



Contribuições da biotecnologia da reprodução sobre os desafios na manipulação do semên de primatas do gênero *Saimiri*

Reproductive biotechnology contributions on the challenges of semen manipulation in primates of the Saimiri genus

Wlaises Vasconcelos Sampaio^{1,2}, Danuza Leite Leão^{1,3}, Patrícia da Cunha Sousa^{1,4},
Sheyla Farhayldes Souza Domingues^{1,3,4,5}

¹Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia-BIOMEDAM, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus II Castanhal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, PA, Brasil.

²Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá-IDSM, Tefé, AM, Brasil.

³Programa de Pós Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém PA, Brasil.

⁴Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, PA, Brasil.

⁵Correspondência: shfarha@gmail.com

Resumo

Algumas espécies de primatas do gênero *Saimiri* estão classificadas como vulneráveis ou quase ameaçadas. Diante desta realidade, é necessária a aplicação de alternativas para a conservação *ex situ* (em cativeiro) desses primatas, sobretudo o desenvolvimento de biotécnicas voltadas para a reprodução. Desta forma, o presente trabalho objetivou compilar informações, em linhas gerais, a respeito dos desafios, avanços e perspectivas em relação às pesquisas desenvolvidas no tocante à biotecnologia da reprodução em machos do gênero *Saimiri*.

Palavras-chave: Primatas neotropicais, macacos-de-cheiro, espermatozoides, reprodução e andrologia.

Abstract

Some species of Saimiri primates are classified as vulnerable or near threatened with extinction. Facing this reality, it is necessary to apply alternatives for the ex situ conservation (in captivity) of these primates, especially the development of biotechniques of reproduction. In this way, the present study aimed to compile information, in general terms, regarding the challenges, advances and perspectives in relation to the researches developed regarding the biotechnology of reproduction in males of the genus Saimiri.

Keywords: Neotropical primates, squirrel monkey, sperm, reproduction and andrology.

Introdução

Os primatas do gênero *Saimiri* são popularmente conhecidos no Brasil como macacos-de-cheiro. Atualmente, a partir dos avanços da biologia molecular são conhecidos oito táxons na categoria de espécie: *Saimiri sciureus*, *S. collinsi*, *S. oerstedii*, *S. cassiquiarensis*, *S. macrodon*, *S. ustus*, *S. boliviensis* e *S. vanzolinii* (Alfaro et al., 2015).

Dentre estas, as espécies *S. oerstedii*, *S. vanzollini* (vulneráveis) e *S. ustus* (quase ameaçada) estão classificadas em algum grau de ameaça (IUCN, 2017). Ainda, apesar das demais espécies não estarem ameaçadas, fatores como a perda progressiva de habitat, caça e tráfico ilegal, favorecem a diminuição das populações de vida livre (Rylands et al., 2000). Diante desta realidade, faz-se prioritária a aplicação de alternativas para a conservação *ex situ* (em cativeiro) dessas espécies, sobretudo o desenvolvimento de biotécnicas voltadas para a reprodução (Domingues et al., 2011).

Sabe-se que em vida livre os macacos-de-cheiro apresentam uma sazonalidade reprodutiva bem determinada entre os primatas neotropicais, a qual está atrelada ao fenômeno “*fatted*”, caracterizado pelo aumento de tamanho/peso corporal dos machos, resultado do acúmulo de gordura e água no tronco, ombros e braços (DuMond e Hutchison, 1967; Stone, 2014). Estudos levaram a hipótese de que o “*fatted*” é andrógeno dependente, uma vez que foi demonstrado que o período de engorda dos machos está relacionado ao pico de testosterona (Schiml et al., 1996).

Entretanto, algumas pesquisas em relação ao fenômeno “*fatted*” e também à sazonalidade são controversas, e despertam dúvidas a respeito da capacidade fecundante do espermatozoide de *Saimiri* sp. ser restrita ao período sazonal de reprodução. DuMond e Hutchinson (1967) revelaram uma espermatogênese sazonal em *S. sciureus*. Porém, em cativeiro, já foi possível obter sêmen ao longo de todo o ano (Dukelow, 1983; Dukelow 1985; Oliveira et al., 2015; 2016ab; Sampaio et al., 2017) com espermatozoides capazes de fecundar *in vitro* (Dukelow, 1983). Diante de tais divergências, são necessárias mais pesquisas para elucidar essas



particularidades da fisiologia reprodutiva desses primatas não humanos.

Além disso, o sêmen de *Saimiri* sp. coagula durante e após a ejaculação, formando um gel consistente, que contém a maior parte dos espermatozoides (Oliveira et al., 2015; 2016 a b), que pode chegar a um alto grau de coagulação (Dixson e Anderson, 2002). Devido à dificuldade de dissolução, a manipulação *in vitro* de ejaculados de indivíduos desse gênero, torna-se um desafio para a recuperação de espermatozoides viáveis, imprescindíveis para a aplicação em técnicas reprodutivas, como a criopreservação (Oliveira et al., 2015; 2016ab).

