



A interface entre a saúde humana e a reprodução assistida em primatas não-humanos

The interface between human health and assisted reproductive technologies in non-human primates

Fernanda Maria de Carvalho*

*Oregon National Primate Research Center/Oregon Health & Science University, Beaverton, OR, EUA.

Resumo

Os primatas não-humanos (PNHs) são tidos como importantes modelos para estudos biomédicos devido à sua grande similaridade biológica com os seres humanos. As técnicas de reprodução assistida (TRAs) constituem uma importante ferramenta para realização de estudos que envolvam infertilidade, desenvolvimento de contraceptivos, gestação e desenvolvimento fetal, preservação da fertilidade em pacientes com câncer, geração de modelos experimentais por meio de técnicas de edição gênica, entre outros. O objetivo dessa revisão é discutir as principais TRAs utilizadas em PNHs e suas aplicações. Dentre as técnicas mais utilizadas em PNHs, podem-se citar colheita e criopreservação de sêmen, monitoramento do ciclo ovariano, estimulação ovariana controlada e aspiração de folículos ovarianos, fecundação *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozoides, inseminação artificial, microinjeção para injeção gênica, biopsia embrionária, criopreservação de embriões, transferência de embriões, diagnóstico de gestação, enxerto de gônadas e clonagem. Os estudos apresentados nesta revisão mostram a evolução das TRAs e suas diferentes aplicações. Particularmente, os estudos de edição gênica e clonagem representam um grande avanço na utilização combinada de diversas TRAs para geração de modelos biomédicos para doenças humanas, demonstrando o papel dessas técnicas para avanços científicos no que diz respeito à saúde humana.

Palavras-chave: primatas não-humanos, técnicas de reprodução assistida, fecundação *in vitro*, edição gênica

Abstract

Nonhuman Primates (NHPs) are considered important models for biomedical studies due to their high biological proximity with humans. The Assisted Reproductive Technologies (ARTs) represent an important tool to perform studies related to infertility, development of contraceptives, gestation and fetal development, fertility preservation in cancer patients, generation of experimental models through gene editing techniques, among others. The objective of this review is to discuss the main ARTs used in NHPs and their application. Among the most used techniques in NHPs, we can include collection and cryopreservation of semen, ovarian cycle monitoring, controlled ovarian stimulation and follicle aspiration, in vitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection, artificial insemination, microinjections for gene editing, embryo biopsy, embryo cryopreservation, embryo transfer, pregnancy diagnosis, grafting of gonadal tissue, and cloning. The studies cited in this review illustrate the evolution of the ARTs and their applications. The gene editing and cloning studies, in particular, represent the great advancements on the combined use of several different ARTs for the generation of biomedical models for human diseases, demonstrating the role of these techniques in the scientific advancement with regards to human health.

Keywords: nonhuman primates, assisted reproductive technologies, in vitro fertilization, gene editing

Introdução

Os primatas não-humanos (PNHs) são tidos como importantes modelos para estudos biomédicos devido à sua grande similaridade biológica com os seres humanos (Wolf, 2009). Essa similaridade se dá pelo fato de serem o grupo de animais taxonomicamente mais próximos dos seres humanos, já que também fazem parte da Ordem Primates (Groves, 2005). Isso faz com que os PNHs sejam insubstituíveis para estudos em determinadas áreas da ciência, tais como função e doenças do cérebro, doenças

¹Correspondência: decarval@ohsu.edu

Recebido: 01 de outubro de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



metabólicas, susceptibilidade a doenças infecciosas, produção de vacinas, reprodução e doenças do trato reprodutivo, entre outras (Friedman et al., 2017).

As técnicas de reprodução assistida (TRAs) constituem uma importante ferramenta para realização de estudos que envolvam infertilidade, desenvolvimento de contraceptivos, gestação e desenvolvimento fetal, preservação da fertilidade em pacientes com câncer, geração de modelos experimentais por meio de técnicas de edição gênica, entre outros (Stouffer e Woodruff, 2017). O objetivo dessa revisão é discutir as principais técnicas de reprodução assistida utilizadas em PNHs e suas aplicações.

