

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE DILUIDORES À BASE DE GEMA DE OVO E
DE LECITINA DE SOJA PARA A CONGELAÇÃO DE SÊMEN
DE *Alouatta caraya***

**Fernanda Maria de Carvalho
Médica Veterinária**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DE DILUIDORES À BASE DE GEMA DE OVO E
DE LECITINA DE SOJA PARA A CONGELAÇÃO DE SÊMEN
DE *Alouatta caraya***

Fernanda Maria de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo del Rio do Valle

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

Jaboticabal – SP

Maio de 2012

Carvalho, Fernanda Maria de
C331a Avaliação de diluidores à base de gema de ovo e de lecitina de
soja para a congelação de sêmen de *Alouatta caraya* / Fernanda
Maria de Carvalho. -- Jaboticabal, 2012
ix, 90 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte
Coorientador: Rodrigo del Rio do Valle
Banca examinadora: Paulo Henrique Franceschini, Marcílio Nichi
Bibliografia

1. Bugio. 2. Criopreservação. 3. Espermatozoide. 4. Crioprotetor. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:599.822

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

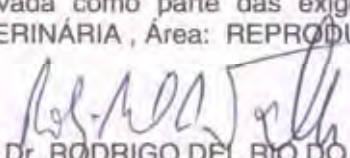
TÍTULO: AVALIAÇÃO DE DILUIDORES À BASE DE GEMA DE OVO E DE LECITINA DE SOJA
PARA A CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE *Alouatta caraya*

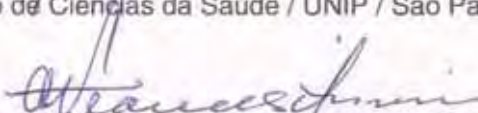
AUTORA: FERNANDA MARIA DE CARVALHO

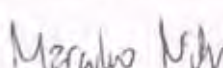
ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RODRIGO DEL RIO DO VALLE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA
VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. RODRIGO DEL RIO DO VALLE
Instituto de Ciências da Saúde / UNIP / São Paulo/SP


Prof. Dr. PAULO HENRIQUE FRANCESCHINI
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MARCILIO NICHÍ
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP / São Paulo/SP

Data da realização: 18 de maio de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDA MARIA DE CARVALHO – nascida em Jaboticabal, SP, no dia seis de novembro de 1982. Coursou Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” entre os anos de 2002 e 2007. Durante a graduação, realizou iniciação científica com bolsa FAPESP (Processo FAPESP 2005/57671-8), na área de nutrição de cães e gatos, sob orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi. Em 2006 realizou estágio curricular obrigatório nas instituições Parque Ecológico de São Carlos “Dr. Antônio Teixeira Vianna”, localizado em São Carlos, SP e Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”, localizado em Sorocaba, SP. Em 2007 participou do Programa CAPES/FIPSE de intercâmbio estudantil de nível superior, coordenado pelo Dr. John B. Malone, por meio do qual realizou estágio na School of Veterinary Medicine da Louisiana State University durante um semestre. Nesse período participou de projetos de pesquisa e conduziu um projeto sob orientação do Dr. Thomas N. Tully Jr., além de cursar disciplina de Geographic Information System (GIS). Em 2008, iniciou trabalho como Médica Veterinária de Campo, em que realizou Levantamento, Monitoramento e Resgate de Fauna durante a instalação de uma Pequena Central Hidrelétrica em São Joaquim da Barra, SP. Teve dois artigos publicados em revistas internacionais, sendo a primeira autora em um deles. Em 2010, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária (Reprodução Animal) nesta Faculdade, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e coorientação do Prof. Dr. Rodrigo del Rio do Valle, com bolsa FAPESP (Processo FAPESP 2009/12906-9).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos primatas não-humanos
que, muitas vezes, são mais humanos do que nós.

AGRADECIMENTOS

ÀS INSTITUIÇÕES

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/Unesp pela minha formação como Médica Veterinária e pelo Mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Mestrado e Reserva Técnica;

Ao Centro Nacional de Primatas (CENP) por fornecer a estrutura e os animais para a realização do meu projeto;

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), por meio da qual foi viabilizado o acesso ao CENP;

Ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da FCAV/Unesp pela estrutura e apoio técnico;

Aos Laboratórios de Andrologia e de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP pela estrutura e apoio técnico e financeiro;

À Lagoa da Serra pelo transporte das minhas amostras de Ananindeua, PA para Sertãozinho, SP;

Ao Instituto “Evandro Chagas”, Ananindeua, PA, pelo empréstimo do microscópio de contraste de fase.

AOS FAMILIARES, PROFISSIONAIS E AMIGOS

Primeiramente aos meus pais e à minha família, pois sem eles eu não estaria aqui. Especialmente à minha mãe, por ir muito além do que é ser Mãe;

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, por ter sido um grande Mestre desde o segundo ano de faculdade, quando realizei estágio no NUPECCE, depois quando cursei sua disciplina de graduação e quando a minha turma da

faculdade decidiu criar o Grupo de Estudo de Animais Selvagens – GEAS Jaboticabal e, finalmente, quando aceitou me orientar no Mestrado e deu apoio à minha escolha de trabalhar com primatas;

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rodrigo del Rio do Valle, por acreditar em meu trabalho desde nosso primeiro contato, quando me candidatei à vaga para trabalhar na PCH Anhanguera e, posteriormente, quando decidimos continuar trabalhando juntos na pesquisa. Também por me mostrar o maravilhoso mundo dos primatas e por ter se tornado um grande amigo;

Ao colaborador e amigo Dr. Marcílio Nichi do Laboratório de Andrologia da FMVZ/USP por toda a ajuda, ensinamentos e apoio do início ao fim do meu projeto;

À médica veterinária Paloma Arakaki, amiga e colaboradora. Sua ajuda foi essencial para a fase inicial do projeto e sua presença muito importante durante os meses em que ficamos longe de nossas famílias, morando no CENP.

Aos estatísticos Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira e Prof. Dr. João Ademir de Oliveira pela ajuda na análise dos resultados do experimento;

Aos amigos Dr. Paulo Henrique Gomes de Castro e Dr. José Augusto Pereira Carneiro Muniz, veterinários do CENP, por todo o apoio pessoal e profissional que prestaram durante minha estadia em Ananindeua, PA;

Ao Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro pela viabilização do meu projeto através da UFRA;

Aos amigos Ayla e Francisco e seus filhos, Laís e Lucas, por terem nos recebido com tanto carinho em sua casa em Belém do Pará e por tudo que fizeram por nós;

Às minhas amigas Gabriella, Vanessa (Plica), Marina (Piçiroca), Thassila e Cláudia por me ouvirem, me aconselharem sempre que precisei e pelos momentos divertidos;

Aos meus colegas e amigos do NUPECCE, especialmente Maurício (Janota), Ellen e Luciana pela convivência e apoio;

Ao diretor do Centro Nacional de Primatas (CENP), Dr. Carlos Faro, por permitir a realização do meu experimento;

Aos funcionários do CENP pela ajuda durante a execução do experimento;

À Dr.^a Maria de Fátima Lima de Assis pela colaboração;

À Prof.^a Dr.^a Valquíria Hyppolito Barnabe, responsável pelo Laboratório de Andrologia da FMVZ/USP e ao Prof. Dr. José Antonio Visintin e à Prof.^a Dr.^a Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, responsáveis pelo Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da FMVZ/USP, por permitirem a realização do meu experimento;
À Dr.^a Camilla Mota Mendes do Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da FMVZ/USP, pela realização do SCDA e pela ajuda e apoio.

AOS ANIMAIS

Aos bugios, por fornecerem o material necessário para a minha pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
III. HIPÓTESES.....	13
IV. OBJETIVOS.....	13
1. Objetivo geral.....	13
2. Objetivos específicos.....	13
V. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. Animais.....	14
2. Protocolo experimental.....	16
2.1. Critérios para utilização dos animais e das amostras de sêmen.....	16
2.2. EXPERIMENTO I – Avaliação andrológica.....	17
2.3. EXPERIMENTO II – Efeito da criopreservação em diferentes diluidores.....	17
2.4. EXPERIMENTO III – Efeito do tempo de incubação e do diluidor sobre as características seminais pós-descongelação.....	17
3. Morfometria testicular e colheita de sêmen.....	18
4. Processamento e análise do sêmen.....	22
4.1. Motilidade espermática.....	24
4.2. Integridade de membrana plasmática.....	24
4.3. Integridade de acrossoma.....	25
4.4. Atividade citotóxica mitocondrial.....	27
4.5. Avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo (TBARS).....	28
4.6. Ensaio de Suscetibilidade da Cromatina à Desnaturação Ácida (SCDA).....	30
5. Protocolos de congelamento.....	31
5.1. Preparo dos diluidores.....	31
5.2. Diluição e congelamento das amostras.....	31
6. Protocolo de descongelamento.....	33
7. Análise estatística.....	34
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
1. EXPERIMENTO I – Avaliação andrológica.....	36
1.1. Morfometria testicular.....	36
1.2. Análise do sêmen fresco.....	37
2. EXPERIMENTO II – Efeito da criopreservação com diferentes	46

diluidores.....	
3. EXPERIMENTO III – Efeito do tempo de incubação e do diluidor sobre as características seminais pós-descongelação.....	58
VII. CONCLUSÕES.....	67
VIII. REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICES.....	86
APÊNDICE A.....	87
APÊNDICE B.....	89
APÊNDICE C.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
AOT	<i>Acridine Orange Test</i>
ATP	Adenosina trifosfato
α -MEM	Meio Mínimo Essencial Modificado Alfa
BWW	Meio Biggers, Whitten e Whittingham's
CCO	Citocromo c oxidase
CENP	Centro Nacional de Primatas
DAB	3,3' – diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína Conjugado
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
IFD	Índice de Fragmentação de DNA
IUCN	International Union for Conservation of Nature
LA	Laboratório de Andrologia
LSD	Least Significant Difference
MDA	Malondialdeído
Nupecce	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos
NT	<i>Nick Translation in situ</i>
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PN	Primatas Neotropicais
PNA	Aglutinina de Amendoim
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
PVM	Primatas do velho Mundo
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SAS	Statistical Analysis System
SCDA	Suscetibilidade da Cromatina Espermática à Desnaturação
SCSA	Ensaio de Estrutura da Cromatina Espermática
sptz	Espermatozoides
SSC	Species Survival Commission
TALP	Meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TEST	Tes-Tris
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling</i>
USP	Universidade de São Paulo
Unesp	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Unip	Universidade Paulista
WHO	World Health Organization

