 69,64 ^D	12
mar/11	919,00 \pm 80,19 ^D	20	1553,6 \pm 392,3 ^{AB}	21	274,25 \pm 177,71 ^{AB}	12
abr/11	940,00 \pm 78,32 ^{BCD}	28	1523,1 \pm 417,0 ^{AB}	21	393,88 \pm 184,69 ^A *	12
mai/11	917,08 \pm 77,65 ^D	12	N.A.	0	333,63 \pm 182,67 ^A	12
jun/11	933,68 \pm 78,90 ^{BCD}	19	N.A.	0	254,83 \pm 290,11 ^{ABC}	12
jul/11	981,00 \pm 92,26 ^A	30	1637,6 \pm 323,2 ^{AB}	18	145,34 \pm 89,49 ^{BCD}	12
ago/11	926,33 \pm 67,70 ^{CD}	30	1499,8 \pm 391,1 ^{AB}	20	258,58 \pm 178,26 ^{ABC}	12
set/11	930,77 \pm 72,85 ^{BCD}	13	1664,1 \pm 538,6 ^A	16	284,36 \pm 213,56 ^{AB}	12
out/11	936,47 \pm 65,66 ^{BCD}	17	1506,2 \pm 445,1 ^{AB}	18	267,04 \pm 155,89 ^{ABC}	12
nov/11	940,00 \pm 58,21 ^{BCD}	18	1413,6 \pm 478,9 ^{AB}	19	124,60 \pm 61,83 ^{CD}	12
dez/11	964,17 \pm 50,35 ^{AB}	12	1454,8 \pm 449,8 ^{AB}	15	303,25 \pm 209,24 ^A	12
jan/12	965,33 \pm 60,22 ^{AB}	15	1502,9 \pm 370,7 ^{AB}	13	157,49 \pm 149,48 ^{BCD}	12
Média geral	942,67 \pm 20,09	238	1515,0 \pm 87,18	185	239,87 \pm 93,03	144

As letras diferentes dentro de cada coluna indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$). As linhas em destaque representam os meses de acasalamento dos grupos sociais de origem dos animais deste estudo. O

* Representa valor de pico (média + 1,5 DP) da concentração de testosterona no extrato fecal. N.A. representa os meses não avaliados; n, representa número de amostras em cada mês.



Figural. Perfil de testosterona no extrato fecal, massa corporal e volume testicular dos animais (n = 12). ✦ Representa o mês de pico (média + 1,5 DP) de testosterona no extrato fecal. Os meses em destaque no gráfico (maio a outubro) representam a estação de acasalamento dos grupos sociais de *S. sciureus* no SCPrim-Fiocruz, de onde os animais deste estudo são originários. No gráfico, os perfis de testosterona e de volume testicular estão apresentados com as barras do erro padrão da média.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a média geral da massa corporal dos animais foi de 942, 67 ± 20,09 g, estando dentro da média descrita para o gênero *Saimiri* (700 a 1000 g, SMITH; JUNGERS, 1997). A massa corporal de *S. sciureus* pode variar ao longo da estação reprodutiva (COE; RESONBLUM, 1978). A média obtida no presente estudo foi superior à média anual de 895 g obtida por Coe e Rosenblum, (1978) e ao descrito por Andrade et al., (2004) em avaliações conduzidas fora da estação de acasalamento (851 ± 119 g). No presente estudo, houve aumento significativo da massa corporal em meses que correspondem e não correspondem à estação de acasalamento na criação de origem desses animais (tabela 2). A variação de massa corporal apresentada por esses oito animais, acima de 120 g ou 15 % ao

longo dos meses (tabela 1), evidencia a ocorrência do fenômeno de *fattening* (ZIMBLER-DELORENZO; STONE, 2011) nos machos mantidos em duplas isossexuais, sem qualquer contato com fêmeas e em condições ambientais controladas. Como não houve correlação significativa entre mês e variação de massa corporal e os picos da massa corporal ocorreram em seis meses diferentes, essa condição de *fattening* foi manifestada de forma dessincronizada. Esse fenômeno foi evidenciado em estudos anteriores com micos-de-cheiro sob condições de luminosidade e temperatura controladas (12:12 CE; 22 a 23 °C), onde a variação de massa corporal chegou a 232 g entre as duas estações e evidenciou o fenômeno *fattening* (COE; ROSENBLUM, 1978; SCHILM, et al., 1999). Schilm et al. (1999) compararam grupos isossexuais de machos e de fêmeas. Os dois grupos foram mantidos com contato visual, auditivo e olfativo com grupos reprodutivos da espécie e verificaram que a elevação da massa corporal ocorreu de forma dessincronizada em relação aos grupos sociais, somente nos machos. Nas fêmeas, tanto a variação hormonal como o *fattening* ocorreram sincronizados com o grupo reprodutivo. Os autores atribuem às fêmeas uma maior sensibilidade aos fatores externos e os machos seriam influenciados por esses fatores, quando em contato com elas. Corroborando esse argumento, Latta et al. (1967) já tinham encontrado variação de comportamento dos machos dependente do comportamento de fêmeas receptivas e não receptivas. Segundo Coe e Rosenblum (1978), quando micos-de-cheiro foram mantidos em grupos sociais de multimachos e multifêmeas, a manifestação sincronizada do *fattening* em determinado ano foi influenciada pela estação de acasalamento anterior, a qual pode servir como sinalizador para a manifestação dessa condição. Para Wiebe et al. (1988), existem outros fatores que podem estar envolvidos nesse processo, como a atividade androgênica moderada e a participação de hormônios adrenais.

No presente estudo, a não ocorrência do *fattening* em alguns animais e a manifestação dessincronizada entre eles podem estar relacionadas ao completo isolamento dos animais de qualquer estímulo auditivo, visual e olfativo de grupos sociais ou de fêmea isolada e também pelo fato de que esses animais compunham um grupo isossexual, formado por mais de três anos antes do início do estudo.

Não foi observada variação significativa do volume testicular ao longo do estudo, à exceção do mês de fevereiro, que evidenciou a menor média ($1391,6 \pm 400,2 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$), ao contrário de estudos anteriores onde houve aumento ($P < 0,05$) relacionado à estação de acasalamentos (951 ± 100 a $1792 \pm 95 \text{ mm}^3$) (PASQUALINI; COLILLAS; RIVAROLA, 1986). Naquele estudo, as condições de luminosidade e alimentação foram controladas e os

animais foram capturados em vida livre e mantidos em cativeiro por 6 a 30 meses anteriores ao estudo. Eles foram agrupados em cinco categorias, definidas pela curva de massa corporal apresentadas na estação reprodutiva em registros anteriores. No grupo de maior aumento de massa corporal, também foi encontrado maior volume testicular. Essas características relacionaram também ao aumento de túbulos seminíferos e epitélio germinativo, que foi descrito pelos autores como evidências da ativação anual do processo de espermatogênese.

Os resultados hormonais mostraram grande variação, tanto por animal, quanto por mês, (tabela 1 e 2). Esses resultados estão em acordo com outros estudos sobre a variação hormonal em micos-de-cheiro (WILSON et al., 1978; COE; MENDONZA; LEVINE, et al., 1979; GROSS et al., 2008). Amostras séricas dosadas por radioimunoensaio apresentaram valores entre 96 e 325 ng/mL (testosterona + dihidrotestosterona) (WILSON; BROWN; WILSON, 1978), e 85 ± 19 ng/mL a 180 ± 19 ng/mL (média \pm EP) para testosterona (COE; MENDONZA; LEVINE et al., 1979). Nos estudos de Gross et al. (2008), em que se compararam as concentrações de testosterona pela utilização da técnica de espectrometria de massa, as concentrações variaram dentro e fora da estação de acasalamento, 180 ± 40 ng/ mL e 10 ± 2 ng/ mL (média \pm EP), respectivamente.

Na avaliação mês a mês, o pico de testosterona ocorreu em abril ($393,88 \pm 184,69$ μ g/g de fezes), um mês anterior à estação de acasalamento do grupo social de origem (tabela 2 e figura 1). Schilm et al. (1999) observaram o contrário, em dois anos de estudo com micos-de-cheiro, onde foram comparados grupos sociais com machos e fêmeas mantidos individualmente. No primeiro ano, ocorreu pico de testosterona nos machos individuais, dois meses após a estação de acasalamento dos grupos sociais adjacentes; no segundo ano, não houve pico de testosterona.

Não houve uma correlação significativa entre concentração de testosterona e a massa corporal. Já Mendonza et al. (1978) observaram que, em cinco de seis machos avaliados, o *fattig* ocorreu antes da elevação da testosterona. Para os autores, o *fattig* e a variação na concentração de testosterona mostraram ser eventos dissociados. Segundo Coe e Roseblum (1978), hormônios adrenais devem estar envolvidos no mecanismo de variação da massa corporal, como uma resposta compensatória, já que esses hormônios são altos em micos-de-cheiro. Coe e Roseblum (1978), em estudo com animais em grupos sociais acharam variação de massa corporal e concentração de testosterona sérica em machos castrados, semelhantes e sincronizados aos machos intactos, porém com menor amplitude. Corroborando essa afirmativa, Wiebe et al. (1988) especularam que a androstenediona deve estar envolvida

na elevação de massa corporal dos animais na estação de acasalamentos. No entanto, Pasqualini, Colillas e Rivarola (1986) encontraram relação positiva entre massa corporal, volume testicular e testosterona sérica. A concentração de testosterona apresentou dois picos, um pico foi relacionado com a máxima atividade sexual e um segundo pico foi relacionado com a ativação do epitélio germinativo. O aumento do volume testicular ocorreu posterior aos picos de testosterona. Segundo os autores, o mecanismo endócrino do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal estimula a produção de andrógenos que apresenta, como resposta secundária, um aumento do volume testicular. Boinski (1987), em estudos de comportamento reprodutivo de *S. oerstedii* na Costa Rica, observou um maior número de cópulas por machos que desenvolveram o *fattig*, o que sugere uma relação entre essa condição e o sucesso reprodutivo. Em vida livre, a estação de acasalamento tende a ser menor do que se observa no cativeiro e isso foi atribuído à pressão de predação (ZIMBLER-DELORENZO; STONE, 2011). Chen et al., (1981) acharam maior volume de ejaculados em micos-de-cheiro na estação de acasalamento e acreditam que a elevação no número de cópulas pode aumentar as chances de ejaculação e se tornar vantagem adaptativa do macho nessa estação.