Colheita e criopreservação de sêmen

A colheita de sêmen é uma das TRAs mais básicas e é essencial para aplicação de várias outras técnicas. De acordo com Carvalho (2016), dentre os diversos métodos de colheita de sêmen descritos para PNHs, incluem-se eletroejaculação, vibroestimulação peniana, lavagem vaginal, vagina artificial, masturbação ou autoestimulação, estimulação manual realizada por um técnico, punção do epidídimo *in vivo* e extração de espermatozoides do epidídimo ou ducto deferente *post-mortem* ou pós-castração. A eletroejaculação é o método mais utilizado por ser seguro e efetivo para a colheita de sêmen de animais selvagens em geral, incluindo primatas não-humanos (Gould et al., 1978; Butler et al., 1995). Essa técnica pode ser realizada por meio de probe retal ou por meio da utilização de eletrodos penianos (Butler et al., 1995). Ambas as técnicas foram descritas em primatas do velho mundo, enquanto para primatas neotropicais, apenas a técnica com probe retal foi descrita. O método de colheita a ser utilizado depende não apenas da espécie em questão, como também da praticidade e viabilidade do método de acordo com situação. A eletroejaculação com probe retal é o método de escolha para casos pontuais, já que não exige treinamento prévio do animal e possui taxas de sucesso relativamente altas (Carvalho, 2016). Em se tratando de espécies de pequeno porte, tais como os calitriquídeos, pode-se utilizar também a técnica de vibroestimulação peniana (Yeoman et al., 1997). Especificamente em centros de pesquisa onde se realizam estudos frequentes que utilizem amostras de sêmen, podem-se manter indivíduos treinados para colheita de sêmen por eletroejaculação peniana (Vandevoort, 2004).

Após a obtenção da amostra de sêmen, esta pode ser processada para utilização à fresco ou criopreservada para utilização no futuro. Segundo trabalho recente (Carvalho, 2016), diluidores à base de gema de ovo são usados amplamente, com concentrações que variam de 5 a 30%, sendo 20% a concentração mais utilizada. Ainda segundo esse trabalho recente (Carvalho, 2016), dentre os diversos crioprotetores existentes, o mais utilizado para criopreservação de sêmen é o glicerol. A concentração de glicerol utilizada para criopreservação de sêmen de PNHs varia de 1,5% até 14%.

Monitoramento do ciclo ovariano

As técnicas utilizadas para monitoramento do ciclo ovariano dependem da espécie em questão e da situação. Dentre as técnicas disponíveis, encontram-se a dosagem hormonal invasiva ou não-invasiva, ultrassonografia, observações de sinais externos e citologia vaginal (Tardif et al., 2012). A dosagem hormonal auxilia na determinação da fase do ciclo ovariano e é importante para determinação do dia da ovulação, independentemente da espécie. A ultrassonografia pode ser utilizada no monitoramento da ciclicidade ovariana (Tardif et al., 2012). A aplicação das demais técnicas é dependente da espécie, conforme descrito a seguir. De modo geral, os primatas do velho mundo menstruam (ciclo menstrual) e várias espécies apresentam “intumescimento sexual” (do inglês, *sexual swelling*) e/ou “pele sexual” (do inglês, *sex skin*) (Fortman et al., 2002; Dixson, 2012). Nessas espécies é possível acompanhar o ciclo menstrual baseado na observação de menstruação (presença de sangue externamente ou em *swab* vaginal) e/ou alterações morfológicas cíclicas (Tardif et al., 2012). Já os primatas do Novo Mundo, tipicamente não menstruam, com exceção de algumas espécies, tais como *Cebus apella* e *Ateles* sp. (Dixson, 2012). Além disso, alguns gêneros de primatas do Novo Mundo, como por exemplo *Saimiri*, *Cebus* e *Alouatta*, apresentam mudanças cíclicas da corneificação vaginal, sendo possível o acompanhamento do ciclo por citologia vaginal (Dixson, 2012; Tardif et al., 2012).