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	Página
Tabela 1. Dados de morfometria testicular de <i>Alouatta caraya</i> , mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA.	36
Tabela 2. Dados (média $\pm$ erro padrão), com resultados da comparação de médias e Análise de Variância (ANOVA), referentes ao exame a fresco de sêmen de <i>Alouatta caraya</i> cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA.	38
Tabela 3. Dados (média $\pm$ desvio padrão), com resultados da comparação de médias e Análise de Variância (ANOVA), referentes aos parâmetros integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma de sêmen fresco de seis machos <i>Alouatta caraya</i> , cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA.	38
Tabela 4. Dados (média $\pm$ desvio padrão), com resultados da comparação de médias e Análise de Variância (ANOVA), referentes às classes (I, II, III e IV) de atividade citoquímica mitocondrial (ACM) de sêmen fresco de seis machos <i>Alouatta caraya</i> cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA.	39
Tabela 5. Dados (média $\pm$ erro padrão) e resultados do teste t de Student referentes ao exame de sêmen (n=20) de <i>Alouatta caraya</i> antes e após a criopreservação com diluidor à base de lecitina de soja com glicerol a 3%.	47
Tabela 6. Dados (média $\pm$ erro padrão) e resultados do teste t de Student referentes ao exame de sêmen (n=20) de <i>Alouatta caraya</i> fresco e criopreservado com diluidor à base de lecitina de soja com glicerol a 4%.	48
Tabela 7. Tabela 7. Dados (média $\pm$ erro padrão) e resultados do teste t de Student referentes ao exame de sêmen (n=20) de <i>Alouatta caraya</i> fresco e criopreservado com diluidor à base de gema de ovo com glicerol a 3%.	48
Tabela 8. Dados (média $\pm$ erro padrão) e resultados do teste t de Student referentes ao exame de sêmen (n=20) de <i>Alouatta caraya</i> fresco e criopreservado com diluidor à base de gema de ovo com glicerol a 4%.	49
Tabela 9. Resultados da Análise de Variância (ANOVA) dos parâmetros avaliados em sêmen (n=20) de <i>Alouatta caraya</i> em três tempos pós-descongelação (fator tempo) para comparação de quatro diluidores para criopreservação (fator tratamento).	59
Tabela 10. Resultados (média $\pm$ erro padrão) da Análise de Variância (ANOVA) e do teste de comparação de médias (LSD) dos parâmetros avaliados em sêmen (n=20) criopreservado de <i>Alouatta caraya</i> para o fator tratamento.	59
Tabela 11. Resultados (média $\pm$ erro padrão) da Análise de Variância (ANOVA) e do teste de comparação de médias (LSD) dos parâmetros avaliados em sêmen (n=20) criopreservado de <i>Alouatta caraya</i> para o fator tempo.	63
Quadro 1. Análise da correlação entre os parâmetros avaliados em sêmen fresco de <i>Alouatta caraya</i> . O primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação (r) e o segundo valor corresponde ao P (probabilidade estatística).	46
Quadro 2. Análise da correlação entre os parâmetros avaliados em sêmen criopreservado de <i>Alouatta caraya</i> . O primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação (r) e o segundo valor corresponde ao P (probabilidade estatística).	66

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Machos adultos <i>Alouatta caraya</i> , provenientes do Centro Nacional de Primatas (CENP), Ananindeua, PA. O conjunto de letras de cada foto corresponde à tatuagem de identificação do animal.	15
Figura 2. Realização de morfometria testicular de <i>Alouatta caraya</i> . A. Mensuração do comprimento com paquímetro digital. B. Mensuração do perímetro escrotal com fita métrica. Foto: Paloma Rocha Arakaki.	18
Figura 3. Higienização da genitália externa de <i>Alouatta caraya</i> , realizada previamente ao início da colheita.	19
Figura 4. <i>Alouatta caraya</i> em decúbito ventral sobre suporte de madeira para colheita de sêmen.	20
Figura 5. Lavagem do pênis de <i>Alouatta caraya</i> com solução fisiológica (A) e secagem com gaze estéril (B).	20
Figura 6. Aparelho eletroejaculador DUBOI [®] adaptado para utilização em <i>Alouatta caraya</i> .	21
Figura 7. A. Pênis ereto de <i>Alouatta caraya</i> durante eletroejaculação. Seta indica gotícula de sêmen na extremidade peniana. B. Equipamento para colheita de sêmen composto de tubo de vidro estéril encaixado em frasco com água aquecida a 37°C. Foto A: Paloma Rocha Arakaki; Foto B: Carla Cristina Amador de Conde.	22
Figura 8. A. Sêmen de <i>Alouatta caraya</i> imediatamente após a colheita. B. Mensuração de volume e diluição do sêmen com solução de Ringer com lactato.	23
Figura 9. Colheita da amostra para mensuração do pH seminal (A) e leitura do pH (B) do sêmen de <i>Alouatta caraya</i> .	23
Figura 10. Fotomicrografia de espermatozoides de <i>Alouatta caraya</i> corados com eosina nigrosina (Objetiva de 100X, imersão). 1. Membrana plasmática íntegra. 2. Membrana plasmática não íntegra.	25
Figura 11. Fotomicrografia de espermatozoides de <i>Alouatta caraya</i> corados com corante simples para acrossoma (A) e Spermac [®] (B). (Objetiva de 100X, imersão). 1. Acrossoma íntegro. 2. Acrossoma não íntegro.	26
Figura 12. Fotomicrografia de espermatozoides de <i>Alouatta caraya</i> corados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A. Classe I; B. Classe II. C. Classe III; e D. Classe IV.	28
Figura 13. A. Preenchimento da palheta com micropipetador automático. B. Máquina de congelação TK 3000 SE compacta [®] durante início do processo de congelação.	33
Figura 14. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de volume, referentes ao exame a fresco de sêmen de <i>Alouatta caraya</i> cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais.	39
Figura 15. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de pH, referentes ao exame a fresco de sêmen de <i>Alouatta caraya</i> cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais.	40
Figura 16. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de concentração, referentes ao exame a fresco de sêmen de <i>Alouatta caraya</i> cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais. Médias com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD.	40
Figura 17. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de motilidade total e progressiva, referentes ao exame a fresco de sêmen de <i>Alouatta caraya</i> cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua,	41

	PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais.	
Figura 18.	Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de integridade de membrana plasmática, referentes ao exame a fresco de sêmen de <i>Alouatta caraya</i> cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais. Médias com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD.	41
Figura 19.	Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de integridade de acrossoma, referentes ao exame a fresco de sêmen de <i>Alouatta caraya</i> cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais.	42
Figura 20.	Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de atividade citoquímica mitocondrial (ACM), referentes ao exame a fresco de sêmen de <i>Alouatta caraya</i> cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais.	42
Figura 21.	Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de motilidade total e progressiva, referentes ao sêmen de <i>Alouatta caraya</i> fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). *indica diferença estatística do sêmen criopreservado em relação ao fresco pelo teste LSD.	49
Figura 22.	Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de membrana plasmática íntegra, referentes ao sêmen de <i>Alouatta caraya</i> fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). *indica diferença estatística do sêmen criopreservado em relação ao fresco pelo teste LSD.	50
Figura 23.	Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de integridade de acrossoma, referentes ao sêmen de <i>Alouatta caraya</i> fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4).	50
Figura 24.	Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de atividade citoquímica mitocondrial (ACM), referentes ao sêmen de <i>Alouatta caraya</i> fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). *indica diferença estatística do sêmen criopreservado em relação ao fresco pelo teste LSD.	51
Figura 25.	Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de concentração de TBARS, referentes ao sêmen de <i>Alouatta caraya</i> fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). *indica diferença estatística do sêmen criopreservado em relação ao fresco pelo teste LSD.	51
Figura 26.	*Diferem estatisticamente do sêmen fresco pelo teste LSD Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de índice de fragmentação de DNA, referentes ao sêmen de <i>Alouatta caraya</i> fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). *indica diferença estatística do sêmen criopreservado em relação ao fresco pelo teste LSD.	52

- Figura 27.** Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de motilidade total e progressiva de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). Médias, referentes ao mesmo parâmetro, com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD. 60
- Figura 28.** Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de integridade de membrana plasmática de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). Médias com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD. 60
- Figura 29.** Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de integridade de acrossoma de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). Médias com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD. 61
- Figura 30.** Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de atividade citoquímica mitocondrial (ACM) de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). 61
- Figura 31.** Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de concentração de TBARS de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). 62
- Figura 32.** Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de índice de fragmentação de DNA de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). 62
- Figura 33.** Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de motilidade total e progressiva de sêmen descongelado de *Alouatta caraya* incubado em banho-maria a 37°C durante 10, 40 e 80 minutos pós-descongelação. Médias, referentes ao mesmo parâmetro, com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD. 63
- Figura 34.** Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de membrana plasmática e acrossoma íntegros de sêmen descongelado de *Alouatta caraya* incubado em banho-maria a 37°C durante 10, 40 e 80 minutos pós-descongelação. 64
- Figura 35.** Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de atividade citoquímica mitocondrial (ACM) de sêmen descongelado de *Alouatta caraya* incubado em banho-maria a 37°C durante 10, 40 e 80 minutos pós-descongelação. 64

AVALIAÇÃO DE DILUIDORES À BASE DE GEMA DE OVO E DE LECITINA DE SOJA PARA A CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE *ALOUATTA CARAYA*

RESUMO - As alterações constantes do meio ambiente com diminuição do *habitat* natural dos primatas brasileiros têm estimulado o desenvolvimento de biotecnologias na área da reprodução, visando à preservação de espécies. Este estudo teve por objetivo avaliar, pela primeira vez, técnicas de criopreservação de sêmen de *Alouatta caraya*. Foram colhidas 26 amostras de sêmen de seis *Alouatta caraya* machos adultos e sadios, mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP), Ananindeua, PA. As amostras foram analisadas imediatamente após a colheita quanto aos parâmetros volume, pH, concentração, motilidade total e progressiva, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma, atividade citoquímica mitocondrial, estresse oxidativo (TBARS) e fragmentação de DNA (SCSA). Após as análises iniciais, as amostras foram congeladas com quatro diluidores diferentes – Test-gema de ovo com glicerol 3 ou 4% e Test-lecitina de soja com glicerol 3 ou 4%, utilizando máquina de congelação automática TK 3000. As amostras foram descongeladas e analisadas aos 10, 40 e 80 minutos pós-descongelação. Diluidores à base de gema de ovo foram mais adequados para congelação de sêmen dessa espécie, quando comparados aos diluidores à base de lecitina de soja. Não houve diferença estatística quanto à concentração de glicerol, porém para o diluidor à base de gema de ovo, a concentração de 4% apresentou melhores resultados. Este trabalho trouxe informações inéditas a respeito de características seminais e aspectos da criopreservação de sêmen dessa espécie, todavia os protocolos de congelação testados não foram considerados adequados para a preservação das amostras estudadas.

Palavras-Chave: bugio, criopreservação, espermatozoide, crioprotetor

EVALUATION OF EGG YOLK AND SOY LECITHIN-BASED EXTENDERS FOR THE CRYOPRESERVATION OF *ALOUATTA CARAYA* SEMEN

SUMMARY – The constant environmental changes with reduction of the natural habitat of the Brazilian primates require the development of assisted reproductive techniques (ARTs) for species conservation. The objective of this study was to evaluate, for the first time, cryopreservation techniques for *Alouatta caraya* semen. Twenty-six semen samples were collected from six captive adult *Alouatta caraya* from the National Primate Center, Ananindeua, PA – Brazil. Samples were analyzed immediately after collection for the following parameters: volume, pH, concentration, total and progressive motility, plasma membrane integrity, acrosome integrity, oxidative stress (TBARS), and DNA fragmentation (SCSA). After initial evaluation, samples were frozen in four different extenders – Test-egg yolk with 3 or 4% glycerol and Test-soy lecithin with 3 or 4% glycerol – using an automatic freezer TK 3000. Samples were thawed and analyzed for the same parameters at 10, 40 and 80 minutes post-thaw. Egg yolk-based extenders seemed better for cryopreservation of semen from this species when compared to soy lecithin-based extenders. Although there was no statistical difference between the different glycerol concentrations, for the egg yolk-based extenders, 4% glycerol had better results. This study brought novel information on semen characteristics and cryopreservation aspects for this species, although the protocols tested were not considered suitable for the cryopreservation of the samples studied.

Keywords: howler monkeys, cryopreservation, spermatozoa, cryoprotectant

I. INTRODUÇÃO

A diversidade biológica do continente americano é, reconhecidamente, admirável. Dentre os incontáveis exemplares de plantas e animais, podem ser destacados os Primatas Neotropicais. Este grupo de animais, que habitam exclusivamente parte das Américas, tem sido desafiado por pressões de diversos tipos. Como consequência, as populações estão diminuindo, o que torna necessária a intervenção por meio de medidas conservacionistas.