Recentemente, foram descritas características andrológicas e seminais das espécies *S. vanzolinii*, *S. macrodon*, *S. cassiquiarensis* e *S. collinsi*, e nestes estudos foram desenvolvidos protocolos de resfriamento e congelamento do sêmen (Oliveira et al., 2015; 2016ab), ferramentas importantes para o estabelecimento de bancos de germoplasma animal e conservação *ex situ* de animais silvestres.

Os avanços nas pesquisas em machos de *Saimiri* estão em andamento, e esta evolução é proporcional à elucidação de questões a respeito dos aspectos reprodutivos básicos das espécies do gênero. Tais respostas são fundamentais para o estabelecimento ou melhoria de protocolos já existentes, em busca de técnicas mais eficientes, com resultados positivos no desempenho reprodutivo dos animais em cativeiro. Conseqüentemente, tais resultados podem ser extrapolados para a manutenção e a recuperação de populações de vida livre. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo compilar informações, em linhas gerais, a respeito dos desafios, avanços e perspectivas em relação às pesquisas desenvolvidas no tocante à biotecnologia da reprodução em machos do gênero *Saimiri*.

Características do sêmen de *Saimiri* sp

Um dos procedimentos primários para que sejam iniciados os estudos reprodutivos em machos é a colheita de sêmen. A eletroejaculação é técnica comumente empregada para essa finalidade, em primatas neotropicais (Oliveira et al., 2016b). E em macacos-de-cheiro, seis de suas espécies já tiveram sêmen coletado com sucesso, por eletroejaculação por via retal (EEJ) (Bennett, 1967; Yeoman, 1998; Oliveira et al., 2015; 2016 ab) ou vibroestimulação peniana (VE) (Yeoman et al., 1998).

A avaliação do sêmen pode ser dividida em macroscópica e microscópica (CBRA, 2013), a macroscópica se resume em volume, cor e aspecto, enquanto que a avaliação microscópica avalia os espermatozoides quanto à motilidade, vigor, concentração, integridade e funcionalidade de membrana plasmática e morfologia espermática. O ejaculado de *Saimiri* sp. apresenta duas frações: a líquida e a coagulada (Bennett, 1967). Em estudos feitos com ejaculados de *S. sciureus* a fração coagulada foi reportada como tendo um aspecto viscoso (Laverde, Medina e Casallas, 2001), e o grau III de coagulação (Dixson e Anderson, 2002), o qual aparece com maior frequência (Oliveira et al., 2016 a). O volume do coágulo seminal que pode chegar a ~ 480µL (Viana, 2013).

O pH é um parâmetro de avaliação macroscópica pouco explorado nas descrições do sêmen dos macacos-de-cheiro (Oliveira et al., 2016 a), somente mais recentemente é que foi verificado para *S. sciureus* (6,6 a 9,0) (Laverde, Medina e Casallas, 2001; Kugelmeier, 2011), para *S. collinsi*, *S. vanzolinii*, *S. cassiquiarensis* e *S. macrodon* em que Oliveira et al. (2016 b) encontraram uma média e desvio padrão de 7.43 ± 0.63 , que não variou entre as espécies.

Para todos os parâmetros mencionados anteriormente, já existem descrições para seis espécies do gênero (Tab. 1). A funcionalidade de membrana plasmática em *S. collinsi* foi descrita variando de 35 a 65% (Oliveira et al., 2016 b) e para o vigor espermático a maioria dos estudos aponta para os valores de 3 a 5 (Viana, 2013; Oliveira et al., 2015; 2016 ab; Sampaio et al., 2017). Assim como o pH, avaliações complementares são praticamente inexistentes, Almeida et al. (2012) validaram um protocolo com associação de sondas fluorescentes (H342 e PI-integridade de membrana plasmática, FITC-PSA-integridade acrossomal e JC-1-atividade mitocondrial) para avaliação espermática em *S. sciureus*, e outras técnicas utilizando associação de “fast full green” com rosa bengala para avaliação de integridade da membrana acrossomal e DAB para atividade mitocondrial foram utilizadas também em *S. sciureus* e os resultados obtidos foram de $98,0 \pm 0,7$ a $97,8 \pm 0,4$ %, e, $72,17 \pm 4,02$ e $68,8 \pm 2,4$ % para IMA e atividade mitocondrial classe I, respectivamente (Kugelmeier, 2011; Viana, 2013).

No tocante à morfologia espermática, a classificação de Bloom (1973), que divide as alterações espermáticas em defeitos maiores e defeitos menores, tem sido a mais empregada para o gênero (Kugelmeier, 2011; Viana, 2013; Oliveira et al., 2015; 2016 ab; Sampaio et al., 2017).

Tabela 1. Características seminais de espécies do gênero *Saimiri*, conforme o método de colheita de sêmen.

