

## BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO SOB A PERSPECTIVA DOS MACHOS DE PRIMATAS NEOTROPICAIS: CONTRIBUIÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO

*(Reproduction biotechnologies for neotropical primate males and contributions to the conservation of endangered species)*

Danuzia Leite LEÃO<sup>1,2\*</sup>; Wlaila Vasconcelos SAMPAIO<sup>1,3,4</sup>; Helder Lima de QUEIROZ<sup>2</sup>; Sheyla Farhayldes Souza DOMINGUES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia (UFPA). BR 316 Km 61, Castanhal/PA. CEP: 68.740-970; <sup>2</sup>Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé/AM; <sup>3</sup>UFRA, Campus de Parauapebas; <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal da Amazônia (UFRA). \*E-mail: [danleao.88@gmail.com](mailto:danleao.88@gmail.com)

### RESUMO

As biotecnologias da reprodução animal são uma alternativa para a conservação *ex situ* de espécies de primatas neotropicais ameaçados de extinção, e também podem ser utilizadas como uma ferramenta para o estudo da sua biologia reprodutiva. O entendimento dos mecanismos pré/pós copulatórios e pós-fertilização em primatas neotropicais podem auxiliar no sucesso do estabelecimento de protocolos de criopreservação seminal, visto que são necessários estudos de acordo com as especificidades fisiológicas de cada espécie. No intuito de realizar uma reflexão a acerca do papel do macho no tocante as biotecnologias da reprodução, esta revisão busca destacar os avanços e perspectivas a esse respeito, bem como as principais particularidades no tocante a manipulação do sêmen desses animais, visando uma reflexão acerca de melhorias de protocolos já estabelecidos, e fornecer uma referência para estudos futuros em primatas neotropicais.

**Palavras-chave:** Reprodução, Criopreservação, Sêmen, Primatas do Novo Mundo.

### ABSTRACT

The biotechnologies of animal reproduction are an alternative for the *ex situ* conservation of neotropical primates in some degree threatened with extinction, and could also be used as a tool for the study of reproductive biology. Understanding the pre / post copulatory and post-fertilization mechanisms in neotropical primates can help in the successful establishment of seminal cryopreservation protocols, since studies are necessary according to the physiological specificities of each species. In order to reflect on the role of the male in the reproductive biotechnologies, this review aim to highlight the advances and perspectives, as well as the main particularities with the manipulation of the semen in this animals, aiming at a reflection of improvements to already established protocols, and provide a reference for future studies in neotropical primates.

**Key words:** Reproduction, Cryopreservation, Semen, New World Primates.

### INTRODUÇÃO

Atualmente, de um total de 171 espécies de primatas neotropicais, 63% das espécies encontram-se com sua população em declínio, e 36% delas estão listadas como ameaçadas de extinção, segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (do inglês *International Union for Conservation of Nature – IUCN*, ESTRADA *et al.*, 2017). E dentre as 25 espécies de primatas não-humanos mais ameaçadas do mundo, seis são neotropicais e três são brasileiras, o sauím-de-coleira (*Saguinus bicolor*), o sauí-da-serra-escuro (*Callithrix aurita*) e o bugio-marrom (*Alouatta guariba*) (SCHWITZER *et al.*, 2019).

A conservação de primatas não-humanos é uma ferramenta de extrema importância, que pode ser alcançada por meio da adoção de várias estratégias, como a sua proteção em seus habitats naturais (*in situ*), pela sua manutenção em condições adequadas em ambientes artificiais, como o cativeiro, em criatórios conservacionistas ou instalações de pesquisas bem como pela formação de bancos de gamoplasma animal (*ex situ*) (DOMINGUES e CALDAS-BUSSIÈRE, 2006). Neste tipo de estratégia, gametas podem ser utilizados em programas de biotecnologia da reprodução, como a criopreservação seminal aliada à fecundação *in vitro*, visando a geração de novos indivíduos que possam ser introduzidos em ambiente natural, recuperando populações que tenham sido localmente ou completamente extintas.

Sabe-se que uma importante limitação para o sucesso no uso do sêmen de primatas Neotropicais em biotécnicas da reprodução, como o gênero *Saimiri* e *Sapajus*, é a consistência coagulada do sêmen ejaculado, que ocorre em diferentes graus ou intensidades (DIXON e ANDERSON, 2002). Após a ejaculação, o coágulo seminal não se liquefaz espontaneamente, sendo necessário o uso, *in vitro*, de soluções tampões para a recuperação dos espermatozoides (OLIVEIRA *et al.*, 2016; ARAKAKI *et al.*, 2019b). No entanto, os protocolos utilizados ainda apresentam limitações, visto que se observa uma queda na qualidade espermática após a liquefação total do coágulo seminal (OLIVEIRA *et al.*, 2010), ou é obtida apenas uma liquefação parcial do coágulo (ARAKAKI *et al.*, 2019b; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A criopreservação seminal é uma das biotécnicas mais importantes para viabilização da reprodução assistida de primatas. Ela possui como objetivo congelar o espermatozoide, reduzindo reversivelmente a sua atividade metabólica por meio do frio (THURSTON *et al.*, 2002). Essa biotécnica envolve uma série de etapas sequenciais (diluição, resfriamento, adição de crioprotetor e congelamento/descongelamento), que irão determinar o sucesso desse processo (DONG *et al.*, 2000). Em primatas neotropicais, a criopreservação seminal já foi descrita nas famílias Atelidae (SILVA *et al.*, 2013), Cebidae (LEÃO *et al.*, 2015) e Callitrichidae (ARAKAKI, *et al.*, 2018).