Como afirmado por COLLAR (1997, p. 122) "A taxonomia precede a conservação. Isto é tão básico quanto dizer que a linguagem precede a educação. Uma é pré-condição para a outra. Sem a estrutura formal de nomes e um consenso em relação ao sistema de uso, não pode haver entendimento do que existe para ser conservado" (traduzido pela autora). Partindo desta premissa, é necessário situar a espécie em questão dentro do contexto taxonômico.

A Ordem Primates é dividida nas Subordens Strepsirrhini e Haplorrhini. A primeira compreende as Infraordens Lemuriformes (lêmures), Chiromyiformes (aie-aie) e Lorisiformes (lóris e galagos). A segunda compreende as Infraordens Tarsiiformes (társios) e Simiiformes (símios ou macacos). A Infraordem Simiiformes é dividida em duas Parvordens, Catarrhini e Platyrrhini (GROVES, 2005). A primeira compreende as espécies de macacos conhecidas como Primatas do Velho Mundo (PVM), as quais habitam regiões da África e Ásia, enquanto a segunda compreende as espécies conhecidas como Primatas do Novo Mundo ou Primatas Neotropicais (PN), que habitam regiões do México e das Américas Central e do Sul. Atualmente, existem 16 famílias, 71 gêneros e 657 espécies e subespécies de primatas no mundo todo. Dessas, cinco famílias, com 19 gêneros e 199 espécies e subespécies, ou seja, aproximadamente 31%, são PN (RYLANDS & MITTERMEIER, 2009).

Considerando a classificação proposta por RYLANDS & MITTERMEIER (2009) e os nomes populares mais comuns no Brasil, as famílias de PN são Cebidae (macacos-prego e macacos-de-cheiro), Callitrichidae (saguís e micos), Aotidae (macacos-da-

noite), Pitheciidae (parauacus, cuxiús, uacaris e zogue-zogues) e Atelidae (macacos-aranha, macacos-barrigudos, muriquis e guaribas ou bugios).

As principais ameaças à sobrevivência das espécies de primatas são a perda de *habitat* e a caça, tanto para alimento como para tráfico (MITTERMEIER et al., 2009). As alterações constantes do meio ambiente, que resultam em diminuição do *habitat* natural dos primatas brasileiros, têm estimulado o desenvolvimento de biotecnologias na área da reprodução, visando à preservação das inúmeras espécies em perigo. As técnicas de reprodução assistida em cativeiro (inseminação artificial, transferência de embriões, e fecundação *in vitro*, entre outras) podem contribuir para aumentar a variabilidade genética em populações isoladas ameaçadas pela consanguinidade e, simultaneamente, gerar informações e propiciar o armazenamento de material genético (VALLE et al., 2004).

Sob esse prisma, o estudo aqui relatado, teve por objetivo avaliar técnicas de criopreservação de sêmen de *Alouatta caraya*, que podem contribuir para o desenvolvimento de ferramentas para conservação desta espécie e, possivelmente, de outras espécies de PN.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Gênero *Alouatta*

O Brasil possui exemplares das cinco famílias de PN descritas por RYLANDS & MITTERMEIER (2009), com um total de 18 gêneros (IUCN/SSC - Primate Specialist Group, 2007; REIS et al., 2008), 111 espécies (REIS et al., 2008) e 133 espécies e subespécies. (CHIARELLO et al., 2008; IUCN/SSC - Primate Specialist Group, 2007;). Dentre os 18 gêneros, encontra-se o *Alouatta*, único gênero da subfamília Alouattinae, a qual pertence à família Atelidae. O gênero *Alouatta* é composto por 19 espécies e subespécies (RYLANDS & MITTERMEIER, 2009), das quais 11 têm ocorrência no Brasil, onde é conhecido popularmente por guariba ou bugio (GREGORIN et al., 2008). Conforme a classificação de acordo com o risco de ameaça de extinção proposta pela IUCN Red List of Threatened Species (2011), *Alouatta belzebul* e *Alouatta discolor* estão Vulneráveis, *Alouatta ululata* está Ameaçada, e *Alouatta guariba guariba* está Criticamente Ameaçada de extinção. As demais espécies estão classificadas como Pouco Preocupante, Não Avaliado ou Dados Deficientes.

Os bugios são animais robustos, com peso corporal entre 5 e 12 kg, o que os coloca entre os maiores primatas das Américas. Como todos atelídeos, possuem cauda preênsil, mas, apesar de serem braquiadores, possuem braços proporcionalmente mais curtos e cabeça grande, quando comparados a *Ateles* e *Brachyteles*. Todas as espécies apresentam dimorfismo sexual quanto ao tamanho – machos maiores que as fêmeas – e algumas espécies – *Alouatta clamitans*, *A. caraya*, *A. puruensis* e *A. ululata* – apresentam dimorfismo sexual quanto à cor da pelagem (dicromatismo sexual). Nestas, a coloração de cada sexo difere de acordo com a espécie, mas, invariavelmente, os jovens de ambos os sexos tem a mesma coloração da fêmea e os machos mudam de coloração ao atingirem maturidade sexual. O gênero *Alouatta* apresenta osso hioide bem desenvolvido, o que possibilita vocalização audível a uma distância de até 5 km. Com relação à dieta, são considerados folívoros-frugívoros (AURICCHIO, 1995; GREGORIN et al., 2008).

Bugio-preto (*Alouatta caraya*)

Como citado anteriormente, *Alouatta caraya* possui dicromatismo sexual, sendo o macho adulto de coloração negra e a fêmea de coloração castanho-amarelado claro, tendendo ao palha (AURICCHIO, 1995; GREGORIN et al., 2008). Com relação à reprodução, esta espécie apresenta maturidade sexual aos 24 a 37 meses para machos e 35 a 42 meses para fêmeas (CROCKETT & EISENBERG, 1987). A gestação dura cerca de seis meses e o filhote é amamentado por um período de 9 a 12 meses. A espécie vive em grupos de dois até 21 indivíduos, geralmente compostos por um macho adulto, uma ou mais fêmeas adultas, jovens e infantes (GREGORIN et al., 2008).

De acordo com as listas regionais da fauna ameaçada de extinção, *Alouatta caraya* é categorizada como Ameaçada no estado do Paraná (MIKICH & BÉRNILS, 2004) e Vulnerável nos estados de São Paulo (PERCEQUILLO & KIERULFF, 2009) e Rio Grande do Sul (MARQUES et al., 2002). Embora esteja ameaçada nestes estados, a espécie apresenta ampla distribuição, habitando regiões do Brasil, Argentina, Paraguai, leste da Bolívia e norte do Uruguai. No Brasil, ocorre nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Tocantins, Maranhão, Bahia e Pará. Devido à ampla distribuição e ao fato de apresentar algum tipo de ameaça somente em três listas estaduais, não consta do Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MACHADO et al., 2008) e é considerada Pouco Preocupante na IUCN Red List (FERNANDEZ-DUQUE et al., 2008; IUCN, 2011). Devido a grande disponibilidade e sucesso reprodutivo em cativeiro, esta espécie pode ser considerada como espécie modelo no que se refere ao desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida destinadas a outras espécies de bugios sob maior risco de extinção (MORELAND et al., 2001).

Estudo do sêmen de Primatas Neotropicais

Considerando o grande número de espécies e subespécies de PN existentes, poucas (13%) foram estudadas com relação à caracterização, processamento e conservação de sêmen. Essas incluem *Callithrix jacchus* (CUI, 1996; CUI et al., 1991;

DAVIS, 1982; GRUPEN et al., 2004; HERNÁNDEZ-LOPEZ et al., 2005; KUEDERLING et al., 2000; MORREL et al., 1996; VALLE, 2007; VALLE et al., 2008; VALTONEN-ANDRÉ et al., 2005; VERONA et al., 2009; WILTON et al., 1993), *Callithrix penicillata* (MASSAROTTO et al., 2010), *Saimiri sciureus* (BENNETT, 1967; DENIS et al., 1976; LANG, 1967;) *Saimiri boliviensis* (ROUDEBUSH & MATHUR, 1998; YEOMAN et al., 1997, 1998), *Cebus apella* (ARAÚJO et al., 2009; BARNABE et al., 2002; BUSH et al., 1975; GUIMARÃES, 1994; OLIVEIRA et al., 2010, 2011; PAZ et al., 2006a, 2006b), *Ateles geoffroyi* (HERNANDEZ-LÓPEZ et al., 2002a, 2002b, 2008), *Ateles marginatus* e *Ateles paniscus* (SILVA, 2005), *Alouatta caraya* (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004), *Leontopithecus chrysomelas* (VIDAL et al., 2007), *Saguinus mystax* (HARRISON & WOLF, 1985), *Saguinus labiatus* (SANKAI et al., 1997) e *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011a, 2011b). No entanto, é evidente que ocorrem diferenças importantes entre as espécies de primatas, principalmente quando se compara as espécies de PN com as de PVM, mais estudadas (VALLE, 2007; VALLE et al., 2008).

Estudo do sêmen de *Alouatta caraya*

Um trabalho pioneiro avaliou aspectos da fisiologia reprodutiva de seis machos *Alouatta caraya* mantidos no Riverbanks Zoological Park and Botanical Garden, nos Estados Unidos. Os objetivos foram avaliar a qualidade do sêmen e concentração de metabólitos fecais de testosterona, ao longo de um ano e meio, além de comparar a qualidade do sêmen de animais adultos e subadultos, e avaliar o efeito do plasma seminal na longevidade do sêmen. A concentração de metabólitos de testosterona foi constante ao longo do ano para a maioria dos indivíduos. Os maiores volumes foram obtidos no verão e as concentrações foram muito variáveis ao longo do ano. Os parâmetros motilidade, pH e osmolalidade, foram constantes ao longo do período. As características seminais dos subadultos foram semelhantes às dos adultos, entretanto, os subadultos apresentaram porcentagem maior de espermatozoides anormais e baixa longevidade espermática *in vitro*. Já os adultos, apresentaram longevidade maior que 5 horas, quando da remoção do plasma seminal (MORELAND et al., 2001).

Posteriormente, em outro trabalho com nove machos *Alouatta caraya*, mantidos no Centro Nacional de Primatas, no Brasil, foram avaliados volume, concentração, motilidade, integridade de membrana e morfologia espermática. Neste estudo, utilizou-se um modelo de probe e protocolo de estimulação diferentes do estudo anterior, o que resultou em 100% de sucesso nas colheitas, além de nenhuma amostra contaminada por urina, contra 28% de contaminação no trabalho anterior (VALLE et al., 2004).

Ambos os estudos publicados com sêmen de *Alouatta caraya* utilizaram a eletroejaculação como método de colheita. Este método é seguro e efetivo para a colheita de sêmen de animais selvagens e é o mais utilizado para a maioria das espécies, inclusive primatas não-humanos (BUTLER et al., 1995; GOULD et al., 1978). Esta técnica também já foi descrita para outras espécies de PN, incluindo *Saimiri sciureus* (ACKERMAN & ROUSSEL, 1968; BENNETT, 1967; LANG, 1967), *Callithrix jacchus* (CUI, 1996; CUI et al., 1991; MORREL et al., 1996; VERONA et al., 2009), *Saguinus mystax* (HARRISON & WOLF, 1985), *Cebus apella* (ACKERMAN & ROUSSEL, 1968; ARAÚJO et al., 2009; BARNABE et al., 2002; BUSH et al., 1975; GUIMARÃES, 1994; OLIVEIRA et al., 2010, 2011; PAZ et al., 2006a, 2006b), *Saimiri boliviensis* (ROUDEBUSH & MATHUR, 1998; YEOMAN et al., 1998), *Ateles geoffroyi* (HERNANDÉZ-LÓPEZ et al., 2002a, 2002b, 2008), *Leontopithecus chrysomelas* (Vidal et al., 2007), *Ateles paniscus* e *Ateles marginatus* (SILVA, 2005), e *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011a).