Estimulação ovariana controlada (EOC) e aspiração de folículos ovarianos

O objetivo da EOC é de sobrepujar os mecanismos internos de seleção do(s) folículo(s) dominante(s) (tipicamente apenas um em PNHs, com algumas exceções) e estimular o desenvolvimento



de vários folículos antrais grandes contendo oócitos potencialmente fertilizáveis (Stouffer e Zelinski-Wooten, 2004). A maioria dos protocolos consistem na aplicação de gonadotropinas exógenas, incluindo o hormônio folículo estimulante (FSH), associado ou não ao hormônio luteinizante (LH) e podem incluir também um antagonista do hormônio estimulante de gonadotropinas (GnRH) para evitar ovulação espontânea e uma dose grande de um hormônio com atividade semelhante ao LH (por exemplo, gonadotropina coriônica humana – hCG) (Stouffer e Zelinski-Wooten, 2004). O protocolo deve ser iniciado no início da fase folicular (antes da seleção do folículo dominante). A resposta ao estímulo é monitorada por meio de dosagem hormonal acompanhada ou não de ultrassonografia.

Após a realização da EOC, é realizada a aspiração dos folículos ovarianos, a qual é tipicamente realizada por laparoscopia ou laparotomia, mas pode-se também utilizar a aspiração folicular guiada por ultrassom (Rodríguez et al., 2009).

Fecundação in vitro (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

A inseminação dos oócitos pode ser feita por FIV ou ICSI, dependendo da qualidade do sêmen disponível. Para realização de FIV, os espermatozoides são preparados a uma concentração que varia de acordo com a espécie, desde 100×10^3 - 200×10^3 espermatozoides/ml para macacos japoneses (*M. fuscata*; Torii et al., 2000) até 20×10^6 espermatozoides/ml para macaco-rhesus (*M. mulatta*; Ramsey e Hanna, 2019). Após o preparo, os espermatozoides são ativados em solução contendo 1 mM de dibutilil adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e 1 mM de cafeína (Boatman e Bavister, 1984). Os oócitos são então co-incubados com os espermatozoides para permitir a fertilização.

A ICSI pode ser utilizada em casos de baixa qualidade espermática ou número reduzido de espermatozoides disponíveis, além de sua possível aplicação para transgênese mediada por ICSI (ICSI-Tr) (Takahashi et al., 2014). Os espermatozoides podem ou não ser ativados antes da ICSI, dependendo do protocolo utilizado. Após o preparo da amostra, os espermatozoides são diluídos em uma gota contendo polivinilpirrolidona (PVP) a 10% para reduzir a motilidade (Sutovsky et al., 1996; Hewitson et al. 1998; Takahashi et al., 2014).

Inseminação artificial

Para realização da inseminação artificial é necessário determinar o dia da ovulação, utilizando um dos métodos discutidos anteriormente. A inseminação artificial pode ser feita com sêmen fresco ou criopreservado e o depósito da amostra de sêmen, de modo geral, é feito dentro do útero, o que pode ser realizado por via transcervical ou transabdominal guiada por ultrassom (Wolf, 2009).

Microinjeção para edição gênica

Uma das formas de gerar modelos para pesquisa biomédica é a edição gênica de embriões para produção de indivíduos com determinada mutação gênica de interesse. De acordo com revisão recente (Kang et al., 2019), existem diversos sistemas para edição gênica, dentre os quais incluem-se *AAV vectors* (do inglês, *adeno-associated virus* ou vetores virais adeno-associados), ZFNs (do inglês, *zinc finger nucleases* ou nucleases dedos de zinco), TALEN (do inglês, *transcription activator-like effector nucleases* ou efetor tipo-ativador de transcrição nucleases) e CRISPR-Cas9 (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Regions* ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associada à proteína Cas 9). Uma das ferramentas mais proeminentes atualmente é o sistema CRISPR-Cas 9, uma técnica promissora que está em constante evolução (Kang et al., 2019).