Desta forma, entende-se que, para que se obtenha sucesso nas biotécnicas da reprodução que envolvam o macho de primatas Neotropicais, são necessários estudos preliminares desenhados de acordo com a especificidades fisiológicas de cada espécie considerada. Assim, o objetivo desta revisão é reunir em linhas gerais, informações acerca do que se tem desenvolvido em primatas neotropicais acerca das biotecnologias da reprodução animal, visando o macho da Ordem Primatas, considerando os avanços e perspectivas nas pesquisas e suas particularidades.

## DESENVOLVIMENTO

### Seleção sexual e suas implicações na reprodução de primatas neotropicais

Em 1859 o naturalista Charles Darwin revolucionou o campo das Ciências Biológicas ao oferecer evidências científicas que ajudaram a explicar os mecanismos de seleção natural, uma formulação que culminou na criação do que hoje conhecemos como “*Teoria da Evolução*”. No decorrer das suas pesquisas e observações, ao se deparar com o mandril (*Mandrillus sphinx*), Darwin ficou intrigado com as cores exageradas de azul e vermelho que circundam a boca e o focinho de machos adultos. Em um primeiro momento foi difícil explicar como um atributo tão

exagerado, e aparentemente sem utilidade, poderia favorecer diretamente a sobrevivência da espécie. Para solucionar esse enigma, ele propôs que essa seria uma característica sexual secundária que influencia na escolha da fêmea por parceiros reprodutivos, sendo um importante mecanismo de seleção sexual. Anos mais tarde, Fisher (1920, 1930) criou os princípios fundamentais da Seleção Sexual, na década de 1970 essa temática ganhou força com a mudança de visão sobre os papéis dos machos e das fêmeas no processo evolutivo, e o universo da primatologia não ficou de fora desta nova maneira de entender o comportamento e a ecologia das espécies (PAUL, 2002).

De um modo geral, os primatas são conhecidos pelo seu dimorfismo sexual marcante. Os machos tendem a apresentar tamanho corporal e dos caninos maior que os das fêmeas. Mas também são notadas variações interespecíficas em algumas das características sexuais dos machos, como o tamanho relativo dos testículos e a morfologia espermática (DIXSON, 1998, 2012). Essas diferenças sexuais parecem ter evoluído sobre a influência da seleção sexual e explicam aspectos da biologia, anatomia e fisiologia reprodutiva (KAPPELER e VAN SCHIK, 2004; DIXSON, 2012) que discutiremos a seguir.

Pode-se, de uma forma geral, dividir os mecanismos de seleção sexual em pré-copulatórios, pós-copulatórios e pós-fertilização. Os pré-copulatórios determinam a variação do sucesso da cópula, e estão relacionados à competição macho-macho pelo acesso à fêmea, bem à escolha do parceiro de cópula pela fêmea. Os mecanismos pós-copulatórios resultam na variação do sucesso da fertilização, e estão relacionados com a competição entre espermatozoides de machos rivais para fertilização do oócito e na seleção de espermatozoides de diferentes machos pelo trato reprodutor da fêmea (escolha críptica da fêmea). E, por fim, os mecanismos pós-fertilização estão relacionados com a seleção de zigotos, embriões ou até mesmo dos filhotes, que resulta na sobrevivência diferencial da prole, também determinada pela fêmea (PIAZZARI e PARKER, 2009).

Podemos destacar, dentre os mecanismos pré-copulatórios, a rivalidade de resistência, que nos machos consiste em permanecer reprodutivamente ativo por longos períodos (PAUL, 2002). Como, por exemplo, o que é relatado para o gênero de primatas amazônicos *Saimiri*, cuja reprodução é sazonal. Nestes primatas, os machos alfas são os primeiros a exibirem e os últimos a saírem de uma condição de engorda sazonal (BALDWIN, 1968) que está aparentemente relacionada com a espermatogênese (DUMOND e HUTCHINSON, 1967) e com a preferência das fêmeas na escolha parceiros de cópulas (STONE, 2014). O que sugere que o maior tempo ativo reprodutivamente aumenta as chances de fertilização, como observado em outras espécies de primatas (PAUL, 2002). O oposto também ocorre, resultando na supressão da função gonadal de rivais por mecanismos sociais e endocrinológicos, conforme observado entre os calitriquídeos (BALDWIN, 1968). Portanto, os mecanismos pré-copulatórios podem repercutir no sucesso de uma biotécnica, e entender essas particularidades no nível de gênero/espécie se faz necessário para otimizar o manejo reprodutivo e biotécnicas da reprodução.