Particularidades do sêmen de Primatas Neotropicais e implicações técnicas

As técnicas para preservação de espermatozoides são extremamente importantes para uso em manejo genético, principalmente para compor bancos de germoplasma, para propagação de informação genética de um indivíduo por longos períodos ou várias gerações futuras (VALLE, 2007). Entretanto, um dos principais problemas para se obter sucesso com biotecnologias da reprodução, é a baixa qualidade do sêmen, o que tem limitado o uso destas técnicas em espécies ameaçadas (ROTH, 1993). Em se tratando de primatas, a coagulação do sêmen durante ou após a ejaculação da maioria das espécies, resulta em qualidade seminal variável e dificuldade

na análise (VALLE et al., 2004). No caso de *Alouatta caraya*, esse fenômeno não foi observado (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004). Outra dificuldade encontrada é o volume pequeno de sêmen obtido em PN, que varia desde $7,02 \pm 0,54 \mu\text{l}$ para *Callithrix penicillata* (MASSAROTO et al., 2010) até $4000 \pm 600 \mu\text{l}$ para *Ateles geoffroyi* (HERNÁNDEZ-LOPES et al., 2002a). Embora, para *Alouatta caraya*, tenham sido relatados volumes tão pequenos quanto $90 \pm 50 \mu\text{l}$ (VALLE et al., 2004) e 10 a $203 \mu\text{l}$ (MORELAND et al., 2001), estes podem, eventualmente, ser compensados por concentrações de $649,5 \pm 926,7 \times 10^6$ spz/ml (VALLE et al., 2004) e de 7 a 583×10^6 spz/ml (MORELAND et al., 2001). Os inconvenientes relacionados à coagulação e ao volume reduzido, muitas vezes observados em amostra de sêmen de PN, podem ser contornados pela diluição apropriada (VALLE et al., 2008).

Em sua maioria, as publicações sobre sêmen de PN são referentes ao *Callithrix jacchus* e diversos relatos indicam sucesso na utilização de meios diluidores. Dentre os diluidores utilizados para essa espécie estão o meio mínimo essencial modificado alfa, conhecido como α -MEM (CUI, 1996; CUI et al., 1991), um diluidor à base de gema de ovo (KUEDERLING et al., 1996; MORREL et al., 1996; YEUNG et al., 1996), o meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato-Hepes, conhecido como TALP-Hepes (GILCHRIST et al., 1997; GRUPEN et al., 2004; HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2005; KUEDERLING et al., 2000; SCHNEIDERS et al., 2004; VALLE, 2007; VALLE et al., 2008; VALTONEN-ANDRÉ et al., 2005) e o meio H (YEUNG et al., 1996). Além desses meios, foram testados outros diluidores, na tentativa de dissolver o coágulo seminal de *Callithrix jacchus*, que incluem o TALP sem cálcio e o meio de fertilização *in vitro*, ambos com adição de tripsina (0,5 ou 1%) ou pronase (0,5 ou 1%), e um meio diluidor de sêmen com EDTA. O meio TALP sem cálcio, com 0,5% de tripsina, por 45 minutos a 37°C , teve os melhores resultados, apesar de não dissolver totalmente o coágulo (VERONA et al., 2009).

Foram realizados outros estudos para testar o uso de enzimas na dissolução do coágulo de PN. Em um deles, foram testados dois métodos para sêmen de *Ateles geoffroyi*, (1) agitação manual do sêmen por 10 minutos em banho-maria a 37°C e (2) diluição do sêmen com PBS com tripsina a 0,25%. As amostras diluídas com tripsina

mostraram-se melhores quando comparadas às agitadas manualmente (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2002b). Em outro estudo foi testada a diluição da fração coagulada de sêmen de *Cebus apella* com meio 199 adicionado de tripsina ou hialuronidase a 0,1%. Compararam-se a fração líquida sem diluição e a fração coagulada, após 5 e 15 minutos de diluição, quanto aos parâmetros motilidade, vigor e integridade de acrossoma. Não houve diferença entre os efeitos das enzimas sobre nenhum dos parâmetros analisados e nenhuma das enzimas foi capaz de dissolver completamente o coágulo. Entretanto, a motilidade e o vigor da fração líquida foram significativamente maiores do que da fração coagulada após 15 minutos (PAZ et al., 2006b). Um terceiro estudo avaliou o emprego de tripsina a 0,5, 1 ou 5% com dois tempos de incubação (20 e 40 minutos) para a dissolução do coágulo seminal de *Saimiri sciureus*. Nenhum dos tratamentos foi eficaz na dissolução do coágulo (KUGELMEIER, 2011).

Outros diluidores utilizados para sêmen de PN incluem Ham's F-10 para sêmen de *Leontopithecus chrysomelas*, que resultou em maior fluidez e minimizou a formação do coágulo (VIDAL et al., 2007); meio Biggers, Whitten e Whittingham's (BWW) com albumina sérica bovina e solução salina tamponada com fosfato (PBS) para sêmen de *Saimiri boliviensis* (ROUDEBUSH & MATHUR, 1998; YEOMAN et al., 1998); solução de Krebs-Ringer bicarbonato modificada (chamada de meio TYH pelos autores) para sêmen de *Saguinus labiatus* (SANKAI et al., 1997); diluidor à base de água de coco *in natura* para *Cebus apella* (ARAÚJO et al., 2009) e *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011a, 2011b) e diluidor à base de água de coco em pó (ACP-118[®]) para *Cebus apella* (OLIVEIRA et al., 2010), ambos com dissolução parcial ou completa do coágulo seminal nas duas espécies; e solução de ringer com lactato para sêmen de *Alouatta caraya*, com manutenção da qualidade seminal (VALLE et al., 2004).

Técnicas para avaliação do sêmen

Integridade de membrana plasmática

A avaliação da vitalidade espermática ou integridade de membrana plasmática pode ser feita por meio de corantes ou do teste hiposmótico (WHO, 2010). Em sêmen de PN foram descritos apenas métodos de avaliação por meio de corantes. A coloração

com eosina-nigrosina é a mais utilizada e já foi descrita para sêmen de *Saimiri boliviensis* (BENNETT, 1967), *Callithrix jacchus* (KUEDERLING et al., 1996; MORRELL et al., 1996; VALLE, 2007; VALLE et al., 2008), *Cebus apella* (ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010, 2011), *Callithrix penicillata* (MASSAROTO et al., 2010) e *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011a). Já a eosina Y foi descrita para sêmen de *Cebus apella* (BUSH et al., 1975), *Callithrix jacchus* (KUEDERLING et al., 2000), e *Alouatta caraya* (VALLE et al., 2004), enquanto a eosina B foi utilizada apenas para sêmen de *Ateles geoffroyi* (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2002a).

Integridade de acrossoma

O acrossoma contém enzimas envolvidas no processo de fecundação, responsáveis pela penetração do espermatozoide no oócito (GARNER & HAFEZ, 2004). Existem técnicas para averiguar a presença ou ausência do acrossoma nos espermatozoides, as quais já foram descritas em algumas espécies de PN. Dentre estas técnicas encontra-se a coloração com sondas fluorescentes, tais como o isotiocianato de fluoresceína conjugado à aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA) ou a aglutinina do amendoim (FITC-PNA), ambas descritas para sêmen de *Callithrix jacchus* (O'BRIEN et al., 2003; PUDRITZ, 2000; VALLE et al., 2008). Outras técnicas utilizadas em PN incluem a coloração com *kit* comercial Spermac[®], também descrita para sêmen de *Callithrix jacchus* (VALLE, 2007), e a coloração com corante simples para acrossoma, desenvolvida por POPE et al. (1991), validada para sêmen de *Callithrix jacchus* (VALLE et al., 2008) e utilizado em *Cebus apella* (PAZ et al., 2006a, 2006b), *Callithrix penicillata* (MASSAROTO et al., 2010) e *Callimico goeldii* (ARAKAKI et al., 2011).

Atividade citoquímica mitocondrial

HRUDKA (1987) desenvolveu um ensaio para análise quantitativa e qualitativa da atividade da enzima citocromo c oxidase (CCO) – enzima da cadeia respiratória responsável pela produção de energia mitocondrial – por meio da enzima 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A atividade mitocondrial está envolvida no processo de respiração celular e produção de energia do espermatozoide, principalmente quando

ocorre alteração do metabolismo energético sem alterar a membrana (KATO et al., 2002). Esta técnica já foi utilizada com sucesso para sêmen de *Callithrix penicillata* (MASSAROTO et al, 2010) e para sêmen congelado de *Callithrix jacchus* (VALLE, 2007).

Estresse oxidativo

Segundo revisão recente, a produção de ATP gera intermediários relativamente instáveis conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). Quando ocorre distúrbio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante das células, estas ROS se acumulam e causam estresse oxidativo. A membrana celular é um dos principais alvos do estresse oxidativo, por ser formada por grande quantidade de lipídios poli-insaturados, que sofrem a chamada peroxidação lipídica. Esta gera o acúmulo de hidroperóxidos e a formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), que alteram a membrana celular e geram transtornos de permeabilidade com consequentes alterações de DNA, proteínas e componentes da matriz extracelular (LUZ et al., 2011). A reação do ácido tiobarbitúrico (TBA, do inglês *Thiobarbituric acid*) com o MDA gera um pigmento vermelho que pode ser quantificado por espectrofotometria, com comprimento de onda de 532 nm (OHKAWA et al., 1979). A reação de peroxidação lipídica pode ser espontânea (OHKAWA et al., 1979) ou induzida (AITKEN et al., 1993). A reação induzida é desencadeada por um promotor e mede a disponibilidade de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática para iniciar a reação de peroxidação e a habilidade do espermatozoide de inibir a continuidade do processo. A avaliação da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *Thiobarbituric acid reactive species*) pela peroxidação lipídica de espermatozoides, já foi descrita em algumas espécies, incluindo o homem (AITKEN et al., 1993), touro (NICHI, 2003), rato (SÖNMEZ et al., 2005), cão (HATAMOTO et al., 2006), gato-do-mato-pequeno (BARROS, 2007), perdiz (GÓES, 2008) e coelho (GLIOZZI et al., 2009), porém não foram encontrados trabalhos com primatas não-humanos.

Fragmentação de DNA

Existem várias técnicas disponíveis para avaliação da estrutura da cromatina espermática e da integridade do DNA, as quais incluem o ensaio de eletroforese em gel de célula única (Cometa), o ensaio *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling* (TUNEL), o ensaio *Nick Translation in situ* (NT), o teste de laranja de acridina (AOT, do inglês *Acridine Orange Test*) e o teste de estrutura da cromatina espermática, conhecido pela sigla em inglês, SCSA (EVENSON et al., 2002). Contudo, o SCSA, desenvolvido por EVENSON et al. (1980) é o teste com maior poder estatístico, praticidade e eficiência, por avaliar de 5.000-10.000 células em poucos minutos, ao invés de 100-200 células, como os outros métodos. O SCSA mede a susceptibilidade do DNA à desnaturação e é capaz de predizer tanto subfertilidade ou infertilidade de machos, como a possibilidade de desenvolvimento embrionário após aplicação de técnicas de reprodução assistida (D'OCCHIO et al., 2007; EVENSON et al., 2002; EVENSON & JOST, 2000;). Esta técnica já foi descrita para sêmen humano (EVENSON et al., 2002) e de diversos animais tais como rato (EVENSON et al., 1993), cachaco (EVENSON et al., 1994), garanhão (MORRELL et al., 2008), touro (BALLACHEY et al., 1988), peixe (*Clarias gariepinus*), peru e *hamster* (LEWIN et al., 1999). Com relação aos primatas não-humanos, a técnica foi descrita apenas em PVM, incluindo *Macaca mulatta* (SITZMANN et al., 2010) e *Macaca fascicularis* (FOSTER et al., 1996; LEWIN et al., 1999).