A correlação negativa entre idade e a massa corporal ($r = -0,27$, $p < 0,001$), observada nesse estudo, ou seja, redução da massa corporal com o aumento da idade, vai de encontro ao que se observa nas espécies de primatas (KIRKWOOD, 1985; WATTS, 1986).

CONCLUSÃO

Nas condições do estudo, não ocorreu um perfil de variação entre massa corporal, volume testicular e testosterona no extrato fecal de forma sincronizada com os meses correspondentes à estação de acasalamento dos grupos sociais de origem dos animais estudados, possivelmente ocasionado pelo completo isolamento dos animais das condições ambientais naturais e de estímulos sensoriais (contato físico, odor, vocalização e visão) com os grupos sociais.

Essas evidências podem indicar que o controle das características avaliadas na espécie *Saimiri sciureus* não é endógeno, porém esse necessita ser melhor investigado em estudos futuros. Este estudo pode contribuir como base para a manutenção de micos-de-cheiro em cativeiro nas condições ambientais controladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M.C.R.; RIBEIRO, C. T. SILVA, V.F.; MOLINARO, E.M.; GONÇALVES, M.Â.B.; MARQUES, M. A. P.; CABELLO, P. H.; LEITE, J. P. G. Biologic data of *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis* and *Saimiri sciureus* used for research at the Fiocruz Primate Center. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p.581-589, 2004.
- ASA, C. S. Reproductive physiology. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKIN, S. **Wild animals in captivity: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press, 1996, p. 390-417.
- BALDWIN, J. D. The Behavior of Squirrel Monkeys (*Saimiri*) in Natural Environments. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 35-53.
- BALDWIN, J. D; BALDWIN, J.I. Primates. The squirrel monkeys, genus *Saimiri*. In: Coimbra-Filho A. F.; Mittermeier, R. A. **Ecology and behavior Neotropical**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1981, p. 277-330.
- BOINSKI, S. Mating patterns in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Behav. Ecol. Sociobiol.** v. 21, p. 13-21, 1987.
- BROWN, J. L. **Endocrine manual for hormonal assessment of wildlife species**. Conservation & Research Center National Zoological Park, Front Royal, VA, p. 65, 2008.
- BROWN, J. L., WILDT, D. E., WIELEBNOVSKI, N., GOODROWE, K. L., GRAHAM, L. H., WELLS, S. & HOWARD, J. G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **J. Reprod. Fert.**, 106, p. 337-346, 1996.
- CAFFARO, K. A.; GONCALVES, M. A. B.; BRAVIN, J. S.; GOLDSCHMIDT, B. Enriquecimento ambiental: uma alternativa de bem estar para macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) inseridos na pesquisa biomédica? CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA EM ANIMAIS DE LABORATORIO, 9, 2009. Porto Alegre, **Anais...** Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- CHEN, J. J.; SMITH, E. R.; GRAY, G. D.; DAVIDSON, J. M. Seasonal changes in plasma testosterone and ejaculatory capacity in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Primates**. v.22 (2) p.253–260, 1981.
- COE, C.L.; MENDONZA, S.P.; LEVINE, S. Social status constrains the stress response in the squirrel monkey. **Physiol. Behav.**, v. 23, p. 633-638, 1979.
- COE, C. L.; SMITH, E. R.; LEVINE, S. The endocrine system of the squirrel monkey. In: ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. **Handbook of squirrel monkey research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 191-218.
- COE, C. L.; ROSEMBLUM, L. A. annual reproductive strategy of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Folia Primatol.** v.29, p.19-42, 1978.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ª Ed. Belo Horizonte, 1998. 49p

DUMOND, F. V. and HUTCHINSON, T. C. Squirrel monkey reproduction: the “fatted” male phenomenon and seasonal spermatogenesis. **Sci.**, v.158, p.1067-1070, 1967.

GRAM, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MOSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biol.**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

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

GROSS, K. L.; WESTBERRY, J. M.; HUBLER, T. R.; SADOSKY, P. W.; SINGH, R. J.; TAYLOR, R. L.; SCAMMELL, J. G. Androgen resistance in squirrel monkey (*Saimiri* spp.). **Comparative Med.**, v. 58, nº4, p.381-388, 2008.

INTERNATIONAL PRIMATOLOGICAL SOCIETY (IPS). **International guidelines for the acquisition, care and breeding on nonhuman primates**. UK/USA. 2ª edição, p.76, 2007.

KIRKWOOD, J. K. Patterns of growing in primates. **J. Zool.**, v. 205, p. 123-136, 1985

KUGELMEIER, T. **Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) por vibroestimulação: do condicionamento ao coágulo seminal**. (Tese de Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011, 110 f.

KUGELMEIER, T.; VALLE, R. R.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; MUNIZ, J. A. P. C.; MONTEIRO, F. O. B.; OLIVEIRA, ALVARENGA, C. O. Tracking the Ovarian Cycle in Black-and-Gold Howlers (*Alouatta caraya*) by Measuring Fecal Steroids and Observing Vaginal Bleeding. **Int. J. Primatol.** **JCR**, v. 32, p. 605-615, 2011.

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

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

MENDOZA, S.P., Squirrel monkey In. POOLE, T. (Eds.) **The ufaw handbook on the care and management of laboratory animals**. 7th Ed. Terrestrial vertebrates. Oxford Black. Sci., 1: 591-600, 1999.

MOURA, A. M. A.; VIANA, C. F.; FASANO, D. M. et al. **Manutenção em cativeiro**. In: ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R.; MARINHO, A. M.; FILHO, J. F. Biologia, manejo e

medicina de Primatas não humanos na pesquisa biomédica. Rio de Janeiro: editora Fiocruz, 2010. p. 161-206.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. 8th Washington, D. C.: National Academy Press, 2011, 246p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) **Nutrient requirements of nonhuman primates** 2rd ed. Washington, D. C.: National Academy Press, 2003, p. 308.

PASQUALINI, T.; COLILLAS, O.; RIVAROLA, M. A.; Testicular and serum testosterone variations in *Squirrel monkey* during cyclity. **J. Androl.**, v.7, p. 298-302, 1986.

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

SCHIML, P. A.; MENDONZA, S.P.; SALTMAN, W.; LYONS, D.M.; MASON, W.A. Seasonality in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Physiol. Behav.**, v.60, p. 1105-1113, 1996.

SMITH, R. J.; JUNGERS, W. L. Body mass in comparative primatology. **J. Hum. Evol.**, v.32, p. 523-559, 1997.

STATISTIC ANALYSIS SYSTEM (SAS) Version 8.0. Cary, NC, USA, 2002.

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

WATTS, E. S. **Evolution of the human growth curve** In: FALKNER, F. AND TANNER, J. M. Eds, Human growth. A comprehensive treatise. 1986. 2nd Ed, vol. 1 p.153-166. New York, Plenum press.

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

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

ZIGLER, T. E. AND WITTWER, J. D. Fecal steroid research in the field and laboratory: improved methods for storage, transport, processing, and analysis. **Am. J. Primatol.** v. 67, p. 159-174, 2005.

ZIMBLER-DELORENZO, H. S.; STONE, A. Integration of field and captive studies for understanding the behavioral ecology of the squirrel monkey (*Saimri sp.*). **Am. J. Pimatol.** v. 73, p. 607-622. 2011.

5.2. ARTIGO II

Artigo II

(Formato Animal Reproduction Science)

Características do sêmen de micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) obtido por vibroestimulação peniana de animais mantidos sob condições ambientais controladas

Semen characteristics of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) obtained by penile vibratory stimulation in animals kept under controlled environmental conditions

Clênio F. Viana ^{a, b}; Maria Clara C. Bussiere ^a; Tatiana Kugelmeier ^b; Célia R. Quirino ^a; Rodrigo del R. Valle ^c; Gabriel M. Leal ^b; Wlaysia S. Vasconcelos ^a; Israel P.Santos ^d.

^a Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil

^b Serviço de Criação de Primatas não Humanos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^c Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista, São Paulo, SP, Brasil

^d Secretaria de Estado da Produção Rural, Manaus, AM, Brasil

5.2.1. RESUMO

Características do sêmen de micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) obtido por vibroestimulação peniana de animais mantidos sob condições ambientais controladas

Ao longo de 12 meses por vibroestimulação peniana (VEP) e avaliou suas características sem a dissolução do coágulo. Doze machos adultos (7 a 13 anos) foram mantidos isolados de fêmeas sob condições ambientais controladas, (temperatura, 22 a 24 °C; luminosidade CE, 12:12h; umidade, 60 a 65%). As características do sêmen, pH, volume, motilidade, movimento progressivo linear (MPL), concentração, atividade mitocondrial (AM), integridade de membrana plasmática (IMP), integridade de membrana acrossomal (IMA) e morfologia foram apresentadas de forma descritiva (média \pm erro padrão da média). O grau de motilidade foi apresentado pela frequência obtida pelo teste qui-quadrado. Foi avaliado o efeito da idade sobre as características espermáticas por meio de comparação de médias pelo teste t de Student. Sete dos animais deram amostras (58%). Os valores observados para: motilidade foi de $86,3 \pm 1,7\%$, MPL de $77,3 \pm 2,0\%$ e 50% de grau de motilidade 4 (escala de 0 a 5). O pH foi de $6,8 \pm 0,05$, o volume do ejaculado foi de $478,8 \pm 53,8 \mu\text{L}$ e a concentração de espermatozoides foi de $39,5 \pm 4,9 \times 10^6 /\text{mL}$. A atividade mitocondrial 1 foi de $68,8 \pm 2,4 \%$, (escala de 1 a 4), IMP e IMA foram de $82,3 \pm 1,9$ e $97,8 \pm 0,4 \%$, respectivamente. O total de espermatozoides anormais foi de 43,6%. Houve correlação negativa entre idade dos animais e o volume do sêmen ($r = - 0,49$), e correlação positiva entre idade e concentração e idade e espermatozoides com defeitos maiores, ($r = 0,32$; $r = 0,35$, respectivamente). Conclui-se que é possível colher sêmen durante todo o ano por VEP em *S. sciureus* mantidos em condições ambientais controladas. As características do sêmen mantiveram-se sem variação na qualidade.