Espécie	Método de colheita	Volume total (μl)	Concentração (10 ⁶ sptz/ml)	Motilidade (%)	IMP (%)	Referência	
<i>S. sciureus</i>	EEJ	50 - 81	—	153 ± 96	35 ± 11	37 ± 19	Bennett, 1967
		160 ± 57	—	427 ± 160	66 ± 15	79 ± 2	Ackerman e Roussel, 1968
		125 (g)	—	80 a 300	40 a 80	—	Dukelow, 1983
	VE	106 ± 80	—	362 ± 344	70 ± 22	74 ± 17	Laverde, Medina, e Cruz, 2001
		454	—	15 ± 3	83 ± 2,1	61,8 ± 8,48	Kugelmeier, 2011
		478,8 ± 53,8	—	39,5 ± 4,9	86,3 ± 1,7	82,3 ± 1,9	Viana, 2013
<i>S. boliviensis</i>	EEJ	205 ± 25	—	4,7 ± 2,7	44,1 ± 11,4	Yeoman et al., 1998	
	VE	436 ± 90	—	77,1 ± 20,4	80,6 ± 4,3	Yeoman et al., 1998	
<i>S. collinsi</i>	EEJ	*49,2 ± 68,9** 65,4 ± 142,1	—	88,31 ± 36,64	~45	~56	Oliveira et al., 2016 a
		*51,8 ± 49,5**304 ± 286,6	—	13-29	~80-100	~ 75-95	Oliveira et al., 2015
		*100 ± 106,14 **287 ± 184,28	—	—	~75-95	~58-75	Oliveira et al., 2016 b
		*203 ± 88**177 ± 89	—	—	79 ± 13	77 ± 9	Sampaio et al., 2017
<i>S. vanzolinii</i>	EEJ	*28,3 ± 59,8**126 ± 142	—	~77	~78	Oliveira et al., 2016 a	
		*85 ± 92 ** 90±85	—	~95	~75	Oliveira et al., 2016 b	
		*83±6**93±58	—	95±5	95±5	71±11	Sampaio et al., 2017
<i>S.cassiquiarensis</i>	EEJ	*5±7** 175 ± 177	—	~43	~ 90	Oliveira et al., 2016 a	
		*10**5	—	80	80	62	Oliveira et al., 2016 b
<i>S. macrodon</i>	EEJ	*0** 500	—	90	98	Oliveira et al., 2016 a b	

*Volume da fração líquida. ** Volume da fração coagulada. EEJ eletro ejaculação. VE vibroestimulação peniana. IMP integridade de membrana plasmática. —: Análise não realizada.



Os defeitos menores de cauda são sempre os mais relatados em *Saimiri* (Laverde, Medina e Casallas, 2001; Kugelmeier, 2011; Viana, 2013; Oliveira et al., 2015; 2016b; Sampaio et al., 2017). Outro fato curioso, sobre a morfologia espermática do gênero, é que a peça intermediária insere-se lateralmente (abaxial) à parte posterior da cabeça (Martin, Gould e Waner, 1975; Dukelow, 1983; Gage, 1998; Oliveira et al., 2015; 2016 a), fato também observado em lemúridos (Martin, Gould e Waner, 1975). A porcentagem de espermatozoides anormais encontrados para *S. sciureus* podem variar de 3 a 67% (Ackerman e Roussel, 1968; Dukelow, 1983; Laverde, Medina e Casallas, 2001; Kugelmeier, 2011; Viana, 2013), para *S. collinsi* de 1 a 58% (Oliveira et al., 2015; 2016 ab; Sampaio et al., 2017), *S. vanzolinii* de 5 a 9% (Oliveira et al., 2015; 2016 ab; Sampaio et al., 2017) e para *S. cassiquiarensis* 19% (Oliveira et al., 2016 b). Para *S. vanzolinii* e *S. cassiquiarensis* constatou-se os menores índices de anormalidade entre as espécies analisadas. Contudo, a grande variação no percentual de espermatozoides anormais observados nas espécies *S. sciureus* e *S. collinsi* pode ser consequência do tipo de técnica utilizada nas análises laboratoriais. Sobre isso, pesquisas revelam maior frequência de determinados defeitos espermáticos, como por exemplo, defeitos de cauda espermática, quando detectados após análises por esfregaço em lâmina corada (Arruda et al., 2015). Tais defeitos também foram os mais observados nos resultados obtidos por Oliveira et al. (2015; 2016 b) e Sampaio et al. (2017), que utilizaram esta mesma técnica.