Em primatas a seleção sexual pós-copulatória via competição espermática é fortemente influenciada pelo sistema de acasalamento (DIXSON, 2018). Uma das características dessa competição espermática é a ocorrência de testículos proporcionalmente maiores em relação ao peso corporal nas espécies que possuem sistemas de acasalamento em que as fêmeas copulam com mais de um macho. Essa adaptação morfológica permitiu a

acomodação de um volume maior de túbulos seminíferos, necessário para sustentar a espermatogênese em níveis ideais, e que está também relacionada com a seleção de um ciclo mais curto do epitélio seminífero, proporcionando taxas mais rápidas de espermatogênese (DIXSON, 1987, 1995a; KAPPELER, 1997).

No nível dos gametas, a competição espermática favoreceu o aparecimento de espermatozoides mais longos e velozes (GOLMENDIO e ROLDAN, 2008) e de peças intermediárias com maior volume (DIXSON e ANDERSON, 2002). Nos primatas existe uma correlação positiva entre o tamanho relativo dos testículos com o volume da peça intermediária dos seus espermatozoides, em espécies que vivem em sistemas de acasalamento em que as fêmeas copulam com mais de um macho (DIXSON e ANDERSON, 2002; 2005). Isso significa que, nos machos de espécies de primatas com os testículos proporcionalmente maiores (com maior probabilidade de se envolver na competição espermática), seus espermatozoides tendem a apresentar peças intermediárias também maiores. Isto se dá porque a carga mitocondrial e a produção de energia são aumentadas nessas condições (DIXSON, 2018), como já observados em estudo comparativo com humanos e chimpanzés (ANDERSON *et al.*, 2007), e com macacos Rhesus (ZHOU *et al.*, 2015).

A seleção sexual pós-copulatória também parece ter representado uma das forças seletivas atuando na evolução das glândulas reprodutivas acessórias de primatas neotropicais. Espécies que apresentam sistemas de acasalamento do tipo multimacho/multifêmea (como nos gêneros *Ateles*, *Brachyteles*, *Cebus*, *Lagothrix* e *Saimiri*), em que as fêmeas copulam com mais de um macho por estação reprodutiva, as vesículas seminais tendem a ser proporcionalmente muito grandes. Enquanto que, em espécies monogâmicas (como nos gêneros *Aotus*, *Callicebus*, *Callithrix*, *Pithecia* e *Saguinus*), em que as fêmeas copulam com um ou poucos machos por estação reprodutiva, estas vesículas tendem a ser significativamente menores (DIXON, 1998). As espécies monogâmicas *Pithecia pithecia* e *Callicebus torquatus* apresentam apenas vestígios das vesículas seminais, sugerindo que a seleção natural tenha favorecido a redução das vesículas em condições em que a cópula ocorre com menos frequência, e em que a necessidade de um maior volume de ejaculação seja reduzida (DIXON, 1998). As frequências ejaculatórias também são significativamente mais baixas nos gêneros de primatas monogâmicos/poliginicos do que naqueles que apresentam sistemas de acasalamento multimacho-multifêmea (DIXSON, 1995b; ANDERSON e DIXSON, 2009). De modo que tanto o volume seminal quando o sucesso na colheita de sêmen por uma biotécnica da reprodução pode ser influenciado por mecanismos de seleção sexual inerentes a uma espécie.

Um dos produtos secretados pelas vesículas seminais são as seminogelinas, proteínas responsáveis pelo processo que resulta na coagulação do sêmen. O grau ou intensidade desta coagulação pode variar de um estado fluido não gelatinoso (grau de coagulação seminal 1), como observado em *Calithrix*, um gênero monogâmico, até um estado máximo de solidificação (grau de coagulação seminal 4), que é observado no sêmen de macacos-aranhas, macacos-prego e muriquis, cujos sistemas de acasalamento são do tipo multimacho/multifêmea (DIXSON e ANDERSON, 2002). O papel evolutivo do coágulo seminal vem sendo estudado nas últimas décadas.

Em *Ateles geoffroyi* o coágulo seminal aparentemente forma um tampão na vagina da fêmea que promove a passagem de espermatozoides altamente móveis e lineares através do colo do útero, além de tamponar o pH e aumentar a temperatura da vagina, efeito que pode

contribuir para sobrevivência dos espermatozoides. Em adição a isso, uma outra hipótese é que o tampão copulador pode obstruir a deposição de sêmen e o transporte de espermatozoides de um segundo macho, resultando em importantes consequências sobre a competição de espermatozoides entre machos rivais (HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2008). Em um estudo recente com macacos pregos (*Sapajus apella*), demonstrou-se que a motilidade espermática também foi afetada pelo grau de coagulação, sugerindo que a semínogelina possa ser um precursor do inibidor da motilidade espermática (DE LAMIRANDE, 2007), que é retomada quando o coágulo é liquefeito (LIMA *et al.*, 2017). A coagulação seminal hoje é um desafio para manipulação do sêmen de primatas neotropicais (LIMA *et al.*, 2017), estudos sobre o processo de coagulação e como afeta os espermatozoides tanto *in vitro* quanto *in vivo* são fundamentais para aperfeiçoar técnicas como IA, FIV e criopreservação de sêmen, que necessitam de sêmen liquefeito para que seja possível a recuperação de uma quantidade viável de espermatozoides.