Palavras chaves: primatas não humanos; micos-de-cheiro, vibroestimulação peniana, sêmen.

5.2.2. ABSTRACT

Semen characteristics of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) obtained by penile vibratory stimulation in animals kept under controlled environmental conditions

This study aimed to collect semen samples from *S. sciureus* for a period of 12 consecutive months via penile vibratory stimulation (PVS) and analyze them before dissolution of the seminal clotting. Twelve adult males (7 to 13 years of age), were kept isolated from females and under controlled environmental conditions (temperature, 22-24°C; artificial lighting, 12h light: 12h dark; and 60 to 65% humidity). The characteristics of the semen (pH, volume, motility, progressive linear movement, concentration, mitochondrial activity, plasma membrane and acrosomal integrity) are expressed as mean \pm standard error, and degree of motility was presented by frequency. The sperm characteristics related to age were analyzed by the Student's *t*-test. Samples could be obtained from 7 males throughout the study (58%). Motility ($86,3 \pm 1,7$ %), progressive motility ($77,3 \pm 2,0$ %), and percentage of samples showing grade 4 (scale of 0 to 5) (50,0 %) were reported. The pH was $6,8 \pm 0,05$, volume ejaculated was $478,8 \pm 53,8$ μ l and concentration was $39,5 \pm 4,9 \times 10^6$ spermatozoa/ml. Mitochondrial activity 1 (scale of 1 to 4) was $68,8 \pm 2,4$ %. Plasma membrane and acrosome integrity were $82,3 \pm 1,9$ and $97,8 \pm 0,4$ %, respectively. Percentage of morphologically abnormal spermatozoa was 43,6 %. Age showed a negative correlation with semen volume ($r = - 0,49$) and positive correlation with concentration and morphologically abnormal spermatozoa ($r = 0,32$; $r = 0,35$, respectively). In conclusion, semen samples can be collected throughout the year from *S. sciureus* kept under controlled environmental conditions via PVS. Semen characteristics were consistent with those observed in healthy animals as shown in previous studies.

Key words: nonhuman primates, squirrel monkeys, penile vibratory stimulation, semen

5.2.3. INTRODUÇÃO

Os micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) são primatas de pequeno porte (Andrade et al., 2004) que habitam a região da Bacia do Amazonas (Zimble-Delorenzo; Stone, 2011). A maturidade sexual dos machos ocorre aos cinco anos e a expectativa de vida ultrapassa os 20 anos (Mendonza, 1999). A espécie é um importante modelo para o estudo da malária (Pissinatti; Andrade, 2010). No cativeiro sua reprodução é marcada por alto índice de abortamento e morte neonatal (Dukelow, 1985). Sua reprodução é sazonal, com estações de acasalamento e parto restritas a um período do ano tanto em cativeiro, quanto em ambiente natural (Dumond; Hutchinson, 1967; Schiml et al., 1996; Zimble-Delorenzo; Stone, 2011). Apesar de ser uma espécie brasileira, poucos são os trabalhos de origem nacional sobre a sua fisiologia reprodutiva (Kugelmeier, 2011) ou que tenham associado a estação de acasalamentos à colheita e qualidade do sêmen em um estudo longitudinal.

Assim, protocolos de colheita que assegurem a qualidade do sêmen ao longo do ano são fundamentais ao desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas para essa e outras espécies de primatas não humanos (Schneiders et al., 2004; Domingues et al., 2011). A vibroestimulação peniana (VEP) é uma técnica alternativa à eletroejaculação (EEJ) para a colheita de sêmen em pequenos primatas como os micos-de-cheiro, pois não utiliza a contenção química, o estímulo ejaculatório é próximo ao natural, com obtenção de sêmen de melhor qualidade (Yeoman et al., 1997, 1998; Schneiders et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o sêmen de *S. sciureus* por meio de testes físicos, morfológicos e funcionais sem dissolução do coágulo, colhido por VEP em animais mantidos em condições ambientais controladas ao longo de um ano.

5.2.4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no criatório científico da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Serviço de Criação de primatas não humanos (SCPrim), localizado no Rio de Janeiro, RJ (22°52'39.06" S e 43°14'46.20" W). O experimento foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA - FIOCRUZ), licença nº LW-9/11.

5.2.4.1. Seleção dos animais

Doze machos adultos de sete a treze anos de idade, nascidos em cativeiro, foram selecionados por características físicas e parâmetros sanguíneos normais para a espécie (Andrade et al., 2004), avaliação da genitália externa, exame andrológico e avaliação de sêmen (Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998), como também por exame ultrassonográfico da cavidade abdominal e testículos para assegurar a inexistência de sinais de enfermidades ou má formação destas estruturas.

5.2.4.2. Manejo

Os animais foram mantidos em dupla, seguindo as recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 2011), em recintos (gaiolas) de aço inox (65 x 65 x 70 cm de altura), equipados com poleiros e plataformas para enriquecimento ambiental. Os recintos foram instalados em sala (3,30 x 3,40 x 3,00 m) com iluminação controlada (CE 12: 12h) por timer (Coelmatic L®, RTST/20, Manaus/AM, Brasil), temperatura (24 a 26° C) e umidade relativa do ar (60 a 70%), mantidas por aparelho de ar condicionado (Hi Wall Diamond Springer Carrier®, Canoas/RS, Brasil), exaustor (Cata®, Dut in-line, 100/270, São Paulo, SP) e monitoradas por um termo-higrômetro digital (Incoterm®, Porto Alegre/RS, Brasil).

A cada dupla de animais, foi disponibilizada diariamente ração experimental (200g), com 24% de proteína bruta, 10 % de extrato etéreo e 3,83% de fibra bruta, 1,2% de cálcio e 0,80% de fósforo, formulada conforme as recomendações do National Research Council - Nutrient requirements of nonhuman primates (NRC, 2003) e 220 g de alimentos *in natura* (porção composta por banana, manga, melancia e jiló) e água *ad libitum*.

5.2.4.3. Colheita do sêmen

As colheitas de sêmen de cada animal ocorreram em intervalos de quinze dias. Foi utilizado o método de vibroestimulação peniana (VEP) (aparelho FertiCare®, Multicept, Copenhagen, Dinamarca) com um tubo adaptado à base do aparelho conforme descrito para *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997; 1998) e *Callithrix jacchus* (Kuederling et al., 2000 e adaptado por Valle et al., 2008). Inicialmente, utilizou-se um tubo de vidro com 50 mm de comprimento por 10 mm de diâmetro interno com fundo esférico. Após o primeiro mês de estudo, foram realizadas adaptações neste tubo com o intuito de aumentar o contato

sobre o pênis do animal. Uma tentativa foi preenchê-lo com água a 37° C até a metade do seu volume e uma película de látex de preservativo para uso humano, sem lubrificante e autoclavada, cobriu-o internamente, com bordas presas na parte externa do mesmo, similar a uma de vagina artificial. Aos seis meses de estudo, o tubo foi substituído por outro com mesmo comprimento, porém com 8 mm de diâmetro interno, sem látex. Todos os tubos foram aquecidos a 37°C para a colheita.

Aos sete meses de estudo, um animal teve a cauda solta casualmente durante a contenção física para o procedimento de colheita. Após esse episódio, o animal mostrou-se confortável durante o procedimento, de forma que essa condição foi adotada para todos os animais até o final do experimento. Contudo, isto não resultou em alteração no número de animais que ejacularam ou na qualidade do sêmen. Ao nono mês de estudo, o tubo de colheita de vidro foi substituído por um microtubo de polipropileno com 40 mm comprimento e 10 mm de diâmetro interno, porém com fundo cônico.

A cada colheita, os animais eram retirados dos recintos em caixas de contenção e levados até a sala de procedimento, com iluminação reduzida e temperatura de 24°C. A contenção física do animal foi feita com o uso de luvas de couro e o animal foi posicionado sobre o suporte de colheita, onde permaneceu com as mãos livres para a manipulação das frutas que foram oferecidas como recompensa ao procedimento, como descrito por Kugelmeier (2011).

5.2.4.4. Avaliação do sêmen

A qualidade espermática foi avaliada pela motilidade, (MPL), grau de motilidade, concentração, morfologia, IMP, IMA, atividade mitocondrial, pH e volume do ejaculado.

O pH foi avaliado no plasma seminal, imediatamente após a colheita antes da diluição do sêmen, por meio de fita colorimétrica (Spezial-Indikatorpapier, Machery-Nagel®, Der Dalheimer Wiese, Mainz–Mombach, Alemanha). O volume do ejaculado foi mensurado em microtubo graduado pela diferença entre o volume total (amostra mais meio diluidor) e a alíquota do meio adicionado (TALP HEPES).

As amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C durante o fracionamento para as avaliações. Para as análises de motilidade total, espermatozóides com MPL, (escala de 0 a 100%) e grau de motilidade (escala de 0 a 5), adaptado de Yeoman et al., (1997; 1998), uma amostra diluída (20 µL) foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas (mesa aquecedora, Mod. NT338D, Novatécnica®, Piracicaba/ SP, Brasil), para avaliação de forma

subjetiva em microscopia de campo claro com aumento de 400 X (microscópio óptico Eclipse 50i, Nikon®, Tochigi, Japão). A concentração espermática foi determinada na câmara de Neubauer, após a diluição da amostra (proporção 1:10) em formol salino tamponado a 37° C.

A morfologia espermática foi avaliada pela técnica de preparação úmida, após a diluição da amostra em formol salino (proporção 1:10). Foram avaliadas 200 células por lâmina em microscopia de contraste de fase em 1000 X (Eclipse 80i, Nikon®, Tochigi, Japão). A classificação foi baseada no Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998).