A variação da morfometria espermática é considerada como um potencial marcador para detecção de machos sub(in)férteis e anomalias da cromatina (Sailer et al., 1996). Recentemente, Sampaio et al. (2017) estudaram a morfometria de *S. collinsi* e *S. vanzolinii*, e constataram que a variação biométrica de espermatozoides morfologicamente normais, é proporcional à qualidade da amostra. Naquelas amostras com baixa motilidade e vigor, e altos índices de patologia espermática, as cabeças espermáticas possuíam um menor tamanho (Tab. 2), sendo um indicativo de possíveis alterações na cromatina. Esses resultados chamam atenção para a necessidade de implantação de mais técnicas voltadas para a avaliação seminal em *Saimiri*, a fim de aumentar a acurácia nos diagnósticos de sub (in) fertilidade. Os dados obtidos são fundamentais na padronização e validação de técnicas de avaliação seminal mais arrojadas, como as análises computacionais do sêmen (CASA) para espécies silvestres.

Tabela 2. Morfometria espermática do gênero *Saimiri*, dimensões lineares dos espermatozoides (µm) - Média ± DP.

Espécie	Largura da cabeça	Comprimento da cabeça	Comprimento da PI	Comprimento total da cauda	Comprimento total
<i>S. sciureus</i>	3,51 ± 0,01 ¹	5,11 ± 0,02 ¹	9,03 ± 0,12 ¹	55,34 ± 0,13 ¹	69,24 ± 0,15 ¹
	3,6 ± 0,3 ²	5,5 ± 0,03 ²	10 ± 0,5 ²	55,1 ± 2,7 ²	70,6 ± 2,8 ²
	—	5,1 ³	9,0 ³	55,3 ³	69,2 ³
<i>S. boliviensis</i>	3,76 ± 0,45 ⁴	5,71 ± 0,45 ⁴	12,2 ± 0,45 ⁴	65,68 ± 0,45 ⁴	71,39 ± 0,45 ⁴
<i>S. collinsi</i>	4,3 ± 0,01 ⁵	6,2 ± 0,01 ⁵	—	70,5 ± 0,19 ⁵	76,7 ± 0,19 ⁵
	4,1 ± 0,01 ⁵	6,2 ± 0,02 ⁵	—	70,6 ± 0,19 ⁵	76,9 ± 0,19 ⁵
<i>S. vanzolinii</i>	4,8 ± 0,01 ⁵	6,8 ± 0,01 ⁵	—	69,2 ± 0,09 ⁵	76,1 ± 0,09 ⁵

*PI: Peça intermediária. —: Análise não realizada. ¹Dukelow, 1983; ²Laverde, Medina e Casallas, 2001; ³Gage e Freckleton, 2003; ⁴Steinberg et al., 2007, ⁵Sampaio et al., 2017.

Situação atual do estudo da biotecnologia da reprodução em primatas do gênero *Saimiri*: obtenção e manipulação de gametas masculinos

Colheita e processamento do sêmen

A colheita de sêmen no gênero *Saimiri* foi descrita pela primeira vez por Bennett (1967), na espécie *S. sciureus*. O sêmen foi colhido pela técnica de eletroejaculação, utilizando com probe retal bipolar (12,5 cm de comprimento x 0,6 cm de diâmetro), e o ejaculado obtido após 5 min de estimulação (5 séries de 8 V). Uma outra técnica de colheita de sêmen utilizada em *Saimiri* sp. é a vibroestimulação peniana (Yeoman et al., 1997; Laverde, Medina e Casallas, 2001; Kugelmeier, 2011; Viana, 2013), que consistiu na estimulação mecânica, por meio de um vibrador, com ajuste da frequência (75-90 Hz) e amplitude (1.1 -1.8mm) das ondas (Yeoman et al., 1997). Em *Saimiri* sp., para ambas as técnicas, foram obtidas respostas satisfatórias em relação ao volume



seminal, concentração e motilidade espermática (Bennett, 1967; Ackerman e Roussel, 1968; Denis et al., 1976; Yeoman et al., 1997; 1998; Kugelmeier, 2011; Viana, 2013; Oliveira et al., 2015; 2016 ab).

As técnicas para colheita de sêmen em *Saimiri* sp. já são estabelecidas, porém, um dos grandes desafios na manipulação do sêmen de macacos-de-cheiro é a consistência do ejaculado, que tem um aspecto de gel solidificado e não se desfaz espontaneamente (Dixson e Anderson, 2002), o que dificulta a avaliação e a recuperação dos espermatozoides. Desta forma, o sucesso no desenvolvimento de biotécnicas de reprodução no gênero *Saimiri*, depende do desenvolvimento de diluidores seminais (soluções tampões) que mantenham a viabilidade da célula espermática durante o período de dissolução do coágulo seminal. A importância desse procedimento está na obtenção de espermatozoides viáveis para uso posterior em outras biotécnicas, como a criopreservação seminal, inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões (Oliveira et al., 2015; 2016 ab).