A morfologia peniana também parece ser influenciada pela seleção sexual, de modo que o pênis pode ser visto como um “dispositivo de corte interno” que estimula respostas e facilita o transporte de espermatozoides no trato reprodutor da fêmea (EBERHARD, 1996). Esta visão pode ser reforçada por um estudo realizado com mais de 30 espécies de primatas, e que demonstrou que os primatas com sistemas de acasalamento do tipo multimacho-multifêmea e do tipo disperso (ou não-gregário) apresentaram morfologias penianas significativamente mais complexas do que as espécies monogâmicas e poligínicas (como *Callimico* e *Leontopithecus*) (DIXSON, 1987). Existem também correlações marcantes entre a ocorrência do alongamento do báculo, um maior tamanho relativo dos testículos e a maior frequência dos padrões copulatórios que envolvem a intromissão peniana prolongada (e/ou a manutenção da intromissão após a ocorrência da ejaculação) com os sistemas de acasalamento das espécies. Estas são todas características de espécies que apresentam sistemas de acasalamento poligâmicos (DIXSON, 1987, 2012; DIXSON *et al.*, 2004a). Portanto, estas adaptações parecem fazer parte de um conjunto de especializações para um contexto de competição de espermatozoides e/ou de escolha críptica da fêmea, que podem influenciar taxas fecundação durante a cópula

Ainda há muito a ser explorado para que possamos entender melhor como a seleção sexual afeta traços reprodutivos de primatas. Mas este é um passo fundamental para compreender aspectos da fisiologia reprodutiva das espécies e, conseqüentemente, otimizar o seu manejo reprodutivo, aperfeiçoar a seleção de indivíduos dos plantéis e manter o desenvolvimento de biotécnicas de reprodução.

### **Obtenção e manipulação do sêmen de primatas neotropicais**

Os métodos de coleta de sêmen mais difundidos para aplicação em primatas neotropicais são a vibroestimulação peniana e eletroestimulação (MARTINEZ e GARCIA, 2020). Entretanto, outros métodos já foram descritos anteriormente, como a lavagem vaginal em *Callithrix jacchus* (MORRELL, 1997) e a extração do epidídimo, em *Aotus lemurinus* e *Saimiri boliviensis* (NAKAZATO *et al.*, 2015) e *Callithrix jacchus* (O'BRIEN *et al.*, 2003). Vale ressaltar que o método de coleta escolhido vai sempre depender da praticidade e viabilidade, além da espécie-alvo e da situação que os animais se encontram, seja em vida

livre ou em cativeiro.

A eletroestimulação pode ser feita por meio de eletrodos penianos e sonda retal, sendo que ambas as técnicas já foram descritas em primatas Neotropicais. A eletroestimulação peniana consiste na estimulação elétrica direta do pênis do animal contido em uma cadeira adaptada sem que haja necessidade do uso de contenção química (YEOMAN *et al.*, 1998), e já foi descrita em apenas duas espécies Neotropicais, *Callithrix jacchus* (sagui-do-tufo-braco; SCHNEIDERS *et al.*, 2004) e *Saimiri sciureus* (macaco-de-cheiro; YEOMAN *et al.*, 1998). Entretanto, essa técnica requer um condicionamento prévio dos animais à cadeira de contenção e manipulação (contenção física) (VANDEVOORT, 2004), inviabilizando, desta forma, o seu uso em animais de vida livre. Por outro lado, a eletroestimulação por sonda retal é uma técnica já descrita em estudos com *Alouatta caraya* (CARVALHO *et al.*, 2018), *Sapajus apella* (LEÃO *et al.*, 2015), *Ateles geoffroyi* (SILVA *et al.*, 2013) e para diferentes espécies do gênero *Saimiri* (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Os protocolos definidos para a aplicação de estímulos elétricos variam entre as espécies. Na coleta seminal de *S. sciureus* foram alcançados bons resultados utilizando o intervalo de voltagem de 0,95-1,15 volts, obtendo tempo médio para ejaculação entre 2 e 3 minutos (LANG, 1967). Em *A. geoffroyi* foram aplicados estímulos de 1 volt e 10mA até 7 volts e 100mA, aumentado 1 volt a cada 2 ou 3 tentativas sucessivas, além de estimulação manual do pênis (HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2002). Estímulos de 0 a 8 volts, com aumentos subsequentes de 0,5 volt a cada série de 30 estímulos que duravam cerca de 2 a 3 segundos com intervalo de 1 a 2 segundos, foram utilizados em para *A. caraya* (CARVALHO *et al.*, 2014) e em *Brachyteles arachnoides* (ARAKAKI *et al.*, 2019b).