Para a avaliação IMP foi utilizada a coloração de eosina-nigrosina e para avaliação da IMA foi utilizada a coloração descrita por Pope et al. (1999) (kit de coloração Spermac®, Stain Enterprises, África do Sul), ambas validadas para uso em sêmen de primatas (Valle et al., 2008). Às alíquotas de 5 µL da amostra de sêmen foram adicionados 5 µL de eosina (1%) e 5 µL de nigrosina (1%) após intervalo de 30 seg. Duzentas células foram lidas em microscopia de campo claro no aumento de 400 X. Os espermatozóides não corados foram considerados com membrana plasmática íntegra e os espermatozóides com coloração rósea, considerados com membrana não íntegra. Para a avaliação de IMA, utilizou-se 5 µL da amostra e 5 µL do corante, seguiu-se a incubação por 90 seg a 37° C em microtubo âmbar. As lâminas contendo o esfregaço foram avaliadas em microscopia de campo claro com aumento de 100 X (microscópio óptico Eclipse 50i, Tochigi, Nikon®). Espermatozóides com o acrossoma íntegro apresentaram o acrossoma com coloração mais escura e espermatozóides com o acrossoma não íntegro não tiveram a coloração diferenciada nessa região.

A atividade mitocondrial foi determinada pelo método de coloração descrito por Hrudka (1987). Uma alíquota de 10 µL da amostra de sêmen foi adicionada a 10 µL da solução de 3,3' de diaminobenzidina (DAB) a 37° C (1mg de DAB: 1 mL de PBS) e depositada em microtubo de polipropileno âmbar. Após a incubação em banho-maria por 1h30min, foi realizado esfregaço da mistura. Em seguida, a lâmina foi seca em temperatura ambiente na ausência de luz e depois fixada em formaldeído (10%) por 10 min e seca nas mesmas condições. A leitura foi feita em microscopia de luz direta, aumento de 100 X (Microscópio óptico Eclipse 50i Nikon®, Tochigi, Japão) e classificada de I a IV. Classe I: maioria das mitocôndrias ativas (coloração castanha), conferindo à bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente; classe II: a bainha mitocondrial fragmentada, com segmentos ativos (corados) e inativos (não corados), com predominância de segmentos corados; classe III: apresentam

menos da metade da bainha mitocondrial ativa e corada com poucos segmentos corados e dispersos; classe IV: apresentam bainha mitocondrial completamente inativa, não corada.

5.2.4.5. Análise estatística

Foi realizada a consistência e a estatística descritiva das características do sêmen por meio da média e erro padrão, utilizando os procedimentos (PROC MEANS, PROC FREQ, PROC UNIVARIANTE, SAS 2002, versão 8.0). Foi realizada a análise de variância para as características pH, volume, motilidade, MPL, concentração, IMP, IMA, AM, para verificar o efeito da idade do animal. Duas categorias de faixa etária foram consideradas, (idade I, animais de 7 anos, n = 3) e (Idade II, animais de 11 e 13 anos, n = 4), utilizou-se o teste t de Student com nível de significância de 5% para comparação das médias. Para a característica grau de motilidade, utilizou-se o teste qui-quadrado (SAS, 2002, versão 8.0). Foi calculada a correlação de Pearson pelo PROC CORR (SAS, 2002, versão 8.0) para as características avaliadas.

5.2.5. RESULTADOS

Durante o estudo foram realizadas 293 estimulações e obtidos 56 ejaculados de sete animais. A taxa de sucesso calculada sobre o número de estimulações foi de 19,11%. Quando calculada sobre o número de animais, alcançou 58,3%. No presente estudo, considerando-se apenas os animais que deram amostras, foram 174 estimulações e 56 ejaculados (taxa de sucesso de 32%). O tubo de colheita sofreu adaptações ao longo do estudo, no intuito de aumentar a estimulação pelo maior contato com a superfície do pênis, conforme descrito em material e métodos. A partir do uso do tubo com fundo cônico, em que o contato da glândula com o tubo foi mais intenso, a taxa de sucesso apresentou maior percentual, quando comparada aos tubos utilizados anteriormente, saindo de 33,3 para 58,3%. A maior parte dos ejaculados foi obtida entre 30 e 300 seg de estimulação, na combinação 75 Hz de frequência e 1 mm de amplitude. A evolução da taxa de sucesso de obtenção de ejaculados sobre o número de animais estimulados ao longo dos meses está apresentada na figura 1.

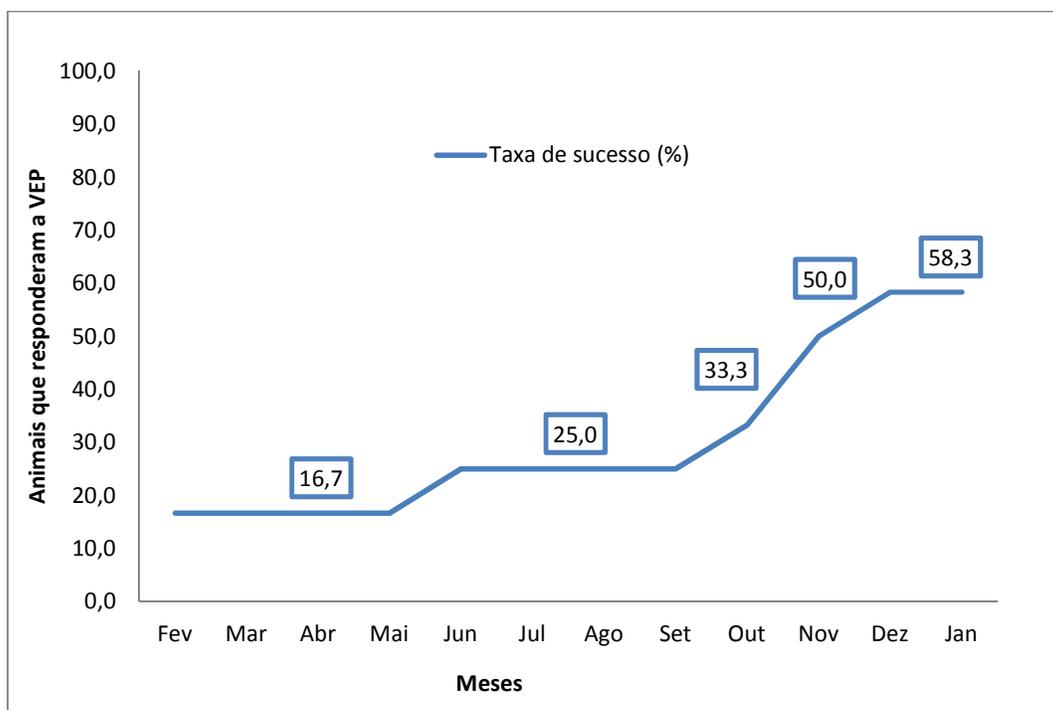


Fig 1. Evolução da taxa de sucesso (animais estimulados x animais que responderam ao procedimento de colheita) de obtenção de ejaculados de *S. sciureus* ao longo de 12 meses de estudo. VEP: vibroestimulação peniana.

Não houve amostra azoospérmica ao longo dos estudos. Duas características do sêmen apresentaram variação significativa ao longo dos meses, o volume que foi maior em julho e a IMP que foi menor em fevereiro ($p < 0,05$). Todas as outras características avaliadas não se alteraram ao longo dos meses ($p < 0,05$). A maior parte dos ejaculados coagulou por completo; como neste estudo não foi utilizado nenhum procedimento para dissolução desse coágulo, as análises foram realizadas na fração que se despreendeu do coágulo no meio diluidor. As características do sêmen dos animais estudados estão apresentadas na tabela 1

As características morfológicas avaliadas estão apresentadas na tabela 2. A média total de espermatozoides anormais foi 43,6.

Tabela 1- Características dos ejaculados de *S. sciureus* obtidos em 12 meses de estudo. Dados apresentados pela média e erro padrão da média.

Características	n	Variação	Média ± EPM
pH	36	6,4 - 7,6	6,8 ± 0,05
Vol (µL)	46	50,0 - 1600,0	478,8 ± 53,8
Conc (sptz x10 ⁶ /mL)	45	4,4 - 138,3	39,5 ± 4,9
Mot (%)	47	40,0 - 100,0	86,3 ± 1,7
MPL (%)	45	30,0 - 100,0	77,3 ± 2,0
IMP (%)	45	33,0 - 98,0	82,3 ± 1,9
IMA (%)	45	86,0 - 100,0	97,8 ± 0,4
AM I (%)	40	43,0 - 98,0	68,8 ± 2,4
AM II (%)	40	2,0 - 54,0	28,5 ± 2,2
AM III (%)	40	0,0 - 15,0	2,3 ± 0,5
AM IV (%)	40	0,0 - 20,0	0,8 ± 0,5

pH: potencial de hidrogênio; Vol: volume; Mot: motilidade; MPL: movimento progressivo linear; Conc: concentração; sptz: espermatozoides; IMP: integridade de membrana plasmática; IMA: integridade de membrana acrossomal; AM: atividade mitocondrial; EPM: erro padrão da média; n: número de amostras.

A correlação entre as características espermáticas e a idade dos animais está apresentada na tabela 3.

Tabela 2. Morfologia espermática de *S. sciureus* em amostras de sêmen obtidas ao longo de 12 meses de estudo. Dados apresentados pela Média \pm erro padrão da média de defeitos maiores (n = 41) e defeitos menores (n = 41).

Defeitos maiores	Média \pm EPM (%)	Defeitos menores	Média \pm EPM (%)
CabSub	0,07 \pm 0,04	CED	14,2 \pm 2,8
Fterato	0,0 \pm 0,0	CabIsol	2,4 \pm 0,6
Estrbase	0,1 \pm 0,04	CabPI	0,02 \pm 0,02
GrânAcr	0,02 \pm 0,02	GCD	2,6 \pm 1,0
CFDE	3,1 \pm 0,9	CReAO	0,1 \pm 0,05
CDG	0,1 \pm 0,06	CabDelg	0,1 \pm 0,1
CEC	0,2 \pm 0,2		
GCP	12,2 \pm 3,2		
PIQc/PG	2,1 \pm 0,6		
PseudoG	6,4 \pm 1,2		
Total	24,3 \pm 4,1		19,3 \pm 3,0

n = número de amostras; CabSub: cabeça subdesenvolvida; Fterato: formas teratológicas; Estrbase: estreitamento na base; GrânAcr: grânulo no acrossomo; CFDE: cauda fortemente dobrada ou enrolada; CDG: cauda dobrada com gota; CEC: cauda enrolada na cabeça; GCP: gota citoplasmática proximal; PIQc/PG: peça intermediária quebrada com pseudogota; PseudoG: pseudogota; CED: cauda enrolada ou dobrada; CabIsol: cabeça isolada; CabPI: Cabeça com peça intermediária; GCD: gota citoplasmática distal; CReAO: cauda retro, abaxial ou oblíquo; CabDelg: cabeça delgada.