Criopreservação de sêmen em primatas

Diluidor

No que se refere à criopreservação de sêmen, diluidores à base de gema de ovo têm sido usados amplamente. Segundo revisão realizada por MORREL & HODGES (1998), as concentrações de gema de ovo para criopreservação de sêmen de primatas não-humanos, variaram de 5 a 30%, sendo que a maioria dos trabalhos utilizaram a concentração de 20%. Trabalhos posteriores a esta revisão utilizaram concentrações de 10% de gema de ovo (LI, et al., 2005; SI et al., 2006), 20% de gema de ovo (DONG et al., 2008a; FERADIS et al., 2001; GAGLIARDI et al., 2008; LI et al., 2004, 2005;

OLIVEIRA et al., 2011; SI et al., 2000; SILVA, 2005; VALLE, 2007; YANG et al., 2011) ou 30% de gema de ovo (DONG et al., 2008b; GAGLIARDI et al., 2008; GOFF et al., 2009; LEIBO et al., 2007; LI, et al., 2005, 2007; SI et al., 2000).

Entretanto, a gema de ovo apresenta riscos sanitários e dificuldade de padronização, por ser um produto de origem animal (BOUSSEAU et al., 1998). A disponibilidade de um diluidor padronizado e livre de patógenos seria preferível (AIRES et al., 2003). O uso da lecitina de soja, um produto de origem vegetal, como substituto da gema de ovo já foi descrito para sêmen humano (JEYENDRAN et al., 2008; REED et al., 2009) e de vários animais incluindo touro (AIRES et al., 2003; BOUSSEAU et al., 1998; SARIOZKAN et al., 2010), carneiro (PAZ et al., 2010; SHARAFI et al., 2009), bode (BITTENCOURT et al., 2008), cachaco (ZHANG et al., 2009), cão (BECCAGLIA et al., 2009), gato (VICK et al., 2010) garanhão (PAPA et al., 2011) e búfalo (*Bubalus bubalis*, AKHTER et al., 2011). Entretanto, não foi encontrado nenhum trabalho realizado com sêmen de primatas não-humanos.

Crioprotetor

Dentre os diversos crioprotetores existentes, o mais utilizado para criopreservação de sêmen é o glicerol. Trata-se de um crioprotetor penetrante que pode ser tóxico e causar lesão ao deixar a célula após a descongelação. A sensibilidade celular ao efeito tóxico do glicerol varia de acordo com a espécie (LEIBO et al., 2001; LI et al., 2005; MORREL & HODGES, 1998; ROYERE et al., 1996; VALLE, 2007). A concentração de glicerol utilizada para criopreservação de sêmen de primatas não-humanos em geral varia de 2,5% (OLIVEIRA et al., 2011) até 14% (MORREL & HODGES, 1998). Para PN, as concentrações utilizadas tendem a ser as mais baixas de acordo com os trabalhos realizados até o momento, sendo 4% para *Saimiri sciureus* (DENIS et al., 1976), 8% para *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997), 5% para *Saguinus labiatus* (SANKAI et al., 1997), 4 e 5% para *Callithrix jacchus* (MORREL & HODGES, 1998; VALLE, 2007), 2,5 e 3,5% para *Cebus apella* (OLIVEIRA et al., 2011) e 7% para *Ateles paniscus* e *Ateles marginatus* (SILVA, 2005).

III. HIPÓTESES

Levando-se em consideração os possíveis efeitos da criopreservação sobre espermatozoides de *Alouatta caraya*, estabeleceram-se as hipóteses de que (1) podem ser obtidos resultados satisfatórios tanto com diluidor à base de gema de ovo quanto com diluidor à base de lecitina de soja e que (2) concentrações baixas de glicerol podem ser benéficas para a criopreservação.

IV. OBJETIVOS

1. **Objetivo geral:** avaliar diferentes protocolos de congelação para sêmen de *Alouatta caraya*.

2. **Objetivos específicos**

- Realizar avaliação andrológica de *Alouatta caraya* com a finalidade de caracterizar e selecionar amostras de sêmen para estudo de criopreservação;
- Avaliar os efeitos da criopreservação, com diferentes diluidores, sobre a motilidade, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma, atividade citoquímica mitocondrial, suscetibilidade à peroxidação lipídica e suscetibilidade da cromatina à desnaturação ácida em espermatozoides de *Alouatta caraya*;
- Avaliar o desempenho dos diluidores à base de gema de ovo (origem animal) e de lecitina de soja (origem vegetal), com duas concentrações de glicerol, e do tempo de incubação pós-descongelação de sêmen de *Alouatta caraya*.

V. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados seis *Alouatta caraya* (Figura 1), machos, adultos e sadios, mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP), Ananindeua - PA, Brasil. Os animais do CENP são identificados por três letras tatuadas na parte interna da coxa. Tal identificação foi mantida para a discriminação dos machos no presente estudo.

Três machos nasceram em cativeiro – BAB (5 anos de idade), BAA (8 anos de idade) e ABJ (16 anos de idade) – e três nasceram em vida livre – BAC (idade estimada de 16 anos), AFZ (idade estimada de 16 anos) e AAF (idade estimada de 16 anos). Os machos BAA, AFZ e ABJ eram mantidos em casais, cada qual em uma gaiola de metal que media 2,40 m X 2,85 m X 3,60 m (altura x largura x comprimento). Dois machos (pai - AAF e filho - BAB) ficavam juntos com uma fêmea em gaiola do mesmo tamanho citado anteriormente. Um macho (BAC) ficava isolado, por motivos logísticos do CENP, em uma gaiola individual de 70 cm X 60 cm X 70 cm (altura x largura x comprimento). As gaiolas ficavam em um galpão coberto, com entrada de ar natural pelas laterais. Os animais eram alimentados com ração Megazoo P-18 (Megazoo, Betim, MG), frutas, folhas e suplemento de aminoácidos.

Antes do início do experimento, o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV/Unesp (Protocolo nº 019174/09).



Figura 1. Machos adultos *Alouatta caraya*, provenientes do Centro Nacional de Primatas (CENP), Ananindeua, PA. O conjunto de letras de cada foto corresponde à tatuagem de identificação do animal. Fotos BAA, BAB, ABJ e AAF: Fernanda M. de Carvalho; Fotos AFZ e BAC: Paloma Rocha Arakaki.

2. Protocolo experimental

2.1. Critérios para utilização dos animais e das amostras de sêmen

O Manual WHO (2010), para análise de sêmen humano, indica um período de abstinência sexual mínimo de dois dias e máximo de sete dias entre colheitas sucessivas do mesmo indivíduo e que o intervalo de abstinência seja o mais constante possível entre colheitas sucessivas. Entretanto, considerando o estresse de submeter os animais à anestesia frequente e a logística de trabalhar com seis animais, optou-se por um intervalo de 15 dias entre as colheitas. Além disso, apesar da indicação de abstinência de no mínimo dois dias, os bugios são altamente sociáveis e a separação por períodos prolongados seria muito estressante, tanto para os machos como para as fêmeas. Por este motivo, os machos eram separados das fêmeas apenas um dia antes da colheita, para que não copulassem neste período. Cada um dos seis machos contribuiu com duas a seis amostras de sêmen, totalizando 26 amostras, que foram primeiramente analisadas logo após a colheita (Experimento I).

Para avaliação dos processos e resultados da criopreservação, contudo, julgou-se necessário estabelecer critérios de qualidade mínima do sêmen na primeira análise. Estabeleceu-se que amostras com motilidade $\leq 20\%$ não seriam utilizadas. Além disso, optou-se por descartar o macho AAF do estudo de congelação, dada a qualidade geral de sêmen muito baixa e inferior à dos demais animais. Dessa forma, buscou-se melhorar as condições para viabilização da comparação dos diferentes diluidores, visto que o sêmen tende a piorar sua qualidade em decorrência do processo de congelação. Feitas as exclusões, para as análises de comparação de sêmen fresco *versus* criopreservado com diferentes diluidores (Experimento II) e de sêmen congelado com diferentes diluidores (Experimento III) foram utilizados cinco animais e um total de 20 colheitas.

As amostras obtidas foram utilizadas em três experimentos, de acordo com os critérios de exclusão estabelecidos anteriormente.

2.2. EXPERIMENTO I – Avaliação andrológica

A avaliação andrológica consistiu na morfometria testicular e avaliação de amostras repetidas de sêmen de cada macho. As amostras foram avaliadas quanto ao volume, pH, concentração, motilidade total e motilidade progressiva, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e atividade citoquímica mitocondrial. As amostras consideradas apropriadas para serem congeladas também foram avaliadas quanto à resistência ao estresse oxidativo e à resistência da cromatina à desnaturação ácida, de forma a permitir as avaliações pertinentes ao Experimento II.

2.3. EXPERIMENTO II – Efeito da criopreservação em diferentes diluidores

Este experimento consistiu na congelação das amostras viáveis obtidas no Experimento I e análise pós-descongelação. As amostras foram diluídas com quatro diluidores diferentes – gema de ovo com glicerol 3% (G3) ou 4% (G4) e lecitina de soja com glicerol 3% (L3) ou 4% (L4). O sêmen descongelado foi avaliado quanto à motilidade total e motilidade progressiva, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma, atividade citoquímica mitocondrial, suscetibilidade ao estresse oxidativo e suscetibilidade da cromatina à desnaturação ácida. Foram comparados os resultados do sêmen fresco *versus* sêmen congelado de forma a avaliar o desempenho dos diluidores com relação à criopreservação.

2.4. EXPERIMENTO III – Efeito do tempo de incubação e do diluidor sobre as características seminais pós-descongelação

Este experimento consistiu na incubação das amostras do Experimento II em banho-maria a 37°C e avaliação aos 10, 40 e 80 minutos pós-descongelação. Foram avaliados os parâmetros motilidade total e motilidade progressiva, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e atividade citoquímica mitocondrial. Este experimento permitiu a avaliação da viabilidade do sêmen pós-descongelação, considerando os fatores tempo de incubação e tipo de diluidor.

3. Morfometria testicular e colheita de sêmen

Para a realização da morfometria testicular e colheita de sêmen, os seis animais foram anestesiados com aplicação intramuscular de associação de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina nas doses de 10 e 0,5 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Quando necessário, foi feita reaplicação de metade da dose de quetamina. Ambos os testículos foram examinados por inspeção e palpação e mensurados com auxílio de paquímetro e fita métrica (Figura 2). Os dados obtidos foram utilizados para cálculo do volume testicular, por meio da fórmula empírica de Lambert:

$$\text{volume} = \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{espessura} \times 0,71$$

Optou-se por utilizar esta fórmula, pois o testículo de bugio tem forma semelhante ao do homem e, segundo estudo realizado por HSIEH et al. (2009), esta fórmula foi a que mais se aproximou do volume real, medido por deslocamento de água.