Em *Sapajus apella*, Barnabe *et al.* (2002) descreveram um protocolo no qual foram realizadas 5 séries de 20 estímulos cada, em uma progressão de intensidade, de 50 a 300mA. Contudo, Oliveira *et al.* (2011) e Leão *et al.* (2015;2017) demonstraram a indução da ejaculação com estímulos que variaram de 12,5mA a 100mA, com intervalos de 30 segundos entre cada série de estímulos, sendo possível obter frações de sêmen líquidas e coaguladas.

Outro método comumente adotado, a vibroestimulação peniana, é um procedimento que fornece ejaculação por meio da aplicação de vibração ao pênis de um indivíduo contido, não havendo a necessidade de contenção química. Aparentemente essa técnica apresenta uma frequência menor de obtenção de coágulo seminal, quando comparada à eletroestimulação (YEOMAN *et al.*, 1998), além de exibir um maior número de espermatozoides móveis no ejaculado obtido (MARTINEZ e GARCIA, 2020). Essa técnica já foi descrita em estudos com *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* (ARAKAKI *et al.*, 2018), *Saguinus leucopus* (POCHES *et al.*, 2013) e *Saimiri boliviensis* (YEOMAN *et al.*, 1998).

Como mencionado anteriormente, o sêmen de algumas espécies de primatas Neotropicais possui duas frações, uma líquida (Grau I) e uma coagulada (Grau II a IV) (DIXON e ANDERSON, 2002) e apresenta uma coloração que varia de esbranquiçado a amarelado, bem como a opacidade (transparente ao opaco) em estudos com *Sapajus apella* (LEÃO *et al.*, 2015) e espécies do gênero *Saimiri* (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Para que os espermatozoides sejam liberados do coágulo seminal, em geral o sêmen precisa passar por um período de incubação em meio diluidor a 37 °C por 30 a 60min (OLIVEIRA *et al.*, 2016;

ARAKAKI *et al.*, 2019b).

Recentemente, Martinez e Garcia (2020) verificaram a alta heterogeneidade nos parâmetros seminais dos ejaculados de primatas não-humanos, concluindo que ela pode ser em parte atribuída às limitações dos protocolos aplicados para a análise seminal. No geral, em primatas neotropicais são realizadas as análises macroscópicas (volume, cor, opacidade, grau de coagulação e pH) e microscópica (concentração espermática, motilidade, integridade e funcionalidade de membrana plasmática, morfologia e morfometria espermática).

### **Criopreservação seminal**

Em primatas neotropicais, pesquisas têm buscado desenvolver o melhor protocolo possível para a criopreservação seminal. Dentre elas temos *Saimiri sciureus* (DENIS *et al.*, 1976), *S. collinsi*, *S. vanzolinii*, *S. cassiquiarensis* (OLIVEIRA *et al.*, 2016), *Sapajus apella* (LEÃO *et al.*, 2015), *Alouatta caraya* (CARVALHO, 2016); *Ateles paniscus* e *A. marginatus* (SILVA *et al.*, 2013), *Saguinus labiatus* (SANKAI *et al.*, 1997), *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* (ARAKAKI *et al.*, 2018) e *Leontopithecus chrysomelas* (ARAKAKI *et al.*, 2019a).

Os diluentes já utilizados em primatas neotropicais são a base de TES-TRIS (O'BRIEN *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014), TES e BotuBOV® (ARAKAKI *et al.*, 2018), água de coco *in natura* (OLIVEIRA *et al.*, 2011), à base de água de coco em pó (ACP-118®; OLIVEIRA *et al.*, 2011; 2015; 2016ab; LEÃO *et al.*, 2015) e meio Biggers-Whitten-Whittingham (ARAKAKI *et al.*, 2019b). O efeito do diluente sobre a qualidade espermática, desde as etapas de liquefação seminal até o resfriamento, pode determinar a capacidade fecundante dos espermatozoides pós-descongelamento. Vale ressaltar que, em primatas neotropicais, a criopreservação convencional é do tipo lenta, com taxas que variam durante o resfriamento de -0,3 °C/min (OLIVEIRA *et al.*, 2011; 2015; 2016ab; LEÃO *et al.*, 2015) a -0,2 °C/min (ARAKAKI *et al.*, 2018; 2019a), e aplicando uma curva de congelamento com duração média de 2 horas, até alcançar 4 °C.

Outra etapa importante no processo de criopreservação seminal é a adição de crioprotetores, tanto penetrantes ou intracelulares quanto não-penetrantes ou extracelulares. Dentre os crioprotetores não-penetrantes, a gema de ovo é mais comumente utilizada (ARAKAKI *et al.*, 2018; LEÃO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016), enquanto que o glicerol é o crioprotetor penetrante de escolha para primatas neotropicais, em concentrações que variam de 1,5% a 8% para macaco-de-cheiro (DENIS *et al.*, 1967; OLIVEIRA *et al.*, 2016), 2,5% a 7% para macaco-prego (OLIVEIRA *et al.*, 2011; LEÃO *et al.*, 2015); 3-4% para bugiu-preto (CARVALHO, 2016), 3% a 6% para sagui-do-tufo-branco (ARAKAKI *et al.*, 2018) e 7% para macaco-aranha (SILVA *et al.*, 2013).