Tabela 3. Correlação simples entre as características espermáticas e a idade dos animais *S. sciureus* obtidos ao longo de 12 meses.

	Vol.	Mot.	Conc.	MPL	IMP	IMA	AMI	Df. menor	Df. Maior
Idade	- 0,49**	0,02 ^{ns}	0,32*	- 0,05 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,19 ^{ns}	- 0,09 ^{ns}	- 0,23 ^{ns}	0,35*

** p < 0,001; *p < 0,05; ^{ns} p > 0,05

5.2.6. DISCUSSÃO

O sucesso na obtenção de ejaculados por VEP pode estar relacionado a diversos fatores, tais como: diâmetro do tubo utilizado na estimulação (Yeoman, et al., 1997; 1998), intensidade do estímulo, sensibilidade da espécie (Schneiders et al., 2004), experiência do manipulador do aparelho de VEP (Sonksen e Ohl, 2002) e sazonalidade reprodutiva da espécie.

Na espécie *C. jacchus*, a taxa de sucesso calculada sobre o número de animais que ejacularam foi de 92,3% (12 em 13) e sobre o número de ejaculados foi de 89,2% (99 ejaculados de 111 estimulações) (Schneiders et al., 2004). Nos estudos com *S. boliviensis*, foi utilizado tubo cônico no aparelho de vibroestimulação e as taxas de sucesso foram maiores, 90% (nove em 10 animais) (Yeoman et al., 1997) e 80% (oito em 10 animais) (Yeoman et al., 1998). No presente estudo, a adoção do tubo cônico deu-se a partir do nono mês de estudo e pode ter sido um fator importante para a elevação da taxa de sucesso nos últimos meses de estudo.

Em estudos com *S. sciureus* (Laverde-Correa et al., 2001), a taxa de sucesso foi de 63% (sete em 11 animais) e 31% (19 ejaculados de 61 estimulações), com 84 % de ejaculados obtidos na combinação 70 Hz com 1 mm, num intervalo de tempo 20 a 176 seg de estimulação. Kuederling et al. (2000), ao utilizar pela primeira vez a técnica de VEP em *C. jacchus*, obteve taxa de sucesso de 35,2% (31 ejaculados de 88 estimulações) e 90% (nove em 10 animais). Naquele estudo, a maior parte dos ejaculados (87,1%) ocorreu no intervalo de tempo menor (20 a 120 seg de estimulação), na combinação de frequência e amplitude (80 a 85 Hz com 1 a 1,5 mm, respectivamente). A frequência e amplitude da maior parte dos ejaculados obtidos nos estudos de Laverde-Correa et al. (2001) foram próximas aos estímulos em que a maior parte dos ejaculados obtidos no presente estudo; em ambos, trabalhou-se com *S. sciureus*. Já Kuederling et al. (2000) trabalhou com *C. jacchus*, numa frequência de estimulação maior. A diferença entre as taxas de sucesso nos estudos parece estar relacionada

às espécies; *C. jacchus* pode ser mais sensível ao procedimento de VEP do que o *S. sciureus*, como foi demonstrado por elevadas taxas de sucesso em estudos prévios com essa espécie (Schneiders et al., 2004; Kuederling et al., 2000).

A obtenção da primeira amostra pode ser um fator a ser considerado para a elevação da taxa de sucesso sobre o número de ejaculados. *S. sciureus*, nos estudos de Kugelmeier (2011), ao ejacular pela primeira vez, responderam regularmente aos novos estímulos. Isso não foi observado no presente estudo, não houve animal que respondeu a todos os estímulos após a primeira ejaculação, embora tenha havido elevação da taxa de sucesso, quando se considerou apenas os animais que deram amostras. Ao contrário, com *C. jacchus*, a habituação ao procedimento não influenciou na taxa de sucesso (Kuederling et al., 2000). Nos estudos de Yeoman et al. (1997; 1998) em que taxa de sucesso foi superior ao presente estudo, a colheita de sêmen por VEP foi realizada exclusivamente durante a estação de acasalamentos dos animais mantidos no Alabama/EUA. Na avaliação das características do sêmen mês a mês, não houve relação entre estas e a estação de acasalamentos da colônia de micos-de-cheiro de origem dos animais deste estudo. A estação de cópulas da colônia de origem dos animais desse estudo ocorre de maio a outubro, as amostras foram obtidas ao longo do ano e a sazonalidade não influenciou, pois a taxa de sucesso aumentou de forma gradativa ao longo dos meses, atingindo o maior valor fora da estação de acasalamentos. Resultado semelhante foi descrito por Chen et al. (1981), que também não observaram influência da estação de acasalamentos sobre a obtenção de ejaculados de *S. sciureus* por EEJ.

Especificamente em *S. sciureus*, as condições de manutenção dos animais em total isolamento de qualquer contato com fêmeas, podem ter sido o fator de maior relevância para a menor taxa de sucesso em relação aos outros estudos (Yeoman et al., 1997; 1998; Laverde-Correa et al., 2001). O contato físico, visual ou olfatório com fêmeas descritos moduladores da variação circunual morfofisiológica de algumas características reprodutivas em *S. sciureus* (Mendoza et al., 1978; Schilm et al., 1999). Numa comparação entre grupos isossexuais de machos e de fêmeas mantidos com contato visual, auditivo e olfativo com grupos sociais do sexo oposto, o ganho de massa corporal e variação de testosterona ocorreram de forma dessincronizada em relação ao grupo social, somente nos machos. Nas fêmeas, tanto a variação hormonal como o aumento de massa corporal ocorreram sincronizados com o grupo social. A semelhança temporal nos eventos morfofisiológicos sofridos pelas fêmeas em relação aos grupos sociais foi interpretada pela maior sensibilidade das fêmeas aos fatores externos em relação aos machos e estes seriam influenciados por esses fatores, quando em

contato com elas (Schilm et al.,1999). Nos estudos de Yeoman et al. (1997; 1998), assim como nos estudos de Laverde-Correa et al. (2001), a colheita de sêmen foi realizada em animais mantidos em grupos reprodutivos.

A média do volume do ejaculado foi de $478,8 \pm 53,8 \mu\text{L}$. Nos estudos de Laverde-Correa et al. (2001) com *S. sciureus*, houve variação de 10 a 283 μL (média de $106,8 \pm 80,3 \mu\text{L}$). Em *S. boliviensis*, as médias foram $436 \pm 90 \mu\text{L}$ e $205 \pm 25 \mu\text{L}$ para o sêmen colhido por VEP e EEJ, respectivamente (Yeoman et al., 1998). Estudos anteriores confirmam que essa característica apresenta elevada variação inter e intraindividual em diferentes espécies de primatas (Puri e Gopalkrishnan, 2000; Kuederling et al., 2000), e até mesmo entre os procedimentos de colheita (Yeoman et al., 1997). Essa elevada variação foi observada no presente estudo, tab 1, e pode ter sofrido influência do número de animais que ejaculavam no período (n=3). Puri e Gopalkrishnan (2000) encontraram variação no volume de ejaculado em primatas da espécie *Macaca radiata*, num estudo ao longo de 12 meses, sem relação com a estação de acasalamentos. Ao contrário, Chen et al. (1981) observaram que o volume dos ejaculados foi maior na estação de acasalamento.

O valor observado para IMP ($54,0 \pm 12,4 \%$) em fevereiro também pode ter sofrido influência individual, pois nesse período foram obtidos ejaculados de poucos animais (meses em que a taxa de sucesso foi menor, 16,7%), fig 1.

No presente estudo, a ausência de amostra azoospermica ao longo do ano contradiz estudos prévios em que biópsias de tecido germinativo evidenciaram uma espermatogênese ativa dentro e inativa fora da estação de acasalamentos em *S. sciureus* (Dumond; Hutchinson, 1967; Pasqualini et al., 1986).

A coagulação de algumas amostras por completo, imediatamente após a ejaculação, está de acordo com outros estudos em primatas de diversas espécies (Bennett, 1967; Puri e Gopalkrishnan, 2000; Valle et al., 2004; Schneiders et al., 2004; Oliveira, et al., 2011).

As amostras no presente estudo apresentaram pH variando de levemente ácido a levemente alcalino (6,4 a 7,6), diferentemente dos estudos de Laverde-Correa et al. (2001), onde as amostras apresentaram pH alcalino (8 a 8,5). A causa desta variação do pH não é conhecida, contudo Muehleis e Long (1976) relataram que a variação do pH entre 6,7 a 9,8 não causa efeito negativo na motilidade espermática.

A concentração espermática apresentou o valor médio de $39,5 \pm 4,9 \times 10^6$ spz/mL, inferior ao descrito por Yeoman et al., (1998) ($77,1 \pm 20,4 \times 10^6$ spz/mL), em *S. boliviensis* e por Laverde-Correa et al., (2001) ($362 \pm 344 \times 10^6$ spz/mL), em *S. sciureus*. Nos dois últimos

estudos, tratamentos prévios à avaliação podem ter influenciado nos valores para o aumento da concentração. Yeoman et al., (1998) mantiveram a amostra diluída em meio aquecido (Biggers, Whitten and Whittingham, Irvine Scientific, Santa Anna, CA, USA) e esta permaneceu em estufa de CO₂ por 30 min. No estudo de Laverde-Correa et al. (2001), houve diluição da amostra em meio com amilase pancreática (Sigma[®]), seguida de incubação por 30 min. Adicionalmente, essa característica, assim como o volume do ejaculado, é altamente variável, tanto inter como intraindividual, como foi observado por Puri e Gopalkrishnan (2000) em *Macaca radiata* e Kuederling et al., (2000) em *C. jacchus*.