A dissolução do coágulo seminal de macacos-de-cheiro já foi testada por meio de soluções a base de TES-TRIS (*S. boliviensis*; Yeoman et al., 1997), lactose (*S. sciureus*; Denis et al., 1976) e água de coco em pó (ACP-118®) (*S. collinsi*, *S. vanzolinii*, *S. cassiquiarensis* e *S. macrodon*; Oliveira et al., 2015; 2016 ab). O uso de diluidores seminais acrescidos de diferentes concentrações de tripsina (Ackerman e Roussel, 1968; Kugelmeier, 2011), e a utilização de método físico de diluição por meio da incubação do sêmen a 37°C com ausência de solução tampão (Denis et al., 1976), são métodos alternativos de dissolução do coágulo seminal também testados em ejaculados de *Saimiri* sp.

Entretanto, durante o período de dissolução, os espermatozoides são expostos à tensão atmosférica de oxigênio que é uma fonte de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), a qual em elevadas concentrações podem comprometer a qualidade espermática interferindo em sua capacidade fecundante (Valença e Guerra, 2007).

No intuito de neutralização da ação deletéria das ROS, a adição de antioxidantes aos diluidores seminais, tem sido testada e alcançados bons resultados em primatas não humanos (Dong et al., 2010; Mccarthy e Meyers, 2010; Mccarthy et al., 2011).

Nesse sentido, recentemente, Almeida et al. (dados não publicados) avaliaram a adição do Trolox (um análogo sintético da vitamina E) no meio diluidor ACP-118® durante a dissolução do coágulo seminal de *S. collinsi*, e verificaram que a adição desse antioxidante não-enzimático mostrou-se eficiente na manutenção dos parâmetros espermáticos após 7,5 h de incubação a 37°C em *S. collinsi*.

Criopreservação seminal

O desenvolvimento de diluidores seminais adequados tem função elementar para o uso efetivo de biotécnicas de reprodução assistida, principalmente a criopreservação do sêmen. Para isso, essas soluções devem manter a viabilidade da célula espermática durante a dissolução do coágulo seminal e nas etapas seguintes do processo: o resfriamento e a adição do crioprotetor permeável (Domingues et al., 2011).

Em *Saimiri*, o crioprotetor extracelular de eleição tem sido a gema de ovo, enquanto que o intracelular é glicerol, com concentração final que varia de 1,5% a 4% (Denis et al., 1976; Oliveira et al., 2015; 2016b). Entretanto, apesar desses autores obterem espermatozoides com motilidade (Tab. 3) no final desse processo, mais estudos devem ser realizados a fim de melhorar os parâmetros seminais pós-criopreservação, no intuito de utilizar esses espermatozoides criopreservados posteriormente com sucesso em outras biotécnicas da reprodução assistida, tais como a inseminação artificial e a produção *in vitro* de embriões.

Análise proteômica do sêmen como uma avançada ferramenta para o esclarecimento de questões fisiológicas reprodutivas dos machos *Saimiri*

Estudos inovadores acerca dos componentes biológicos, sobretudo aqueles relacionados à expressão proteica do fluido seminal e espermatozoides, já foram realizados em primatas (Kawase et al., 2015; Valtonen-Andre et al., 2005). A partir de tais pesquisas, foram obtidas informações relevantes sobre os variados processos fisiológicos, como proteínas relacionadas à fertilidade que atuam no desenvolvimento de espermatozoides, motilidade, capacitação, transporte, proteção, reação acrosômica e fecundação (Kawase et al., 2015), e outras particularidades, como a identificação de proteínas do coágulo seminal (semenogelinas) e o impedimento da liquefação do coágulo seminal devido a ausência de PSA no plasma seminal de *Callithrix jacchus* (Valtonen-Andre et al., 2005).

Como já mencionado, os primatas do gênero *Saimiri* apresentam eventos fisiológicos marcantes tais como o fenômeno “*fatted*” associado à sazonalidade reprodutiva dos machos (Stone, 2014), e elevado grau de coagulação seminal (Dixson e Anderson, 2002). Entretanto, os estudos sobre esses aspectos ainda são pouco esclarecedores e controversos. Para melhor entendê-los estão sendo realizadas pesquisas para investigar os componentes proteicos do sêmen e suas associações com cada uma dessas características.

Em um estudo recente, utilizando a técnica de eletroforese unidimensional, amostras do coágulo seminal de *Saimiri collinsi* apresentaram bandas proteicas com peso molecular entre 76 e 12 kDa (Sousa et al., 2016). Aquelas com 76 kDa presumem a presença da isoforma de Semenogelina (Sg), uma proteína considerada



majoritária na composição do coágulo seminal em primatas. Análises por ultramicrografias de sêmen de primatas do velho mundo (*Macaca mulatta*) demonstraram que a Sg forma uma rede emaranhada que retém espermatozoides (Zaneveld et al., 1974).

Nesse contexto, resultados preliminares a partir de testes para extração de proteínas do coágulo seminal de *S. collinsi* sugerem que o coágulo seminal, nesta espécie, é constituído por uma trama composta por Sg, a qual retém proteínas solúveis. Presumivelmente, quanto maior o grau de coagulação do sêmen, maior será a dificuldade em extrair as proteínas da amostra (Sousa et al., 2016).