Os trabalhos de edição gênica em PNHs tem sido realizados em macaco-cynomolgus (*M. fascicularis*), macaco-rhesus (*M. mulatta*) e sagui-de-tufos-brancos (*C. jacchus*) (Kang et al., 2019; Park e Silva, 2019).

Biopsia embrionária

Em PNHs, a biopsia embrionária é realizada no estágio de blastocisto expandido, após a formação da massa intracelular e trofotoderme, semelhantemente à técnica utilizada em embriões humanos (Ayoama e Kato, 2020). Utiliza-se equipamento de micromanipulação para obter-se uma pequena amostra da trofotoderme do embrião. É possível realizar a análise genética das amostras para verificar a presença ou ausência de alterações genéticas (Ayoama e Kato, 2020).



Criopreservação de embriões

Conforme descrito para macaco-rhesus (*M. mulatta*), os embriões podem ser criopreservados no estágio de blastocisto de forma que possam ser transferidos posteriormente para uma fêmea receptora (Ramsey e Hanna, 2019). Podem-se utilizar meios de congelamento comerciais para embriões humanos, seguindo o protocolo do fabricante (Ramsey e Hanna, 2019).

Transferência de embriões (TE)

A TE é uma TRA essencial para gerar prole a partir de embriões produzidos *in vitro* (Sankai, 2000). Devem-se utilizar receptoras sincronizadas com o estágio do embrião. A sincronização é feita por monitoramento do ciclo ovariano para determinação do dia da ovulação (Sankai, 2000) ou por meio de manipulação hormonal associada ao monitoramento da atividade ovariana (Takahashi et al., 2014). A TE pode ser feita por via transcervical (não cirúrgica) (Takahashi et al., 2014), por laparoscopia ou por mini-laparotomia (Wolf, 2004).

Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação pode ser feito de diversas formas, incluindo não observação de ciclicidade (primatas do velho mundo), dosagem hormonal (principalmente gonadotropina coriônica – CG) no sangue ou na urina, palpação abdominal e ultrassonografia (Tardif et al., 2012).

Enxerto de gônadas

O objetivo principal dessa técnica é preservar a fertilidade em indivíduos, sejam pré-púberes ou adultos, que necessitam passar por tratamento de câncer, o que pode culminar em infertilidade. As gônadas são removidas antes do tratamento, criopreservadas e reintroduzidas no futuro. Vários trabalhos demonstraram que a técnica é possível em primatas não-humanos, tanto machos, como fêmeas (Jahnukaine et al., 2012; Fayomi et al., 2019; Lee et al., 2004). A técnica também pode ser aplicada para transplantes alôgenos de tecido ovariano em mulheres com insuficiência ovariana prematura (Feichtinger et al., 2018).

Clonagem

Em se tratando de modelos animais para estudos biomédicos, a clonagem pode ser uma ferramenta importante para obtenção de PNHs genética e fisiologicamente uniformes (Liu et al., 2018). O primeiro relato de clonagem em PNHs descreve a clonagem por meio de transferência nuclear de blastômeros isolados de um único embrião (8-16 células) para oócitos enucleados. Essa técnica permite a geração de vários embriões idênticos a partir de um único embrião (Meng et al., 1997). Embora essa técnica também seja um tipo de clonagem, a técnica clássica, realizada por meio da transferência nuclear de células somáticas – utilizada para gerar a famosa ovelha “Dolly” (Wilmut et al., 1997) – foi descrita pela primeira vez em PNHs somente em 2018 (Liu et al., 2018). Em 2019, o mesmo grupo descreveu a combinação das técnicas de edição gênica e clonagem para gerar clones editados (Liu et al., 2019), demonstrando a habilidade de gerar uma linhagem geneticamente uniforme de primatas com determinada mutação gênica para estudos biomédicos.