O volume do ejaculado e concentração espermática foram diferentes entre as idades I e II ($p < 0,05$). Na idade I, o volume do ejaculado foi maior ($648,8 \pm 82,5 \mu\text{L}$, média \pm EPM) e, na idade II, a concentração foi maior ($27,4 \pm 5,6 \text{ sptz} \times 10^6/\text{mL}$ média \pm EPM). O volume e a concentração apresentaram correlações negativa e positiva, respectivamente, com a idade (tab 3). Isso pode ser explicado pela relação entre essas duas características. Nos animais mais jovens, pode haver uma atividade exócrina mais elevada o que pode explicar o maior volume do ejaculado e seu efeito na diluição do sêmen e sobre a concentração espermática final, assim como pode acontecer em algumas espécies na estação de acasalamentos (Paris et al., 2005).

O valor médio de motilidade foi semelhante ao descrito em colheitas por VEP em *S. boliviensis* ($79,8 \pm 5,7 \%$, Yeoman et al., 1997), ($80,6 \pm 4,3 \%$, Yeoman et al., 1998) e superior aos descritos em colheitas por EEJ, em *S. sciureus* ($65,85 \pm 15,35 \%$, Dennis, et al., 1976) e *Cebus apella* ($68,4\%$, Barnabe et al., 2002). O grau de motilidade foi superior ao descrito em *S. sciureus*, sêmen colhido por EEJ ($4,7 \pm 0,5 \%$, Dennis, et al., 1976). Os maiores valores obtidos para as duas características parecem estar relacionados às colheitas por VEP que proporcionam ejaculados com melhor qualidade (Yeoman, et al., 1998; Schneiders et al., 2004).

Nas avaliações de grau de motilidade, houve maior proporção de espermatozoides com graus 4 e 3 ($50,0$ e $31,2 \%$, respectivamente). Não houve amostras com grau de motilidade 5 ou 0. Laverde-Correa et al. (2001) colheram sêmen também por VEP e obtiveram espermatozoides com $39 \pm 26 \%$ de movimentos rápidos, $16 \pm 11 \%$ lentos, $14 \pm 15 \%$ com motilidade não progressiva e $30 \pm 22\%$ foram imóveis. Essa característica foi correlacionada à motilidade ($r = 0,45$, $p = 0,001$) e também pode ter sido influenciada pela colheita por VEP.

A IMP foi superior às amostras colhidas por VEP em *S. sciureus* ($74,66 \pm 17,54$) (Laverde-Corrêa et al., 2001) e *C. jacchus* ($74,6 \pm 3,3$) (Kuederling, et al., 2000) e inferior às

amostras colhidas por EEJ *S. sciureus* (93,1%) (Bennet,1967). Neste último, o maior valor de IMP pode estar relacionado ao baixo número de animais no experimento ($n = 3$) e uma maior uniformidade nas amostras. Adicionalmente, não há informação se o sêmen foi colhido dentro ou fora da estação de acasalamentos. No presente estudo, o sêmen foi colhido o ano todo, o número de animais foi maior, com maior variabilidade de ejaculados.

A IMA aproximou-se dos valores encontrados em *S. sciureus* ($98,00 \pm 0,69 \%$) Kugelmeier (2011) e *C. jacchus* ($87,12 \pm 7,75 \%$) (Valle et al., 2008), utilizando a mesma coloração. O único trabalho encontrado de avaliação de acrossoma em *S. sciureus* foi descrito por Kugelmeier (2011). Segundo a autora, os espermatozoides dessa espécie possivelmente apresentam elevada resistência na membrana acrossomal, o que pode justificar a média elevada de IMA nas amostras avaliadas. Espermatozoides de *Macaca radiata*, analisados por coloração com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA, Calbiochem, USA), também apresentaram valores elevados de IMA ($91,4 \pm 2,3$), (Puri e Gopalkrishnan, 2000).

A maior parte dos espermatozoides apresentou características morfológicas normais. As anormalidades dos espermatozoides observadas no presente estudo está dentro do descrito para *S. sciureus* por Laverde-corrêa et al.,(2001). A cauda enrolada ou dobrada predominou dentre os defeitos menores, assim como nos achados de Kugelmeier (2011). A autora atribui esses defeitos ao possível choque térmico, sofrido pelas células durante a diluição das amostras; o mesmo pode ter acontecido no presente estudo. Laverde-corrêa, et al. (2001) também acharam maior quantidade de defeitos de cauda ($16 \pm 16\%$). Dentre os defeitos maiores, predominou a gota citoplasmática proximal. Essa patologia está comumente associada à maturação da célula no epidídimo e uma possível relação com amostras obtidas no início da estação de monta. No entanto, em avaliação mês a mês, não foi possível concluir qualquer associação dessas ou de outras características morfológicas à estação de acasalamentos dos animais de origem desse grupo em estudo. Em *M. radiata*, as anormalidades morfológicas apresentaram-se ao longo dos meses sem associação com estação de acasalamentos (Gopalkrishnan e Puri, 2000).

Na comparação entre idades, a característica pseudogota teve maior prevalência na idade II. Esse deve ter sido um fator relevante para a correlação da idade aos defeitos maiores, tabela 3.

5.2.7. CONCLUSÃO

É possível obter ejaculados de micos-de-cheiro durante todo o ano por vibroestimulação peniana (VEP) em animais mantidos sob condições de temperatura e umidade controladas.

Animais mantidos em cativeiro sob condições ambientais controladas por doze meses mantiveram as características do sêmen sem variação na qualidade.

Houve correlação negativa entre a idade e volume do ejaculado e correlação positiva entre a idade, concentração espermática e defeitos maiores.

5.2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, M.C.R.; Ribeiro, C. T. Silva, V.F.; Molinaro, E.M.; Gonçalves, M.Â.B.; Marques, M. A. P.; Cabello, P. H.; Leite, J. P. G., 2004. Biologic data of *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis* and *Saimiri sciureus* used for research at the Fiocruz Primate Center. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p.581-589.
- Barnabe, R. C.; Guimarães, M. A. B. V.; Oliveira, C. A.; Barnabe, A. H., 2002. Analysis of some normal parameters of the spermogram of captive capuchin monkeys (*Cebus apella*, Linnaeus, 1758). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 39, p. 331-333.
- Bennett, J. P., 1967. Semen collection in the squirrel monkey. **J. Reprod. Fertil.**, v. 13, p. 353-355.
- Chen, J. J.; Smith, E. R.; Gray, G. D.; Davidson, J. M., 1981. Seasonal changes in plasma testosterone and ejaculatory capacity in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Primates**, v. 22, p.253-260.
- Colégio Brasileiro De Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª Ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p
- Denis, L. T.; Poindexter, A. N.; Ritter, M. B.; Seager, S. W. J.; Detter, R. L., 1976. Freeze preservation of squirrel monkey sperm for use in timed fertilization studies. **Fertil. Steril.**, v. 27, p. 723-726.
- Domingues, S. F. S.; Lima, K. G.; Oliveira, R. R.; Santos, R.R., 2011. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação *in situ* de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. **Biotechnology of reproduction as a complementary strategy for in situ conservation of endangered neotropical primates: perspectives and challenges. Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, p.124-129.
- Dukelow, W. R. **Reproductive cyclicity and breeding in the Squirrel Monkey. In:** Rosenblum, L. A.; Coe, C. L. Handbook of squirrel monkey research. New York: Plenum Press, 1985, p. 169-190.c
- Dumond, F. V. and Hutchinson, T. C., 1967. Squirrel monkey reproduction: the “fatted” male phenomenon and seasonal spermatogenesis. **Science**, v.158, p.1067-1070.
- Gopalkrishnan, S. ,D., K., K. and Puri, C., P., 2000. Variations in seminal parameters over a 12-month period in captive Bonnet Monkeys. **Primates.**, v. 41, p. 393-405.
- Hrudka, F., 1987. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International J. Androl.**, v. 10, p.809-828.
- Kuederling, I.; Schneiders, A.; Sonksen, J.; Nayudu, P. L.; Hodges, J. K., 2000. Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. **Am. J. Primatol.** v. 52. p.149–154.

- Kugelmeier, T. **Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) porvibroestimulação: do condicionamento ao coágulo seminal.** (Tese de Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011, 110 f.
- Laverde-Corrêa, H. J.; Medina-Robles, V. M.; Cruz-Casallas, P. E. **Contribucion al conocimiento de las características seminales del mono ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio, obtenido por el metodo de estimulacion vibratoria del pene.** Universidade de los Lianos-Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia Villaavivencio-Colômbia, 2001.
- Mendoza, S. P.; Lowe, E. L.; Davidson, J. M.; Levine, S., 1978. Annual cyclicity in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): The relationship between testosterone, fattening and sexual behavior. **Horm. Behav.**, v. 11, p. 295-303.
- Mendoza, S.P., 1999. Squirrel monkey In. POOLE, T. (Eds.) The ufaw handbook on the care and management of laboratory animals. 7th Ed. Terrestrial vertebrates. Oxford Black. **Sci.**, 1: 591-600.
- Muehleis, P.M.; Long, S.Y. The effects of altering the pH of seminal fluid on the sex ratio of rabbit offspring. **Fertil. Steril**, v. 27, p. 1438-1445, 1976.
- National Research Council (NRC). Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D. C.: National Academy Press, p.246, 2011.
- National Research Council (NRC). Nutrient requirements of nonhuman primates. 2rd ed. Washington: The National Academy Press, 2003, p.308.
- Oliveira, K.G.; Miranda, S. A.; Brito, A. B.; Santos, R. R.; Domingues, S. F. S., 2011. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Anim reprod Sci.** v. 123, p. 75-85.
- Pasqualini, T.; Colillas, O.; Rivarola, M. A., 1986. Testicular and serum testosterone variations in *Squirrel monkey* during cyclity. **J. Androl.**, v.7, p.298-302.
- Paris, D.B.P.; Taggart, D.A.; Shaw, G.; Temple-Smith, P.D.; Renfree, M.B. 2005. Changes in sêmen quality and morphology of the reproductive tract of the male tammar wallaby parallel seasonal breeding activity in the female. **Reproduction**, v.130, p.367-378
- Pissinatti, A.; Andrade, M. C.R. Histórico In Andrade, A.; Andrade, M. C. R.; Marinho, A. M.; Filho, J. F., **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2010. cap.1, p.21-39.
- Pope, C. E.; Zang, Y. Z.; Dresser, B. L., 1991. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **J. Zoo Wildlife Med**, v. 22, p.87-95.
- SAS - *Statistic Analysis System. Version 8.0.* Cary, NC, USA, 2002.
- Schimpl, P. A.; Mendonza, S.P.; Saltman, W.; Lyons, D.M.; Mason, W.A., 1999. Annual physiological changes in individually housed squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Am. J. Primatol.**, v. 47, p. 93-103.
- Schneiders, A.; Sonksen, J.; Hodges, J.K., 2004. Penile vibratory stimulation: a practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality. **J. Med. Primatol.**, v. 33. p.98-104.
- Sonksen, J.; Ohl, D. A., 2002. Penile vibratory stimulation and electroejaculation in the treatment of ejaculatory dysfunction. **Int J Androl**, v. 25, p. 324-332.
- Stone, A. I., 2007. Responses of squirrel monkeys to seasonal changes in food availability in an Eastern Amazonian rainforest. **Am. J. Primatol.**, v. 69, p.142-157.
- Valle, R. R., Guimarães, M. A.; Muniz, J. A.; Barnabe, R.C.; Vale, W. G., 2004. Collection and evaluation of semen from captive howler monkeys (*Alouatta caraya*). **Theriogenology.** v. 62, p.131-138.
- Valle, R. R.; Valle, C. M. R.; Nichi, M.; Muniz, J. A. P. C.; Nayudu, P. L.; Guimarães, M. A. B. V., 2008. V. Validation of non-fluorescent methods to reliably detect acrosomal and plasma