Tais resultados em *Saimiri* fornecem informações básicas imprescindíveis para o avanço nas pesquisas sobre a composição biomolecular do coágulo seminal, e consequentemente um melhor direcionamento para elaboração mais efetiva de diluidores seminais para o gênero.

Até o presente momento, as análises biomoleculares e ultraestruturais em amostras seminais de *Saimiri* estão restritas respectivamente à separação de proteínas do coágulo seminal por meio da utilização da técnica de eletroforese unidimensional (1D) (Sousa et al., 2016), e ao emprego de ultramicrografias de varredura para apresentar dados de morfometria (largura e comprimento) da cabeça de espermatozoides de *S. boliviensis* (Steinberg et al., 2009). Entretanto, o progresso para a ampliação desses estudos com células espermáticas já é palpável, a fim de que sejam detectadas proteínas cuja expressão possa estar relacionada aos processos fisiológicos de capacidade fecundante dos espermatozoides, sazonalidade reprodutiva e ao fenômeno “fatted”. Os resultados dos estudos com gametas serão de altamente valiosos quando associados às descobertas moleculares do plasma seminal e aos parâmetros seminais.

Tabela-3 Avaliação da qualidade do sêmen de *Saimiri* sp. a fresco e congelado em diferentes concentrações de glicerol.

Espécie	Tratamento	Sêmen	Motilidade (%)	Vigor	IMP (%)	Morfologia (%)
<i>S. sciureus</i>	GLY 4%	Fresco	~ 65 ¹	—	—	—
		Congelado	~52 ¹	—	—	—
<i>S. collinsi</i>	GLY 3%	Fresco	20 ²	3 ²	50 ²	30 ²
		Congelado	~1 ²	0 ²	~7 ²	89 ²
	GLY 1.5%	Fresco	~85 ³	~5 ³	~65 ³	99 ³
		Congelado	~20 ³	~3 ³	~15 ³	97 ³
	GLY 3%	Fresco	20 ²	3 ²	50 ²	30 ²
		Congelado	~1 ²	0 ²	~5 ²	~87 ²
<i>S. vanzolinii</i>	GLY 3%	Fresco	95 ³	5 ³	75 ³	95 ³
		Congelado	45 ³	4-2 ³	29 ³	95 ³
<i>S. macrodon</i>	GLY 3%	Fresco	90 ³	5 ³	98 ³	—
		Congelado	10 ³	5 ³	38 ³	87 ³
<i>S. cassiquiarensis</i>	GLY 3%	Fresco	80 ³	5 ³	62 ³	—
		Congelado	6 ³	2 ³	7 ³	83 ³

Vigor avaliado em uma escala de 0-5. IMP: Integridade de membrana plasmática. Morfologia porcentagem de espermatozoides normais. —: Análise não realizada. GLY 3%: Glicerol a 1,5, 3 e 4%. ¹Denis et al., 1976; ²Oliveira et al., 2015; ³Oliveira et al., 2016.

Desafios e perspectivas

Não existem dúvidas de que os resultados obtidos até agora são potencialmente úteis, com aplicação efetiva na colheita de material seminal (Bennett, 1967; Viana, 2013), análises andrológicas (Oliveira et al., 2015;



2016 ab) e resultados otimistas no processo de criopreservação do sêmen (Oliveira et al., 2015; 2016 ab). Mas, em vista da complexidade e peculiaridade das características reprodutivas de *Saimiri*, muitas questões básicas sobre os aspectos fisiológicos da reprodução dos machos desse gênero ainda precisam ser respondidas.

Durante a manipulação do sêmen sempre estão presentes algumas limitações resultantes de variabilidade individual dos animais, principalmente em relação às diferenças entre os graus de coagulação seminal, o que provoca a busca por diluidores seminais alternativos ou pela melhoria nos métodos de dissolução do ejaculado (Oliveira et al., 2016 b). Para isso, os conhecimentos acerca dos aspectos ultraestruturais e moleculares do sêmen coagulado de *Saimiri* tornam-se imprescindíveis. Esses estudos ainda podem ser mais bem explorados quando voltados aos espermatozoides e à linhagem de células espermatogênicas.

Um outro aspecto desafiador é a determinação do período reprodutivo dos animais. Nos machos, o fenômeno *fatted* é o fator visual mais atrelado à sazonalidade do gênero, porém, na prática, foi observado na espécie *S. collinsi*, que as alterações morfológicas típicas desse fenômeno, parecem não ser tão evidentes em alguns animais em cativeiro (dados não publicados). Este fato alerta para maiores estudos sócio-comportamentais, genéticos e hormonais, a fim de tornar possível e bem sucedida a implementação de técnicas de reprodução *in vivo*, tais como a inseminação artificial e a transferência de embriões no gênero.