Conclusões

Os estudos apresentados nesta revisão mostram a evolução das técnicas de reprodução assistida e suas diferentes aplicações. Particularmente, os estudos de edição gênica e clonagem citados acima representam um grande avanço na utilização combinada de diversas técnicas de reprodução assistida para geração de modelos biomédicos para doenças humanas, demonstrando o papel fundamental que as TRAs em PNHs desempenham para avanços científicos no que diz respeito à saúde humana.

Referências

Ayoama N, Kato K. Trophoctoderm biopsy for preimplantation genetic test and technical tips: a review. *Reprod Med Biology*, v.19, n.3, p.222-231, 2020.



- Boatman DE, Bavister BD.** Stimulation of rhesus monkey sperm capacitation by cyclic nucleotide mediators. *J Reprod Fertility*, v.71, p.357-366, 1984.
- Butler TM, Brown BG, Dysko RC, Ford EW, Hoskins DE, Klein HJ, Levin JL, Murray, KA, Rosengberg DP, Southers JL, Swensen RB.** Medical Management. In: Bennett BT, Abec CR, Henrickson R. (Ed.). *Nonhuman primates in biomedical research: biology and management*. San Diego: Academic Press, 1995. p.255-334.
- Carvalho FM.** *Criopreservação de sêmen de primatas não-humanos*. 2016. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Dixson AF.** Primate sexuality: comparative studies of the prosimians, monkeys, apes, and human beings. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2012. 785p.
- Dong Q, Rodenburg SE, Huang C, Vandervoort CA.** Cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) epididymal spermatozoa before and after refrigerated storage. *Journal of Andrology*, v.29, n.3, p.283-292, 2008.
- Fayomi AP, Peters K, Sukhwani M, Valli-Pulaski H, Shetty G, Meistrich ML, Houser L, Robertson N, Roberts V, Ramsey C, Hanna C, Hennebold JD, Dobrinski I, Orwig KE.** Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science*, v.363, n.6433, p.1314-1319, 2019. doi:10.1126/science.aav2914.
- Feichtinger M, Barnea ER, Nyachio A, Brannstrom M, Kim, SS.** Allogenic ovarian transplantation using immunomodulator preimplantation factor (PIF) as monotherapy restored ovarian function in olive baboon. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.35, n.1, p.81-89, 2018. doi: 10.1007/s10815-017-1051-y.
- Feradis AH, Pawitri D, Suatha IK, Amin MR.** Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol*, v.30, n.2, p.100-106, 2001.
- Friedman H, Ator N, Haigwood N, Newsome W, Allan JS, Golos TG, Kordower JH, Shade RE, Goldberg ME, Bailey MR, Bianchi P.** The critical role of nonhuman primates in medical research. *Pathogens and Immunity*, v.2, n.3, p.352-365, 2017.
- Fortman JD, Hewett TA, Bennett BT.** *The laboratory nonhuman primate*. Boca Raton: CRC Press LLC, 2002. 259 p.
- Gould KG, Warner H, Martin, D. E.** Rectal probe electroejaculation of primates. *J Med Primatology*, v.7, p.213-222, 1978.
- Groves CP.** Order Primates. In: Wilson DE, Reeder DM (Ed.). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 3. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. p.111-184.
- Hewitson L, Takahashi D, Dominko T, Simerly C, Schatten G.** Fertilization and embryo development to blastocysts after intracytoplasmic sperm injection in the rhesus monkey. *Human Reproduction*, v.13, n.12, p.3449-3455, 1998.
- Jahnukainen K, Ehmcke J, Nurmio M, Schlatt S.** Autologous ectopic grafting of cryopreserved testicular tissue preserves the fertility of prepubescent monkeys which receive a sterilizing cytotoxic therapy. *Cancer Res*, v.72, n.20, p.5174-5178, 2012.
- Kang Y, Chu C, Wang F, Niu Y.** CRISPR/Cas9-mediated genome editing in nonhuman primates. *Disease Models and Mechanisms*, v.12, n.10, 2019.
- Lee DM, Yeoman RR, Battaglia DE, Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB, Fanton JW, Wolf DP.** Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature*, v.428, p.137-138, 2004.
- Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang C, Xu Y, Zhang X, Lu Y, Wang Z, Poo M, Sun Q.** Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell* v.172, n.4, p.881-887, 2018.
- Liu Z, Cai Y, Liao Z, Xu Y, Wang Y, Wang Z, Jiang X, Li Y, Lu Y, Nie Y, Zhang X, Li C, Bian X, Poo M, Chang HC, Sun Q.** Cloning of gene-edited macaque monkey by somatic cell nuclear transfer. *National Science Review*, v.6, p.101-108, 2019.
- Martinez G, Garcia C.** Sexual selection and sperm diversity in primates. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.518, p.1-25, 2020.
- Meng L, Ely JJ, Stouffer RL, Wolf DP.** Rhesus monkeys produce by nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, v.57, p.454-459, 1997.
- Park JE, Silva AC.** Generation of genetically engineered non-human primate models of brain function and neurological disorders. *Am J Primatology*, v.81, n.2, p.e22931, 2019.
- Ramsey C, Hanna C.** In vitro culture of rhesus macaque embryos. In: Herrick J (Ed.). *Comparative Embryo Culture: methods in molecular biology*. New York: Humana, v.2006, 2019, p.341-352