- membrane integrity of common marmoset (*Callithrix jacchus*) sperm. **Theriogenology**, v.70, p.115-120.
- Yeoman, R. R.; Ricker, R. B.; Williams, L. E.; Sonksen, J.; Abee, C. R., 1997. Vibratory stimulation of ejaculatory yields increased motile spermatozoa, compared with electroejaculation, in squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.**, v. 36, p.62-64.
- Yeoman, R. R.; Sonksen, J.; Gibson, S. V.; Risk, B. M.; Abee, C. R., Penile vibratory stimulation yields increased spermatozoa and accessory gland production compared with rectal electroejaculation in a neurologically intact primate (*Saimiri boliviensis*). **Hum. Reprod**, v.13. p.2527-2531, 1998.
- Zimble-Delorenzo, H. S. and Stone, A., 2011. Integration of field and captive studies for understanding the behavioral ecology of the squirrel monkey (*Saimiri sp.*). **Am. J. Primatol.**, v.73, p. 607-622.

6. CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que é possível colher sêmen de *S. sciureus* durante todo o ano por VEP em animais mantidos em condições ambientais controladas.

As características do sêmen foram compatíveis com o descrito para a espécie.

Não foi possível identificar, nas condições do estudo, um perfil de variação entre massa corporal, volume testicular e testosterona no extrato fecal de forma sincronizada com os meses correspondentes à estação de acasalamento dos grupos sociais de origem dos animais estudados.

Este estudo pode contribuir como base para a manutenção de micos-de-cheiro em cativeiro sob condições ambientais controladas, para a colheita de sêmen com potencial para aplicação em biotécnicas reprodutivas nas criações, para fins de pesquisa biomédica ou de conservação.

7. APÊNDICE A

Composição de nutricional calculada da ração experimental

Nutrientes	(%)
Proteína bruta	24,00
Matéria seca	89,86
Fibra bruta	3,83
Extrato etéreo	10,00
Ácido aracdônico	0,04
Ácido linoleico	2,50
Ácido α linolênico	0,25
Matéria mineral	4,72
Cálcio	1,20
Fósforo total	0,80
Magnésio	0,11
Potássio	0,55
Sódio	0,38
Arginina total	1,42
Isoleucina	0,91
Leucina	1,79
Lisina total	1,13
Metionina + cistina total	0,75
Treonina total	0,90
Triptofano total	0,22
Valina	1,15
Fenilalanina + tirosina	1,52
Colina (mg/Kg)	1.200,00

Composição/Kg de produto adicionado por premix vitamínico-mineral: ferro, 120 mg; cobre, 20mg; manganês, 70 mg; zinco, 180 mg; iodo, 1,1mg; selênio, 0,4mg; vit.A., 20000 UI; vit.D3, 4500 UI; Vit.E, 100mg; Vit.K, 3 mg; tiamina, 14mg; riboflavina, 10mg; niacina, 80mg; ácido pantotênico, 50mg; piridoxina, 12mg; biotina, 0,32mg ; ácido fólico, 9mg; cianocobalamina, 0,055 mg; vit.C, 800 mg; colina, 1600 mg.

8. APÊNDICE B

Composição do meio diluidor de sêmen TALP-HEPES	
Componentes	Concentração g/ 250 mL
NaCl	1,855
Kcl	0,059
NAHCO ₃	0,042
NH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,0105
Na Lactate	465ul
MgCl ₂ x6H ₂ O	0,025
Glucose	0,22525
Hepes (Na-Salt)	0,3255
Hepes (acid)	0,298
Phenolrot	0,0025
Bi-dest H ₂ O	/ 250 mL

pH (no momento) 7,33

Preparo para a colheita:

TALP HEPES s/ Ca 5 mL

BSA Fraction V 15 mg (0.3 %)

Piruvato sodico 0,25 mM*

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

a) Colocar TALP em tubo Falcon esteril.

b) Adicionar BSA Fraction V, nao mexer, deixar diluir em repouso a 37o C.

d) Retirar 50 µL do TALP com BSA e adicionar 50 µL de Piruvato Stock.

e) Medir o pH=7,33 !!!

f) Filtrar em filtro esteril de 0,2 µm.

g) Manter em aquecimento.

** Apos preparado, duracao de 1 dia a 4°C.

Fonte: Valle, 2007.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M.C.R.; RIBEIRO, C. T. SILVA, V.F.; MOLINARO, E.M.; GONÇALVES, M.Â.B.; MARQUES, M. A. P.; CABELLO, P. H.; LEITE, J. P. G. **Biologic data of *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis* and *Saimiri sciureus* used for research at the Fiocruz Primate Center.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99 (6), p. 581-589, 2004.

ASA, C.S. Reproductive physiology. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKIN, S. **Wild animals in captivity: principles and techniques.** Chicago: University of Chicago Press, 1996, p. 390-417.

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

BALDWIN, J. D. Reproductive synchronization in squirrel monkeys (*Saimiri*). **Primates**, v. 11, p.317-326, 1970.

BALDWIN, J. D; BALDWIN, J.I. Primates. The squirrel monkeys, genus *Saimiri*. In: Coimbra-Filho A. F.; Mittermeier, R. A. **Ecology and behavior Neotropical.** Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1981, p. 277-330.

BALDWIN, J. D The behavior of squirrel monkeys (*Saimiri*) in natural environments. In: Rosenblum, L. A.; Coe, C. L. **Handbook of Squirrel Monkey Research.** New York: Plenum, 1985, p. 35-53.

BARNABE, R. C.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; OLIVEIRA, C. A.; BARNABE, A. H., 2002. Analysis of some normal parameters of the spermogram of captive capuchin monkeys (*Cebus apella*, Linnaeus, 1758). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 39, p. 331-333.

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

BENNETT, J. P. Semen collection in the squirrel monkey. **J. Reprod. Fertil.**, v. 13, p. 353-355, 1967.

BOINSKI, S. Mating patterns in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Behav. Ecol. Sociobiol.** v. 21, p. 13-21, 1987.

BROWN, J. L. **Endocrine manual for hormonal assessment of wildlife species.** Conservation & Research Center National Zoological Park, Front Royal, VA, p. 65, 2008.

BROWN, J. L., WILDT, D. E., WIELEBNOVSKI, N., GOODROWE, K. L., GRAHAM, L. H., WELLS, S. & HOWARD, J. G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **J. Reprod. Fertil.**, 106, p. 337-346, 1996.

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

CHEN, J. J.; SMITH, E. R.; GRAY, G. D.; DAVIDSON, J. M. Seasonal changes in plasma testosterone and ejaculatory capacity in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Primates**. v. 22 (2) p. 253–260, 1981.

COE, C.L.; MENDONZA, S.P.; LEVINE, S. Social status constrains the stress response in the squirrel monkey. **Physiol. Behav.**, v. 23, p. 633-638, 1979.

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

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

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ª Ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p

COURA, J. R. Malária. In: _____ **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008. cap. 14, p. 47-53.

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

DOMINGUES, S. F. S.; LIMA, K. G.; OLIVEIRA, R. R.; SANTOS, R.R., 2011. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação *in situ* de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. Biotechnology of reproduction as a complementary strategy for in situ conservation of endangered neotropical primates: perspectives and challenges. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, p.124-129.

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

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

DUMOND, F. V. and HUTCHINSON, T. C. Squirrel monkey reproduction: the “*fatted*” male phenomenon and seasonal spermatogenesis. **Science**, v. 158, p. 1067-1070, 1967.

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

FORTMAN, J. D.; HEWETT, T. A.; BENNETT, B. T. The laboratory nonhuman primate. *In*: FOX, J.; COHEN, B. and LOEW F. (Eds.). **Library of congress cataloging-in-publication data**. Washington, D. C.: CRC Press, 2002.

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

GONÇALVES, M. A. B.; CASTRO, P. H. G.; BRAVIN, J. S.; FASANO, D. M.; ANDRADE, M. C. R. Dois modelos de enriquecimento ambiental para micos-de-cheiro.

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

GOPALKRISHNAN, S. ,D., K., K. AND PURI, C., P., 2000. Variations in seminal parameters over a 12-month period in captive Bonnet Monkeys. **Primates.**, v. 41, p. 393-405.

GRAHAM, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MOSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biol.**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

GROSS, K. L.; WESTBERRY, J. M.; HUBLER, T. R.; SADOSKY, P. W.; SINGH, R. J.; TAYLOR, R. L.; SCAMMELL, J. G. Androgen resistance in squirrel monkey (*Saimiri spp.*). **Comparative Med.**, v. 58, n°4, p.381-388, 2008.

In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZONIA E AMERICA LATINA, 8, 2008. Acre. **Anais...** Rio Branco: Universidade Federal do Acre, 2008. Cd-rom.

GROVES, C. P. Order Primates. In: D. E. WILSON, AND D. M. REEDER, (eds.) **Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference**. 3rd ed, Baltimore. Johns Hopkins University Press. 1. 2005, p.111–184.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. Manole. São Paulo, 2001, 582p.