Embora já se tenham sido realizadas pesquisas com inseminação artificial (Bennett, 1967), fertilização *in vitro* (Kuehl e Dukelow, 1982) e ativação partenogenética (Lima et al., 2012), a aplicação dessas técnicas de reprodução assistida ainda não são uma realidade para gênero *Saimiri*. As pesquisas atuais podem gerar respostas plausíveis para conduzir investigações mais refinadas correspondentes à fecundação *in vitro* e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), técnicas que representariam um salto inovador para as biotécnicas de reprodução assistida em *Saimiri*.

Conclusão

Estudos detalhados acerca de análises moleculares, genéticas e ultraestruturais do material seminal de *Saimiri*, aliados a conhecimentos sócio-comportamentais, são fundamentais para esclarecer funções biológicas e estratégias adaptativas inerentes à reprodução deste grupo de animais. Ainda, conferem ao gênero novos suportes empíricos, que funcionam como bases técnicas para uso de métodos reprodutivos artificiais, tanto *ex situ* quanto *in situ*, aplicáveis também para a conservação de outras espécies de primatas neotropicais.

Referências Bibliográficas

- Ackerman DR, Roussel JD. Fructose, lactic acid and citric acid content of the semen of eleven subhuman primate species and of man. *J Reprod Fertil*, v.17, p.563-566, 1968.
- Alfaro JW, Boubli JP, Paim FP, Ribas CC, Silva MNF, Messias MR, Röhe F, Mercês MP, Silva Júnior JS, Silva CR, Pinho GM, Koshkarian G, Nguyen MTT, Harada ML, Rabelo RM, Queiroz LH, Alfaro ME, Farias IP. Biogeography of squirrel monkeys (genus *Saimiri*): South-central Amazon origin and rapid pan-Amazonian diversification of a lowland primate. *Mol Phylogenet Evol*, v.82, p.436-454, 2015.
- Almeida DVC, Oliveira KG, Leite DL, Nikolak EM, Silva YP, Domingues SFS. Validação de um protocolo para avaliação espermática em macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) utilizando sondas fluorescentes. *Ciência Animal UECE*, edição especial VI Conera, v.22, p.65-74, 2012.
- Arruda RP, Celeghini CC, Garcia AR, Santos GC, Leite TG, Oliveira LZ, Lançoni R, Rodrigues MP. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, n.1, p.47-60, 2015.
- Bennett JP. Semen collection in the squirrel monkey. *J Reprod Fertil*, v.13, p.353-355, 1967.
- Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-391, 1973.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª Ed. Belo Horizonte, 2013. 49p.
- Denis LT, Poindexter NA, Ritter MB, Seager SWJ, Deter RL. Freeze preservation of squirrel monkey sperm for use in timed fertilization studies. *Fertil Steril*, v.27, p.723-726, 1976.
- Dixson AL, Anderson MJ. Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates. *Folia Primatol*, v.73, p.63-69, 2002.
- Domingues SFS, Lima JS, Oliveira KG, Santos RT. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação *in situ* de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.124-129, 2011.
- Dong Q, Tollner TL, Rodenburg SE, Hill DL, VandeVoort CA. Antioxidants, Oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol improved postthaw survival of rhesus monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival. *Fertil Steril*, v.94, p.2359-2361, 2010.
- Dukelow WR. Reproductive cyclicality and breeding in the Squirrel Monkey. In: Rosenblum LA, Coe CL. Handbook of squirrel monkey research. New York: Plenum Press, 1985, p.169-190