https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0_23

Rodriguez NA, Si W, Emmi AM, Layman LC, Eroglu A. Retrieval of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) oocytes by ultrasound-guided needle aspiration: problems and solutions. *Mol Rep Dev*, v.76, n.9, p.890-896, 2009.

Sankai T. In vitro manipulation of nonhuman primate gametes for embryo production and transfer. *Experimental Animals*, v.49, n.2, p.69-81, 2000.

Stouffer RL, Wolf DP. Evaluation of the vervet (*Chlorocebus aethiops*) as a model for the assisted reproductive technologies. *Am J Primatology*, v.69, p.1-13, 2007.

Stouffer RL, Woodruff TK. Nonhuman primates: a vital model for basic and applied research on female reproduction, prenatal development, and women's health. *ILAR Journal*, v.58, n.2, p.281-294, 2017.

Stouffer RL, Zelinski-Wooten M. Overriding follicle selection in controlled ovarian stimulation protocols: quality vs quantity. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.2, p.1-12, 2004.

Sutovsky P, Hewitson L, Simerly CR, Tengowski MW, Navara CS, Haavisto A, Schatten G. Intracytoplasmic sperm injection for rhesus monkey fertilization results in unusual chromatin, cytoskeletal, and membrane events, but eventually leads to pronuclear development and sperm aster assembly. *Human Reproduction*, v.11, n.8, p.1703-1712, 1996.

Takahashi T, Hanazawa K, Inoue T, Sato K, Sedohara A, Okahara J, Suemizu H, Yagihashi C, Yamamoto M, Eto T, Konno Y, Okano H, Suematsu M, Sasaki E. Birth of healthy offspring following ICSI in *in vitro*-matured common marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes. *PLoS ONE*, v.9, n.4, p.e95560, 2014.

Tardif S, Carville A, Elmore D, Williams LE, Rice K. Reproduction and breeding of nonhuman primates. In: Abee CR, Mansfield K, Tardif S, Morris T (Ed.). *Nonhuman primates in biomedical research*. Elsevier Inc, 2012. p.197-249.

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

Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.

Wilton LJ, Marshall VS, Piercy EC, Moore HDM. In vitro fertilization and embryo development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Repro Fertil*. v.97, p.481-486, 1993.

Wolf DP. Assisted reproductive technologies in rhesus macaques. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.2, n.37, 2004. Disponível em: < <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-2-37>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

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

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*). *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, v.36, n.1, 1997.