A escolha da concentração de glicerol é determinada de acordo com as características seminais que se quer criopreservar. Em altas concentrações, o crioprotetor exerce efeitos tóxicos sobre os espermatozoides, como a desnaturação das proteínas, alterações nas interações de actina em eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade intracelular pela presença do glicerol, na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos atuando diretamente na membrana plasmática (HOLT, 2000). Esses eventos resultam na desorganização e lesão da membrana plasmática e, conseqüentemente, na perda da motilidade (BURH *et al.*, 2001) e da capacidade fecundante dos espermatozoides (LI *et al.*, 2005). Em primatas

neotropicais, tem sido verificada uma diminuição da qualidade espermática pós-descongelamento, o que demonstra a necessidade de mais pesquisas acerca da melhor concentração de crioprotetor a ser adicionado ao meio diluente para a espécie, no intuito de manter os parâmetros espermáticos pós-descongelamento.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os conhecimentos acerca da biologia reprodutiva e seleção sexuais de primatas neotropicais podem proporcionar avanços nas pesquisas voltadas ao estabelecimento de biotecnologias da reprodução para a conservação *ex situ* desses animais. Atualmente, diversos protocolos de criopreservação seminal tem sido estudado visando a preservação do material genético do macho dessas espécies visando a formação de bancos de germoplasma animal, e no intuito do uso futuramente deste gameta em outros programas de reprodução assistida, como na produção *in vitro* de embriões.

### REFERÊNCIAS

- ANDERSON M.J.; DIXSON, A.F. Sperm competition: mobility and the midpiece in primates. *Nature*, v.416, n.6880, p.496–496, 2002.
- ANDERSON, M.J.; CHAPMAN, S.J.; VIDEAN, E.N.; EVANS, E.; FRITZ, J.; STOINSKI, T.S.; DIXSON, A.F.; GAGNEUX, P. Functional evidence for differences in sperm competition in humans and chimpanzees. *American Journal of Physical Anthropology*, v.134, n.32, p.274–280, 2007.
- ANDERSON, M.J.; DIXSON, A.F. Sexual selection affects the sizes of the mammalian prostate gland and seminal vesicles. *Current Zoology*, v.55, n.1, p.1–8, 2009.
- ANDERSON, M.J.; NYHOLT, J.; DIXSON, A.F. Sperm competition and the evolution of sperm midpiece volume in mammals. *Journal of Zoology*, v.267, n.2, p.135–142, 2005.
- ARAKAKI, P.R.; NICHI, M.; MONTEIRO, F.O.B.; MUNIZ, J.A.P.C.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; VALLE, R.R. Comparison of semen characteristics and sperm cryopreservation in common marmoset (*Callithrix jacchus*) and black-tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*). *Journal of Medical Primatology*, v.48, n.1, p.32–42, 2018.
- ARAKAKI, P.R.; SALGADO, P.A.B.; LOSANO, J.D.A.; GONÇALVES, D.R.; VALLE, R.R.; PEREIRA, R.J.G.; NICHI, M. 2019d. Semen cryopreservation in golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*. *American Journal of Primatology*, v.81, n.12, p.1-7, 2019a.
- ARAKAKI, P.R.; SALGADO, P.A.B.; TEIXEIRA, R.H.F.; FABRÍCIO BRAGA RASSY, F.B.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; VALLE, R.R. Testicular volume and semen characteristics in the endangered southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*). *Journal of Medical Primatology*, v.48, n.4, p.244–250, 2019.



ARAKAKIA, P.R.; LOSANO, J.D.A.; SALGADOB, P.A.B.; PEREIRA, R.J.G. Seasonal effects on testes size and sustained semen quality in captive golden-headed lion tamarins, *Leontopithecus chrysomelas*. *Animal Reproduction Science*, v.2018, n.1, p.1-11, 2020.

BALDWIN, J.D. The social behavior of adult male squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in a seminatural environment. *Folia Primatologica*, v.9, n.3, p.281–314, 1968.

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

BUHR, M.M.; FISER, P.; BAILEY, J.L.; CURTIS, E.F. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *Journal of Andrology*, v.22, p.961–969, 2001.

CARVALHO, F.M. Criopreservação de sêmen de primatas não-humanos. 2016. 173.p. (Tese de Doutorado em Reprodução Animal). Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2016.

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

CARVALHO, F.M.; ARAKAKI, P.R.; NICHI, M.; MUNIZ, J.A.P.C.; DUARTE, J.M.B.; VALLE, R.R. Evaluation of sperm quality in successive regular collections from captive black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Animal Reproduction*, v.11, n.1, p.11–18, 2018.