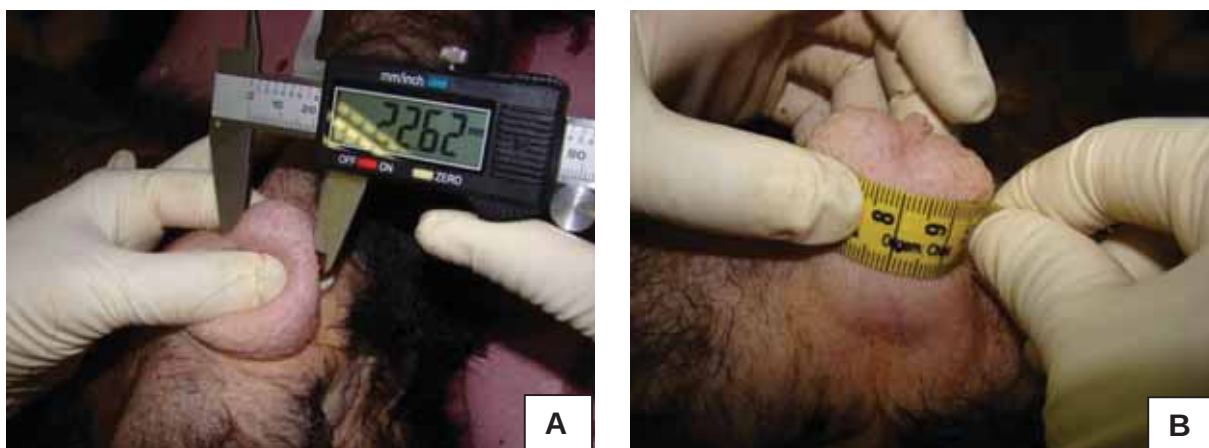


Figura 2. Realização de morfometria testicular de *Alouatta caraya*. **A.** Mensuração do comprimento com paquímetro digital. **B.** Mensuração do perímetro escrotal com fita métrica. Foto: Paloma Rocha Arakaki.

As colheitas de sêmen foram realizadas conforme previamente descrito para a espécie (VALLE et al., 2004). Para tanto, imediatamente antes do início da colheita do sêmen, os animais, previamente anestesiados, foram posicionados em decúbito dorsal, para higienização da genitália externa com água e sabão neutro (Figura 3), e secagem com panos de campo. Após a lavagem inicial, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre um suporte de madeira (Figura 4) e contidos mecanicamente com auxílio de ataduras. Deste modo, foram limitados os movimentos dos membros pélvicos decorrentes das contrações musculares ocasionadas pelos estímulos elétricos, além de ter sido prevenida a queda do animal. Em seguida, o pênis foi exposto para higienização com solução fisiológica a 0,9% e secagem com gaze estéril (Figura 5).



Figura 3. Higienização da genitália externa de *Alouatta caraya*, realizada previamente ao início da colheita. Foto: Paloma Rocha Arakaki.



Figura 4. *Alouatta caraya* em decúbito ventral sobre suporte de madeira para colheita de sêmen.
Foto: Paloma Rocha Arakaki.



Figura 5. Lavagem do pênis de *Alouatta caraya* com solução fisiológica (A) e secagem com gaze estéril (B). Foto: Paloma Rocha Arakaki.

Para colheita de sêmen utilizou-se aparelho eletroejaculador¹ (Figura 6) adaptado para *Alouatta caraya*, conforme descrito por VALLE et al. (2004). O eletrodo foi lubrificado com KY[®] gel² e introduzido no reto do animal, que recebeu estímulo inicial de 2,0 volts, com aumento de 0,5 volts a cada série de estímulos, até um máximo de 8,0 volts. Cada série consistiu de 30 estímulos de 2 a 3 segundos de duração, aplicados a intervalos de 1 a 2 segundos. O sêmen foi colhido diretamente do pênis (Figura 7A), com auxílio de um tubo de vidro estéril encaixado em frasco com água a 37°C (Figura 7B), mantido em banho-maria até o momento da colheita (VALLE et al., 2004).



Figura 6. Aparelho eletroejaculador DUBOI[®] adaptado para utilização em *Alouatta caraya*. Foto: Rodrigo del Rio do Valle.

¹ DUBOI – Campo Grande, MS

² Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para a Saúde Ltda

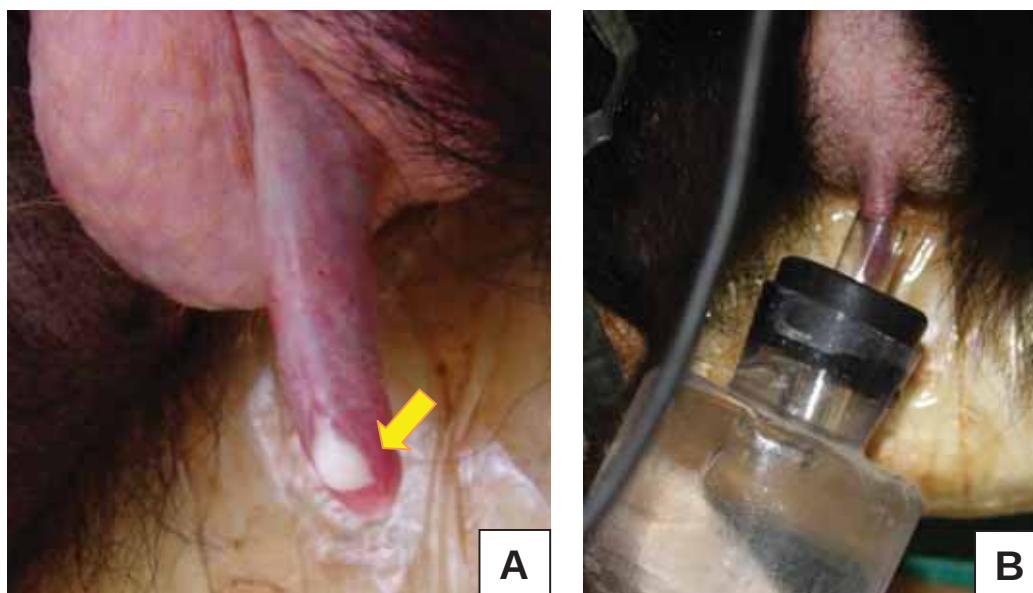


Figura 7. **A.** Pênis ereto de *Alouatta caraya* durante eletroejaculação. Seta indica gotícula de sêmen na extremidade peniana. **B.** Equipamento para colheita de sêmen composto de tubo de vidro estéril encaixado em frasco com água aquecida a 37°C. Foto A: Paloma Rocha Arakaki; Foto B: Carla Cristina Amador de Conde.

4. Processamento e análise do sêmen

As amostras foram colhidas, avaliadas imediatamente após a colheita (Experimento I), diluídas com diferentes diluidores, congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido para análise pós-descongelação (Experimentos II e III).

As análises do sêmen fresco (Figura 8A) foram realizadas no laboratório do CENP. As amostras recém-colhidas foram avaliadas imediatamente quanto ao volume (Figura 8B), com pipeta automática, e ao pH (Figura 9A), com fita reagente para pH³ (Figura 9). Em seguida, foram diluídas em solução de Ringer com lactato pré-aquecido a 37°C, com quantidade suficiente para totalizar 0,5 ml (VALLE et al., 2004). As amostras foram mantidas em banho-maria durante todo o processamento.

³ Merck – Alemanha

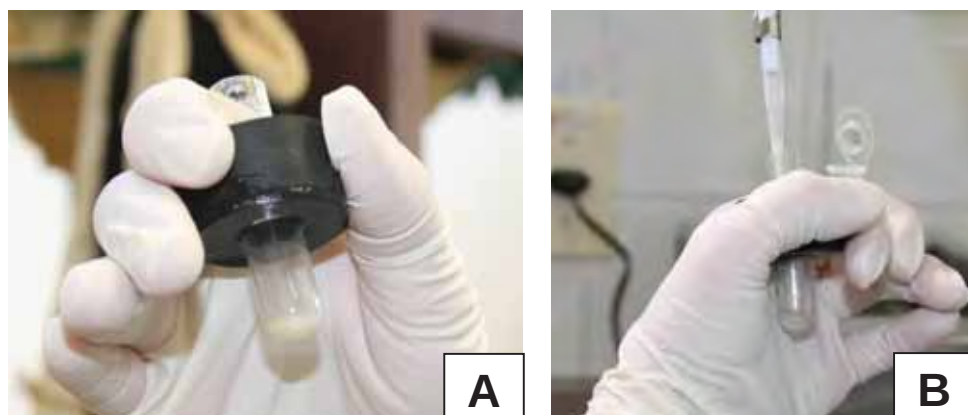


Figura 8. A. Sêmen de *Alouatta caraya* imediatamente após a colheita. B. Mensuração de volume e diluição do sêmen com solução de Ringer com lactato. Foto: Carla Cristina Amador de Conde.

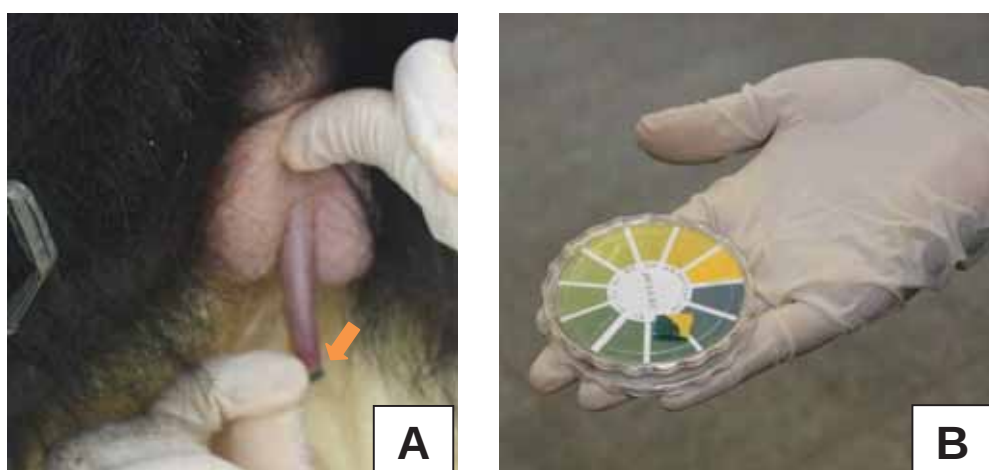


Figura 9. Colheita da amostra para mensuração do pH seminal (A) e leitura do pH (B) do sêmen de *Alouatta caraya*. Foto: Carla Cristina Amador de Conde.

Tanto o sêmen fresco quanto as amostras criopreservadas foram avaliadas em relação à motilidade total e motilidade progressiva (exame a fresco), concentração espermática (Câmara de Neubauer improved), integridade do acrossoma (coloração simples para acrossoma – sêmen fresco e criopreservado e Spermac^{®4} – sêmen fresco), integridade da membrana

⁴ Stain Enterprises, P.O. Box 12421, 0110, Onderstepoort, South Africa

plasmática (coloração com eosina-nigrosina), atividade citoquímica mitocondrial (ACM, coloração com DAB), índice de fragmentação de DNA (susceptibilidade da cromatina à desnaturação ácida - SCDA) e avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo (concentração de TBARS) imediatamente após colheita e diluição inicial ou após a descongelação no caso dos criopreservados.

4.1. Motilidade espermática

Para avaliação da motilidade espermática, 10 µl do sêmen diluído foram colocados entre lâmina e lamínula e observados ao microscópio óptico com objetiva de 40x. Os espermatozoides foram classificados quanto à presença ou não de motilidade e se a motilidade era progressiva ou não. A motilidade total é a porcentagem de espermatozoides com qualquer tipo de movimento de cauda, enquanto a motilidade progressiva é a porcentagem de espermatozoides com movimento ativo, seja linear ou em círculos grandes (WHO, 2010).

4.2. Integridade de membrana plasmática

Para avaliação da integridade de membrana plasmática (Figura 10) foi utilizado o kit comercial VitaScan^{®5}. Entretanto, testes preliminares com sêmen de *Alouatta caraya* produziram resultados inconsistentes. Segundo o Manual WHO (2010), soluções aquosas e hipotônicas de eosina podem gerar resultados falso-positivos. Neste caso, é recomendada a adição de 0,9 g de NaCl para 100 ml de solução de corante, de forma a elevar a osmolalidade da solução. Verificou-se que este era o caso da eosina do VitaScan[®] e após adição da quantidade recomendada de NaCl, obteve-se o resultado esperado.