HARRISON, R. M. AND KUBISCH, H.M. **Male reproduction and fertilization, definition of the primate model**: In Wolfe-Coote, S. (Ed). **The laboratory primate**, New York, Academic Press, 2005. Cap. 8, 119-132.

HILL, W. C. O. Genus *Saimiri* Voigt, 1831. In: _____. **Primates comparative anatomy and taxonomy, Cebidae, part A**. Edinburgh: R & R Clark, Ltda, v.4. p.251-319, 1960.

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

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

INTERNATIONAL PRIMATOLOGICAL SOCIETY (IPS). **International guidelines for the acquisition, care and breeding on nonhuman primates**. UK/USA. 2^a edição, p.76, 2007.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **Red list of threatened species**. Version 2009.2. Disponível em <www.iucnredlist.org> acesso em 02 de julho de 2010.

JANSON C.; BOINSKI. Morphological and behavioral adaptations for foraging in generalist primates: the case of the cebines. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. 88: 483-498. 1992.

KIRKWOOD, J. K. Patterns of growing in primates. **J. Zool.**, v. 205, p. 123-136, 1985

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 vibroestimulation. **Am. J. Primatol.**, v. 52, p.149–154, 2000.

KUGELMEIER, T. **Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) por vibroestimulação: do condicionamento ao coágulo seminal.** (Tese de Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011, 110 f.

KUGELMEIER, T.; VALLE, R. R.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; MUNIZ, J. A. P. C.; MONTEIRO, F. O. B.; OLIVEIRA, ALVARENGA, C. O. Tracking the Ovarian Cycle in Black-and-Gold Howlers (*Alouatta caraya*) by Measuring Fecal Steroids and Observing Vaginal Bleeding. **Int. J. Primatol. JCR**, v. 32, p. 605-615, 2011.

LASKA, M.; FREIST, P.; KRAUSE, S. Which senses play a role in nonhuman primate food selection? A comparison between squirrel monkeys and spider monkeys. **Am. J. Primatol.** v. 69. p.282-294, 2007.

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

LAVERDE-CORRÊA, H. J.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. **Contribucion al conocimiento de las características seminales del mono ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio, obtenido por el metodo de estimulacion vibratoria del pene.** Universidade de los Lianos-Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia Villaavivencio-Colômbia, 2001.

LEJEUNE, T. AND DELVAUX, P. **Human spermatozoa: maturation, capacitation and abnormalities.** New York: Nova science publishers Press, 2010. p.545.

LIMA, E. M.; FERRARI, S. F. Diet of a free-ranging groups squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Eastern Brazilian Amazonia. **Folia Primatol.**, v.74, p.150-158, 2003.

MALPAUX, B. Seasonal regulation of reproduction in Mammals. In NEILL, J. D. (Ed) **Physiology of reproduction.** p. 2231-2280, 2006.

MASTROIANNI, L.; MANSON, W. A. Collection of monkey semen by electroejaculation. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine.** v.12, p.1025-1027, 1963.

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

MENDOZA, S.P., Squirrel monkey In. POOLE, T. (Eds.) **The ufaw handbook on the care and management of laboratory animals**. 7th Ed. Terrestrial vertebrates. Oxford Black. Sci., 1: p. 591-600, 1999.

MOORMAN, E. A.; MENDONZA, S. P.; SHIDELER, S. E.; LASLEY, B. L. Excretion and measurement of estradiol and progesterone metabolites in the feces and urine of female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Am. J. Primatol.** v. 57. p.79–90, 2002.

MORRELL, J. M.; HODGES, J. K. Germplasm cryopreservation of nonhuman primates. In: WATSON, P. F.; Holt, V. V. V. (Eds), **Cryobanking the genetic resource: Wildlife conservation for the future?** London: Taylor and Francis, p. 408-426, 2001.

MOURA, A. M. A.; VIANA, C. F.; FASANO, D. M.; BRAVIN, J. S.; NASCIMENTO, L. W. F. Manutenção em cativeiro. In: ANDRADE, A.; ANDRADE, M.C.R.; MARINHO, A. M.; FILHO, J. F. (Orgs). **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2010, p.161-206.

MUEHLEIS, P.M.; LONG, S.Y. The effects of altering the pH of seminal fluid on the sex ratio of rabbit offspring. **Fertil. Steril.**, v. 27, p. 1438-1445, 1976.

NELSON, R. J.; BADURA, L. L. AND GOLDMAN, B. Mechanisms of seasonal cycles of behavior. **Annual. Rev. Psychol.** 41: p.81-108. 1990.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of domestical animal: nutrient requirements nonhuman primates**. Washington: The National Academy Press, 1978.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of nonhuman primates**. 2nd ed. Washington: The National Academy Press, 2003. 308p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Guide for the care and use of laboratory animals**. Washington: The National Academy Press, 2011. 246p.

OLIVEIRA, K.G.; MIRANDA, S. A.; BRITO, A. B.; SANTOS, R. R.; DOMINGUES, S. F. S., 2011. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin

monkey (*Cebus apella*) in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Anim. reprod. Sci.** v. 123, p. 75-85.

PARIS, D.B.P.;TAGGART, D.A.; SHAW,G.; TEMPLE-SMITH,P.D.;RENFREE, M.B. 2005. Changes in sêmen quality and morphology of the reproductive tract of the male tammar wallaby parallel seasonal breeding activity in the female. **Reproduction**, v.130, p.367-378

PASQUALINI, T.; COLILLAS, O.; RIVAROLA, M. A.; Testicular and serum testosterone variations in *Squirrel monkey* during cyclity. **J. Androl.**, v.7, p. 298-302, 1986.

PISSANATTI, A.; ANDRADE, M. C.R.. Histórico In ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C .R.; MARINHO, A. M. ; FILHO, J. F. (Orgs). **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2010. cap.1, p. 21-39.

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

REY, L. Controle da Malária. In: _____ **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2008. cap. 17, p. 249-264.

ROSENBLUM, L. A.; COE, C. L. (Eds). **Handbook of squirrel monkey research**. New York: Plenum Press, 1985, p. 501.

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

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER R. A. Part II: Taxonomy, distribution, evolution and historical biogeography of south american primates. The diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An annotated taxonomy. In GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; BICCA-MARQUE, J. C.; HEYMANN, E. W.; KAREN B (eds.). **South american primates: Comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation**. University of Chicago, Chicago: Illinois, 2009. cap. 2, p. 33-65.

RYLANDS, A. B.; SCHENEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A.; GROVES, C. P.; RODRIGUEZ-LUNA, E. An assessment of the diversity of New World primates. **Neo. Prim.** v. 8. p. 61-93, 2000.

SENGER, P.L. **Reproductive cyclicity – terminology and basic concepts. In: Pathways to pregnancy and parturition.** 2ed. Current conceptions p. 144-163, 2003.

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

SCHNEIDERS, A.; SONKSEN, J.; HODGES, J.K. Penile vibratory stimulation: a practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality. **J. Med. Primatol.** v.33. p.98-104, 2004.

SMITH, R. J.; JUNGERS, W. L. Body mass in comparative primatology. **J. Hum. Evol.**, v.32, p. 523-559, 1997.

STATISTIC ANALYSIS SYSTEM, (SAS) Version 8.0, Cary, NC, USA, 2002

STEINBERG, E. R.; PALERMO, A. M.; NIEVES, M.; BURNA, A.; SOLIS, G.; ZUNINO, G.; MUDRY, M. D. Sex determination and sperm morphology in cebidae. **Anais do XI Congresso brasileiro de primatologia.** Porto Alegre, 2005.

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

SCHIML, P. A.; MENDONZA, S.P.; SALTMAN, W.; LYONS, D.M.; MASON, W.A. Seasonality in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Physiol. Behav.**, v.60, p. 1105-1113, 1996.

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

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

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

THORINGTON JR., R. W. Observations of squirrel monkeys in a colombian forest. *In*: ROSENBLUM, L. A.; COOPER, R. W. **The squirrel monkey**. New York: Academic Press, p. 69-85, 1968.

TREVINO, H. S. Seasonality of reproduction in captive Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*). **Am. J. Primatol.**, v. 69: p. 1001-1012, 2007.

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

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

VALLE, R.R.; VALLE, C. M. R.; NICHI, M.; MUNIZ, J. A. P.; NAYUDU, P. L.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Validation of non-fluorescent methods to reliably detect sperm. **Theriogenology**, v. 70, p. 115-120, 2008.

VIANA, C. F., CYSNE, L. B.; GONÇALVES, M. A. B.; SOUZA, W. P.; SOUZA, A. A.; CABRAL, M. J. F.; MARINHO, A. M. Adequação de fórmula e grânulo de ração industrializada no manejo alimentar de Primatas Neotropicais (*Saimiri sp*). **XIII Congresso Brasileiro de Primatologia**. Blumenau, SC. 11 a 15 de dezembro de 2009.

WATTS, E. S. **Evolution of the human growth curve** In: FALKNER, F. AND TANNER, J. M. Eds, Human growth. A comprehensive treatise. 1986. 2nd Ed, vol. 1 p.153-166. New York, Plenum press.

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

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

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

WOLF D.P. The nonhuman primate oocyte and embryo as a molde for women, or is it vice versa? **Theriogenology**. v. 69, p. 31-36, 2008.

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

WOLF, R. C.; CONNOR, R. F. O.; ROBINSON, J. A. Cyclic changes in plasma progestins and estrogens in Squirrel Monkeys. **Biol. Reprod.**, v. 17, p. 228-231, 1977.

YEOMAN, R. R.; RICKER, R. B.; WILLIAMS, L. E.; SONKSEN, J.; ABEE, C. R. Vibratory stimulation of ejaculatory yields increased motile spermatozoa, compared with electroejaculation, in squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.**, v. 36, p.62-64, 1997.

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

ZIGLER, T. E.; WITTWER, J. D. Fecal steroid research in the field and laboratory: improved methods for storage, transport, processing, and analysis. **Am. J. Primatol.**, v. 67, p. 159-174, 2005.

ZIMBLER-DELORENZO, H. S.; STONE, A. Integration of field and captive studies for understanding the behavioral ecology of the squirrel monkey (*Saimri sp.*). **Am. J. Primatol.**, v. 73, p. 607-622. 2011.