DE LAMIRANDE, E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v.33, n.4, p.60–68, 2007.

DIXSON, A.F. Copulatory and Postcopulatory sexual selection in Primates. *Folia Primatologica*, v.89, n.3-4, p.258-286, 2018.

DIXSON, A.F. Observations on the evolution of the genitalia and copulatory behaviour in male primates. *Journal of Zoology*, v.213, n.3, p.423–443, 1987.

DIXSON, A.F. *Primate Sexuality: Comparative Studies of the Prosimians, Monkeys, Apes, and Humans*, 2<sup>a</sup> ed., Oxford, Oxford University Press, 2012. 785p.

DIXSON, A.F. Sexual selection and ejaculatory frequencies in primates. *Folia Primatologica*, v.64, n.3, p.146–152, 1995b.

DIXSON, A.F. Sexual selection and the evolution of copulatory behaviour in nocturnal prosimians. In *Creatures of the Dark: The Nocturnal Prosimians* (Alterman L, Doyle GA, Izard MK, eds.), 1<sup>a</sup> ed., New York, Plenum Press, p.93–118, 1995a.

DIXSON, A.F. Sexual selection and the evolution of the seminal vesicles in primates. *Folia Primatologica*, v.68, n.5, p.300–306, 1998.

DIXSON, A.F. *Sexual Selection and the origins of human mating Systems*. Oxford University Press, 2009. 232p.

DIXSON, A.F.; ANDERSON, M.J. Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates. *Folia Primatologica*, v.73, n.2/3, p.63–69, 2002.

DIXSON, A.F.; NYHOLT, J.; ANDERSON, M.J. A positive relationship between baculum length and prolonged intromission patterns in mammals. *Acta Zoologica Sinica*, v.50, n.4, p.490–503, 2004.

DOMINGUES, S.F.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de Primatas Neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.30, n.1/2, p.57-71, 2006.

DONG, Q.; CORREA, L.M.; VANDEVOORT, C.A. Rhesus monkey sperm cryopreservation with TEST-yolk extender in the absence of permeable cryoprotectant. *Cryobiology*, v.58, n.1, p.20-27, 2009.

DUMOND, F.A.; HUTCHISON, T.C. Squirrel monkey reproduction: The “fatted” male phenomenon and seasonal spermatogenesis. *Science*, v.58, n.3804, p.1067–1070, 1967.

EBERHARD, W.G. *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*. 1ª ed., Princeton, NJ: Princeton University Press, 1996. 472p.

ESTRADA, A.; GARBER, P.A.; RYLANDS, A.B.; ROOS, C.; FERNANDEZ-DUQUE, E.; DI FIORE, A.; NEKARIS, K.A.I.; NIJMAN, V.; HEYMANN, E.W.; LAMBERT, J.E.; ROVERO, F.; BARELII, C.; SETCHELL, J.M.; GILLESPIE, T.R.; MITTERMEIER, R.A.; ARREGOITIA, L.V.; GUINEA, M.; GOUVEIA, S.; DOBROVOLSKI, R.; SHANEE, S.; SHANEE, N.; BOYLE, S.A.; FUENTES, A.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; PARRA, G.C.; CERDA-MOLINA, A.L.; PÉREZ-BOLÑANOS, S.C.; DÍAZ SÁNCHEZ, V.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R.. Sperm quality differences between the rainy and dry seasons in captive black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *American Journal of Primatology*, v.57, n.1, p.35–41, 2002.

FISHER, R.A. The evolution of sexual preference. *Eugenics Review*, v.7, n.3, p.184-192, 1915.

GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *International Journal of Developmental Biology*, v.52, n.5/6, p.439–447, 2008.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; CERDA-MOLINA, A.L.; PÁEZ-PONCE, D.L.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. The seminal coagulum favors passage of fast-moving sperm into the uterus in the black-handed spider monkey. *Reproduction*, v.136, n.4, p.411-421, 2008.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. v.136, n.4, p.411-421, 2008.

KAPPELER, P.M. Intra-sexual selection and testis size in strepsirrhine primates. *Behavioral Ecology*, v.8, n.1, p.10–19, 1997.

KAPPELER, P.M.; VAN SCHAIK, C.P. *Sexual selection in primates: new and comparative perspectives*. 1ª ed., Cambridge University Press, 2004. 4p.

KUEDERLING, I.; MORREL, J.M.; NAYUDU, P.L. Collection of semen from marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) for experimental use by vaginal washing. *Laboratory Animals*,

v.30, n.3, p.260-266, 1996.

LANG, C.M. A Technique for the Collection of Semen from Squirrel Monkeys (*Saimiri Sciureus*) by Electro-ejaculation. *Laboratory Animal Care*, v.17, n.2, p.218-221, 1967.

LEÃO, D.L.; MIRANDA, S.A.; BRITO, A.B.; LIMA, J.S.; SANTOS, R.R.; DOMINGUES, S.F.S. Efficacious long-term cooling and freezing of *Sapajus apella* semen in ACP-118®. *Animal Reproduction Science*, v.159, n.1, p.118–123, 2015.