Para realização da coloração, 5 µl de eosina foram adicionados a 5 µl de sêmen em um tubo tipo eppendorf. Após 30 segundos foram adicionados 5 µl de nigrosina e após homogeneização foi realizado esfregaço em lâmina de vidro, conforme protocolo previamente validado para outra espécie de PN, *Callithrix jacchus* (VALLE et al., 2008).

⁵ Lucron Bioproducts, AB GENNEP, The Netherlands

Foram avaliados 200 espermatozoides em microscópio de luz com objetiva de 100x (imersão).



Figura 10. Fotomicrografia de espermatozoides de *Alouatta caraya* corados com eosina nigrosina (Objetiva de 100X, imersão). 1. Membrana plasmática íntegra. 2. Membrana plasmática não íntegra. Foto: Fernanda M. de Carvalho

4.3. Integridade de acrossoma

A integridade de acrossoma foi avaliada por dois métodos diferentes – coloração simples para acrossoma (POPE et al., 1991) e corante comercial Spermac[®]. Para o método de coloração simples para acrossoma (Figura 11A), utilizou-se uma alíquota de 5 µL da amostra para 5 µL de corante simples para acrossoma. A mistura foi incubada por 120 segundos na ausência de luz e, em seguida, foi realizado um esfregaço para avaliação em microscopia de luz, com objetiva de 100x (imersão). Foram avaliados 200 espermatozoides. Para o sêmen criopreservado, foi necessário aumentar o tempo de incubação para 140 segundos, pois as amostras não coravam adequadamente com tempo de incubação menor que este.

Para o método de coloração com o corante comercial Spermac[®] (Figura 11B), inicialmente foi feito um esfregaço com 5 µL de sêmen, o qual foi seco a 37°C por 10 minutos. Em seguida a lâmina foi mergulhada na solução fixadora sete vezes, para garantir o contato da solução com os espermatozoides, e deixada imersa por 10 minutos. Após a fixação, foi feita lavagem da lâmina, mergulhando a lâmina sete vezes em um recipiente com água limpa, e secagem do excesso com papel toalha, sem contato direto com o esfregaço. A lâmina foi, então, mergulhada no corante A sete vezes e deixada imersa até completar 90 segundos desde a primeira imersão. Novamente, foi feita a lavagem e secagem do excesso e a lâmina foi mergulhada no corante B sete vezes e deixada imersa até completar um minuto desde a primeira imersão. Após nova lavagem e secagem, a lâmina foi mergulhada sete vezes no corante C e deixada imersa até completar 80 segundos desde a primeira imersão. Em seguida foi feita lavagem e a lâmina foi seca a 37°C. Foram avaliados 200 espermatozoides em microscopia de luz, com objetiva de 100x (imersão).

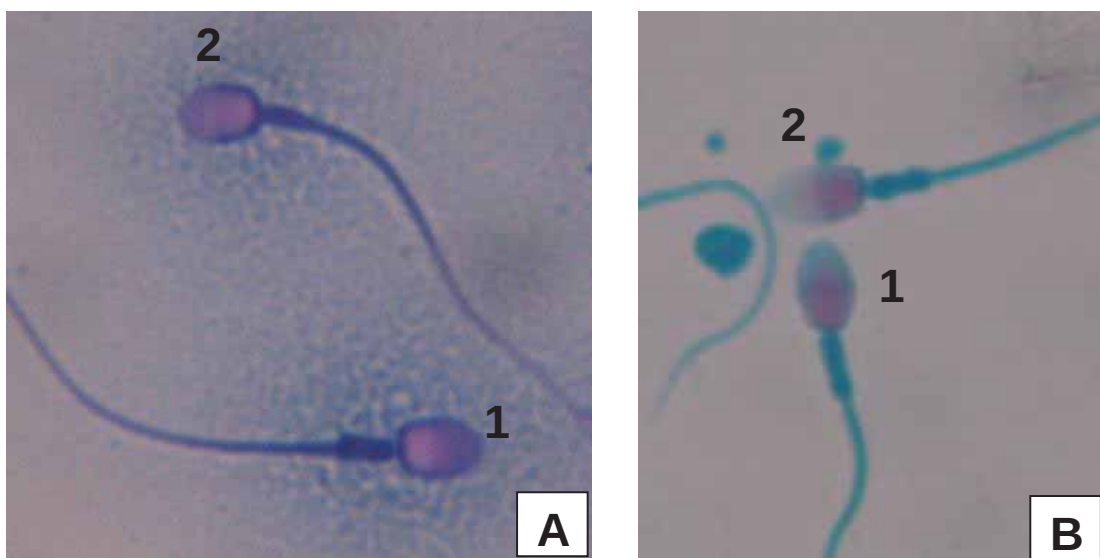


Figura 11. Fotomicrografia de espermatozoides de *Alouatta caraya* corados com corante simples para acrossoma (A) e Spermac[®] (B). (Objetiva de 100X, imersão). 1. Acrossoma íntegro. 2. Acrossoma não íntegro. Foto: Fernanda M. de Carvalho.

4.4. Atividade citoquímica mitocondrial

Para avaliação da atividade citoquímica mitocondrial, foi utilizado o corante 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Figura 12), mantido congelado até o momento do uso e sem contato com luz direta. Para tanto, alíquotas de 10 µl do corante foram pipetadas em tubos do tipo eppendorf de cor âmbar e armazenadas em freezer a -20°C. Antes da colheita de sêmen, o tubo com a alíquota de corante foi colocado em banho-maria a 37°C e mantido desta forma até a utilização. Para realização da técnica de coloração, 10 µl da amostra foram adicionados aos 10 µl de DAB, homogeneizados e incubados em banho-maria a 37°C, durante 60 minutos, na ausência de luz (tampa do banho-maria fechada). Em seguida, foi feito um esfregaço em lâmina de vidro e secagem na ausência de luz (em caixa de isopor fechada) e em temperatura ambiente. Após a secagem, foi feita fixação em formol a 10% por 10 minutos e secagem na ausência de luz, novamente. Todo o procedimento foi realizado com as luzes apagadas e entrada de luz mínima para permitir visualização da amostra. Foram contados e classificados 200 espermatozoides em microscópio de contraste de fase, com objetiva de 100x (imersão). A classificação foi feita de acordo com a atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozoides, segundo escala proposta por HRUDKA (1987), conforme descrito a seguir.

- Classe I - Quase 100% das mitocôndrias estão ativas e a bainha mitocondrial apresenta-se como um cilindro compacto e proeminente.
- Classe II - A bainha mitocondrial se mostra fragmentada, com segmentos ativos e inativos.
- Classe III - Menos de 50% das mitocôndrias estão ativas e, muitas vezes, dispersas na peça intermediária.
- Classe IV - Nenhuma mitocôndria ativa.



Figura 12. Fotomicrografia de espermatozoides de *Alouatta caraya* corados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A. Classe I; B. Classe II. C. Classe III; e D. Classe IV. Foto: Fernanda M. de Carvalho.

4.5. Avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo (TBARS)

Esta técnica foi baseada no estudo feito por OHKAWA et al. (1979), em que o malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um pigmento de coloração vermelha que pode ser quantificado por meio de espectrofotometria, com um comprimento de onda de 532 nm. Para este trabalho, utilizou-se o teste induzido descrito por AITKEN et al. (1993).

4.5.1. Protocolo de indução utilizado para o sêmen fresco

Uma alíquota de 20 µl do sêmen foi colocada em um tubo do tipo eppendorf ao qual foram adicionados 180 µl de solução de Ringer com lactato, 50 µl de solução de sulfato de ferro 4mM e 50 µl de solução de ácido ascórbico 20mM. A solução foi, então, incubada em banho-maria a 37°C por 90 minutos com a tampa do tubo aberta, para permitir a entrada de oxigênio. Após o término dos 90 minutos, foi adicionado ácido tricloro acético a 10% (TCA) gelado (4°C) na proporção de 1:2 (300 µl de solução + 600 µl de TCA). Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 3370 g. O sobrenadante (800 µL) foi colocado em um criotubo e armazenado a -20°C até o momento da análise. Esse procedimento foi realizado no laboratório do CENP.

4.5.2. Protocolo de indução utilizado para o sêmen congelado

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 15 segundos. O conteúdo da palheta (100 µl) foi transferido para um tubo do tipo eppendorf e foram adicionados 1800 µl de PBS. A solução foi centrifugada a 19.700 g por 10 minutos para lavagem do sêmen e remoção do diluidor. Descartou-se o sobrenadante (900 µl) e ressuspendeu-se a amostra com mais 100 µl de PBS, totalizando 200 µl de solução. Seguiu-se, então, o mesmo protocolo descrito para indução do sêmen fresco (item 4.5.1).

4.5.3. Protocolo para quantificação de TBARS

As análises foram feitas no Laboratório de Andrologia (LA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). As amostras induzidas foram descongeladas em temperatura ambiente e adicionou-se ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA) na proporção de 1:1 (800 µl de amostra + 800 µl de TBA). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 100°C por 15 minutos com o criotubo fechado hermeticamente. Após o término dos 15 minutos, as amostras foram colocadas em caixa de isopor contendo gelo, para interromper a reação. As amostras foram, então, transferidas

para cubetas para leitura em espectrofotômetro⁶. Os dados de absorbância foram comparados com uma curva padrão previamente estabelecida e calcularam-se os índices de peroxidação lipídica em mg de TBARS/10⁶ espermatozoides.

4.6. Ensaio de Suscetibilidade da Cromatina à Desnaturação Ácida (SCDA)

O *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) é um ensaio patenteado e, por isso, seria necessária a utilização do mesmo citômetro de fluxo e do mesmo *software* para análise das amostras de forma a permitir o uso do nome SCSA. O Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da FMVZ/USP, onde foi realizado o ensaio, adaptou a técnica descrita por BOE-HANSEN et al. (2005) e passou a utilizar o citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System⁷ e o programa FlowJo®⁸, para análise dos dados. Este teste adaptado é chamado de Suscetibilidade da Cromatina à Desnaturação Ácida (SCDA).

Para realização desse teste, calculou-se o volume de sêmen necessário para se obter 250.000 espermatozoides e esta alíquota foi transferida para um criotubo, congelada direto em nitrogênio líquido e armazenada a -20°C. Este procedimento foi realizado tanto com as amostras de sêmen fresco, como com as amostras de sêmen criopreservado. Como não há relatos do uso do SCSA ou do SCDA para sêmen dessa espécie ou de outros PN, foi necessária a validação do teste (APÊNDICE A).

As amostras foram descongeladas sobre mesa aquecedora a 37°C e lavadas com 500 µl de PBS. Para isso, após adição do PBS, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. As amostras foram, então, acrescidas de 50 µl de solução tampão TNE e de 100 µl de detergente ácido e incubadas por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 300 µl de laranja de acridina e após dois minutos feita a leitura por citometria de fluxo, com o citômetro Guava EasyCyte™. Após a leitura das amostras, os dados foram exportados e analisados no programa FlowJo®, com base nos pontos de corte estabelecidos por meio da validação. O resultado foi apresentado

⁶ Ultrospec 3300 pro, Amersham Pharmacia (GE Healthcare UK Limited), Buckinghamshire - England

⁷ Guava Technologies, Inc. – Hayward, CA - EUA

⁸ Tree Star, Inc., Ashland, OR - EUA

como índice de fragmentação de DNA (IFD) que é a porcentagem de espermatozoides com estrutura de cromatina anormal. A composição das soluções utilizadas para realização do SCDA encontra-se no APÊNDICE B.