- Dukelow WR.** The Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). In: Hearn JP. Reproduction in New World Primates: New Models in Medical Science. Lancaster: MTP Press Limited, 1983, p.149-180.
- DuMond FV, Hutchinson TC.** Squirrel monkey reproduction: The “fatted” male phenomenon and seasonal spermatogenesis. *Science*, v.158, p.1067-1070, 1967.
- Gage MJG, Freckleton RP.** 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: Biological Sciences*, v.270, p.625-632, 2003.
- Gage MJG.** Mammalian sperm morphometry. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v.265, p.97-103, 1998.
- IUCN.** IUCN Red List of Threatened Species, Version 2011.2. Disponível em www.iucnredlist.org. Acessado em 20/02/2017.
- Kawase O, Cao S, Xuan X.** Sperm membrane proteome in wild Japanese macaque (*Macaca fuscata*) and Sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology*, v.83, p.95-102, 2015.
- Kuehl TJ, Dukelow WR.** Fertilization in vitro of *Saimiri sciureus* follicular oocytes. *J Med Primatol*, v.4, p.209-16, 1975.
- Kugelmeier T.** Colheita e análise do sêmen de macacos de cheiro (*Saimiri sciureus*) por vibroestimulação: do condicionamento ao coágulo seminal. Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós Graduação em Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 2011.
- Laverde HJC, Medina VMR, Casallas PEC.** 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.
- Lima JS, Scalercio SRA, Costa NN, Brito AB, Nikolak E, Domingues SFS.** Ativação partenogênica de oócitos maturados *in vitro* em macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*). In: VI Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal Biotecnologia Reprodutiva para o Desenvolvimento do Norte e Nordeste do Brasil, 2012, Fortaleza. *Ciência Animal*. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 2012. v.Supl. p.14-16.
- Martin DE, Gould KG, Warner H.** Comparative morphology of primate spermatozoa using scanning electron microscopy. I. Families Hominidae, Pongidae, Cercopithecidae and Cebidae. *J Hum Evol*, v.4, p.287-292, 1975.
- McCarthy MJ, Baumber J, Kass PH, Meyers SA.** Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biol Reprod*, v.82, p.644-651, 2010.
- Mccarthy MJ, Meyers, SA.** Antioxidant treatment in the absence of exogenous lipids and proteins protects rhesus macaque sperm from cryopreservation-induced cell membrane damage. *Theriogenology*, v.76, p.168-76, 2011.
- Oliveira KG, Leão DL, Queiroz HL, Paim FP, Vianez-Júnior JL, Domingues SFS.** Testicular biometry and sêmen characteristics in captive and wild squirrel monkey species (*Saimiri* sp.). *Theriogenology*, v.86, p.879-887, 2016a.
- Oliveira KG, Leão DL, Santos RR, Brito AB, Lima JS, Sampaio WV, Domingues SFS.** Cooling and Freezing of sperm from captive, free-living and endangered squirrel monkey species. *Cryobiology*, v.73, p.283-289, 2016b.
- Oliveira KG, Leão DL, Santos RR, Domingues SFS.** Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey, *Saimiri collinsi*. *Theriogenology*, v.85, p.743-749, 2015.
- Rylands AB, Schneider H, Langguth A, Mittermeier RA, Groves CP, Rodríguez Luna, E.** An assessment of the diversity of New World primates. *Neotrop. Primates*, v.8, p.61-93, 2000.
- Sailer BL, Lorna KJ, Donald PE.** Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, v.24, p.167-173, 1996.
- Sampaio WV, Oliveira KG, Leão DL, Caldas-Bussiere MC, Queiroz HL, Paim FP, Domingues SFS.** Morphologic analysis of sperm from two Neotropical primate species: Comparisons between the squirrel monkeys *Saimiri collinsi* and *Saimiri vanzolinii*. *Zygote*, 2017. Doi:10.1017/S0967199416000411.
- Santos EAA, Sousa PC, Martins JAM, Moreira RA, Monteiro-Moreira ACO, Moreno F BMB, Oliveira MF, Moura AA, Silva AR.** Protein profile of the seminal plasma of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Reproduction*, v.147, p.753-764, 2014.
- Schimpl PA, Mendoza SP, Saltzman W, Lyons DM, Mason WA.** Seasonality in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): social facilitation by females. *Physiol Behav*, v.60, p.1105-1113, 1996.
- Sousa PC, Leão DL, Oliveira KG, Sampaio WV, Martins JAM, Tilburg MF, Santos RR, Moura AA, Domingues SFS.** Protein profile of seminal plasma of squirrel monkeys (*Saimiri collinsi*) and capuchin monkeys (*Sapajus apella*) obtained by one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: a preliminary study. *Anim Reprod*, v.14, p.279, 2017.
- Steinberg ER, Nieves M, Ascunce MS, Palermo AM, Mudry MD.** Morphological and genetic characterization of *Saimiri boliviensis*. *Int J Primatol*. v.30, p.29-41, 2009.
- Steinberg ER, Nieves M, Mudry MD.** Meiotic characterization and sex determination system of Neotropical primates: Bolivian squirrel monkey *Saimiri boliviensis* (Primates: Cebidae). *Am J Primatol*, v.69, p.1236-1241,



2007.

Stone AI. Is fatter sexier? Male reproductive strategies in squirrel monkeys, *Saimiri sciureus*. In: *Am J Phys Anthropol*. 111 River ST, Hoboken 07030-5774, NJ USA: Wiley-Blackwell, p.264-264, 2014.

Valença RMB, Guerra MMP. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.47-53, 2007.

Valtonen-Andre C, Olsson AY, Nayudu PL, Lundwall A. Ejaculates from the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Contain semenogelin and Beta-microseminoprotein but not Prostate-Specific Antigen. *Mol Reprod Dev*, v.71, p.247-255, 2005.

Viana CF. 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 de Mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal, UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2013.

Yeoman RR, Ricker RB, Williams LE, Sonksen J, Abee CR. Vibratory stimulation of ejaculation yields increased motile spermatozoa, compared with electroejaculation, in squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*, v.36, p.62-64, 1997.

Yeoman RR., Sonksen J, Gibson SV, Rizk BM, Abee CR. 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.

Zaneveld LJD, Tauber PF, Port C, Propping D, Schumacher GFB. Scanning electron microscopy of the human, Guinea pig and Rhesus monkey seminal coagulum. *J Reprod Fert*, v.40, p.223-225, 1974.