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

LIMA, J.S.; LEÃO, D.L.; OLIVEIRA, K.G.; BRITO, A.B.; SAMPAIO, W.V.; SANTOS, R.R.; QUEIROZ, H.L.; DOMINGUES, S.F. Seminal coagulation and sperm quality in different social contexts in captive tufted capuchin monkeys (*Sapajus apella*). *American Journal of Primatology*, v.79, n.6, p.1-8, 2017.

MACKINNON, K.C.; AMATO, K.R.; MEYER, A.L.S.; WICH, S.; SUSSMAN, R.W.; PAN, R.; KONE, I.; LI, B. Impending extinction crisis of the world's primates: why primates matter. *Science Advances*, v.3, n.1, p.1-17, 2017.

MARTINEZ, G.; GARCIA, C. Sexual selection and sperm diversity in primates. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.18, p.1-25, 2020.

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

NAKAZATO, C.; YOSHIZAWA, M.; ISOBE, K.; KUSAKABE, K.T.; KURAIISHI, T.; HATTORI, S.; MATSUMOTO, H.; FUKUI, E.; KUWAHATA, A.; OCHI, M.; KISO, Y.; KAI, C. Morphological characterization of spermatozoa of the night monkey. *Journal of Mammalian Ova Research*, v.32, n.1, p.37–41, 2015.

O'BRIEN, J.K.; HOLLINSHEAD, F.K.; EVANS, K.M.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M. Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. *Reproduction, Fertility and Development*, v.15, n.7–8, p.367–375, 2003.

OLIVEIRA, K.G.; CASTRO, P.H.G.; MUNIZ, J.A.P.C.; DOMINGUES, S.F.S. Conservação do sêmen e liquefação do coágulo seminal macaco-prego (*Cebus apella*) em água de coco em pó (ACP-118®), em diferentes temperaturas. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.4, n.3, p.617-621, 2010.

OLIVEIRA, K.G.; LEÃO, D.L.; ALMEIDA, D.V.; SANTOS, R.R.; DOMINGUES, S.F.S. Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey *Saimiri collinsi*. *Theriogenology*, v.84, n.5, p.743–749, 2015.

OLIVEIRA, K.G.; MIRANDA, S.A.; LEÃO, D.L.; BRITO, A.B.; SANTOS, R.R.; DOMINGUES, S.F.S. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TESTRIS. *Animal Reproduction Science*, v.123, n.1/2, p.75–80, 2011.

OLIVEIRA, K.G.; SANTOS, R.R.; LEÃO, D.L.; BRITO, A.B.; LIMA, J.S.; SAMPAIO, W.V.; DOMINGUES, S.F.S. Cooling and freezing of sperm from captive, free-living and endangered squirrel monkey species. *Cryobiology*, v.72, n.3, p.283–289, 2016.

PAUL, A. Sexual selection and mate choice. *International Journal of Primatology*, v.23, n.4, p.877-904, 2002.

PIZZARI, T.; PARKER, G.A. Sperm competition and sperm phenotype. In: *Sperm biology*. 1<sup>a</sup> ed., Academic Press, p.207-245, 2009.

POCHES, R.A.; BRIEVA, C.I.; JIMÉNEZ, C. Características seminales del Titi gris (*Saguinus leucopus*) bajo condiciones de cautiverio obtenidas por estimulación vibratoria del pene (EVP), *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e de Zootecnia*, v.60, n.1, p.11-22, 2013.

SANKAI, T.; TERAOKA, K.; YANAGIMACHI, R.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of Reproduction and Fertility*, v.101, n.2, p.273–278, 1994.

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

SCHWITZER, C.; MITTERMEIER, R.A.; RYLANDS, A.B.; CHIOZZA, F.; WILLIAMSON, E.A.; BYLER, D.; WICH, S.; HUMLE, T.; JOHNSON, C.; MYNOTT, H.; MCCABE, G. (eds.). *Primates in Peril: The World's 25 Most Endangered Primates 2018–2020*. IUCN SSC Primate Specialist Group, International Primatological Society, Global Wildlife Conservation, and Bristol Zoological Society, Washington, DC, 2019. 130p.

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

STONE, A.I. Is fatter sexier? Reproductive strategies of male squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *International Journal of Primatology*, v. 5, n.3/4, p.628-642, 2014.

THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; MILEHAM, A.J.; HOLT, W.V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology*, v.22, n.3, p.382–394, 2002.

VANDEVOORT, C.A. High quality sperm for nonhuman primate ART: production and assessment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.2, n.33, p.1-5, 2004.

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

ZHOU T, W.G.; CHEN, M.; ZHANG, M.; GUO, Y.; YU, C.; ZHOU, Z.; SI, W.; SHA, J.; GUO, X. Comparative analysis of macaque and human sperm proteomes: insights into sperm competition. *Proteomics*, v.15, n.9, p.1564–1573, 2015.