5. Protocolos de congelação

Foram avaliados e comparados os efeitos de dois diluidores, TEST-gema de ovo – com 20% de gema de ovo (VALLE, 2007) e TEST-lecitina de soja – com 1% de lecitina de soja (REED et al., 2009) e de duas concentrações diferentes de glicerol (3 e 4%), para cada diluidor.

5.1. Preparo dos diluidores

Os diluidores foram preparados no LA da FMVZ/USP e mantidos congelados em freezer a -20°C até o momento da utilização. A fórmula dos diluidores com glicerol a 3% e 4% encontra-se no APÊNDICE C. Exceto pela substituição da gema de ovo pela lecitina de soja, não houve qualquer diferença que pudesse influir sobre os resultados dos diluidores.

5.2. Diluição e congelação das amostras

Após o cálculo da concentração espermática, o sêmen foi dividido em quatro partes iguais. Cada parte foi diluída com um diluidor diferente, previamente aquecido a 37°C, dentre os quais TEST-gema de ovo com glicerol 3 ou 4% e TEST-lecitina de soja com glicerol 3 ou 4%. A diluição foi feita com o diluidor em uma única fração, já com o glicerol na concentração desejada, pois já foi demonstrado que em algumas espécies a utilização de diluidor em duas frações não é vantajosa (MORRIER et al., 2002; SALOMON & RITAR, 1982; SILVA et al., 2003). Além disso, a diluição com fração única é mais prática, principalmente quando da utilização de congelador automático. O volume de cada diluidor foi calculado de forma a se obter uma concentração final de 25×10^6 espermatozoides/ml, quando possível. Caso contrário, a diluição foi feita de

forma a conseguir pelo menos duas palhetas de 100 µl para cada diluidor, mesmo que a concentração final fosse menor que 25×10^6 espermatozoides/ml, obtendo um mínimo de oito palhetas por ejaculado com um total de 160 palhetas.

O sêmen foi, então, envazado em palhetas coloridas⁹ (Figura 13A), com uma cor diferente para cada diluidor e as palhetas foram vedadas com álcool polivinil. Para a congelação foi utilizado o congelador portátil TK[®]3000 SE compacta¹⁰ (Figura 13B), com curva pré-programada para bovinos (P1S1). Esta curva consiste em um resfriamento inicial de -0,25°C/minuto em média, até atingir 5°C (curva positiva) e -5°C/minuto até atingir -120°C (curva negativa). Quando a temperatura atingiu -120°C, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e depois transferidas para Visotubes^{®11} que, por sua vez, foram transferidos para um botijão com nitrogênio líquido para manutenção a -196°C.

⁹ IMV Technologies – Maple Grove, MN - EUA

¹⁰ TK Equipamentos para Reprodução – Uberaba, MG

¹¹ IMV Technologies – Maple Grove, MN - EUA

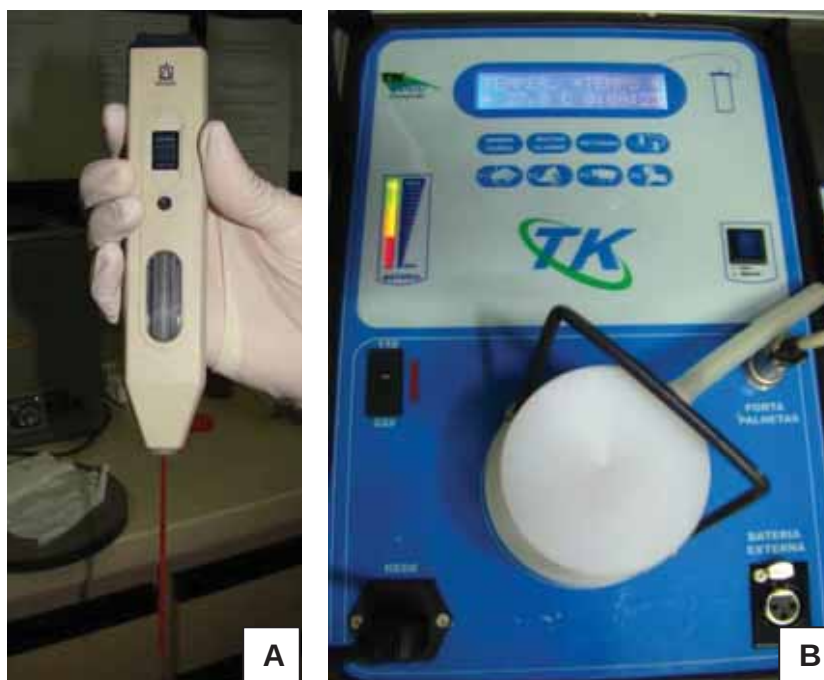


Figura 13. **A.** Preenchimento da palheta com micropipetador automático. **B.** Máquina de congelção TK 3000 SE compacta® durante início do processo de congelção. Foto A: Paloma Rocha Arakaki. Foto B: Fernanda M. de Carvalho.

Devido ao pequeno volume de ejaculado da espécie e ao número de tratamentos avaliados, as palhetas, originalmente de 0,25 ml, foram cortadas e marcadas para armazenar um volume total de 0,1 ml, conforme descrito por VALLE (2007).

6. Protocolo de descongelção

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C, por 15 segundos e avaliadas aos 10, 40 e 80 minutos após a descongelção. A primeira análise foi feita aos 10 minutos para padronizar o tempo de início das avaliações em todas as amostras. Para realização do SCDA, imediatamente após a

descongelação duas alíquotas de 10 µl foram pipetadas em criotubos e congeladas diretamente em nitrogênio líquido, para análise posterior. Os 80 µl restantes da amostra foram, imediatamente, diluídos na proporção de 1:1 com solução de Ringer com lactato para aumentar o volume e diminuir a concentração de glicerol pela metade, dada a toxicidade do mesmo. As avaliações feitas após a descongelação foram as mesmas realizadas com o sêmen fresco, com exceção do volume, pH e concentração espermática.

Foram descongeladas 80 palhetas para avaliação da motilidade, motilidade progressiva, integridade de membrana, integridade de acrossoma, atividade citoquímica mitocondrial e fragmentação de DNA. Outras 80 palhetas foram descongeladas para avaliação da resistência ao estresse oxidativo. As descongelações do sêmen criopreservado foram feitas nos locais de realização das avaliações, que incluíram os laboratórios do Hospital Veterinário da Universidade Paulista (UNIP), do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/Unesp, *campus* de Jaboticabal) e do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP.

7. Análise estatística

EXPERIMENTO I

Os resultados da morfometria testicular incluindo comprimento, largura, espessura, volume testicular e perímetro escrotal, foram apresentados individualmente. Foi avaliada a correlação entre volume testicular total (esquerdo + direito) e o número de espermatozoides por ejaculado pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Os resultados da análise do sêmen fresco foram submetidos à ANOVA e ao teste LSD (Least Significant Difference) para comparação das médias de cada macho. Também foram avaliadas as possíveis correlações (Pearson) entre os parâmetros analisados no sêmen. Para esta análise foram consideradas todas as amostras (n=26).

EXPERIMENTO II

Os resultados obtidos para o sêmen fresco *versus* sêmen congelado com os diferentes diluidores foram comparados por meio do teste t de Student. Para esta análise foram consideradas apenas as amostras selecionadas para congelação (n=20) de acordo com os critérios de exclusão descritos no item 2.1 do Material e Métodos.

EXPERIMENTO III

Os resultados obtidos para cada diluidor ao longo do tempo foram comparados por meio de ANOVA e teste LSD, considerando os fatores tempo de incubação e tipo de diluidor. Para esta análise foram consideradas as mesmas amostras do Experimento II (n=20).

Todas as análises estatísticas foram feitas pelo programa SAS System for Windows¹². O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor ou igual a 0,05, considerou-se que houve diferenças significativas entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta.

¹² SAS Institute Inc. – Cary, NC - EUA, 2000

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. EXPERIMENTO I – Avaliação andrológica

1.1. Morfometria testicular

Os dados de morfometria testicular dos seis machos permitiram verificar que os volumes, calculados a partir das medidas de comprimento, largura e espessura, variaram entre os machos e também quando considerados os dois testículos do mesmo indivíduo (Tabela 1). Quando foi utilizado o testículo maior de cada macho como referência, os volumes dos respectivos testículos contralaterais foram 6 a 22% menores.

Tabela 1. Dados de morfometria testicular de *Alouatta caraya*, mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA.

Animal	Testículo direito (cm)				Testículo esquerdo (cm)				Vol. Total (cm ³)	Perim. Escrotal (cm)
	Comp.	Larg.	Esp.	Vol. (cm ³)	Comp.	Larg.	Esp.	Vol. (cm ³)		
BAC	2,58	1,68	1,56	4,81	2,59	1,67	1,75	5,38	10,19	11,00
BAB	2,30	1,58	1,39	3,58	2,24	1,54	1,37	3,35	6,94	10,00
AAF	2,79	2,33	2,10	9,64	3,24	2,40	2,25	12,43	22,08	9,00
ABJ	2,56	1,78	1,58	5,12	2,51	1,48	1,63	4,32	9,45	10,00
AFZ	2,73	1,84	1,99	7,13	2,98	1,99	1,84	7,77	14,90	11,50
BAA	2,22	2,09	2,13	7,03	2,64	2,13	2,12	8,48	15,51	11,00

Comp.=comprimento; Larg.=largura; Esp.=espessura; Vol.=volume; Perim.=perímetro; Test.=testicular.

À semelhança dos dados referentes a cada testículo, os valores de volume testicular total (volume do testículo direito + volume do testículo esquerdo) diferiram entre os machos. O volume total variou de 6,94 cm³ a 22,08 cm³ (Tabela 1), com média de 13,18 cm³, menor do que a média de 16,70 cm³, descrita por MORELAND et al. (2001). Entretanto, estes autores utilizaram outra fórmula para cálculo do volume testicular, a qual assume que a largura e a espessura do testículo têm a mesma medida, quando, na verdade, não têm. Além disso, podem existir diferenças de acordo

com a época do ano, conforme descrito por MORELAND et al. (2001) ou também diferenças genéticas entre populações de origens diferentes.

Quanto à relação do volume testicular e número de espermatozoides/ejaculado, não houve correlação entre os parâmetros ($r=-0,38$ e $P=0,447$), ao contrário do que é observado em outras espécies (MOLLER, 1988). Isso pode ser verificado claramente, quando consideramos os machos com maior e menor volume testicular total e com maior e menor produção de espermatozoides por ejaculado. O macho AAF, com o maior volume testicular total, teve o menor número médio de espermatozoides/ejaculado (3.906.300), enquanto o macho BAB, com o menor volume testicular total, teve número médio de espermatozoides/ejaculado igual a 44.696.552 sptz/ejaculado, próximo da média (52.074.143). Já o macho BAC, com o maior número médio de espermatozoides (146.124.835 sptz/ejaculado), tinha volume testicular total de 10,19 cm³, abaixo da média (13,18 cm³). A ausência de correlação entre volume testicular e produção de espermatozoides pode ser consequência do pequeno número de animais utilizados ou, possivelmente, uma característica da espécie. É possível que haja diferenças na anatomia testicular desta espécie, por exemplo, o maior volume testicular pode ser decorrente da presença de maior quantidade de parênquima, ao invés de maior quantidade de túbulos seminíferos. São necessários mais estudos para permitir conclusões com relação a essa característica.

1.2. Análise do sêmen fresco

Um total de 26 ejaculados foram obtidos a partir de seis machos. Os resultados dos primeiros exames feitos imediatamente após a colheita, que compreendem as análises de sêmen fresco, foram analisados de modo a contemplar cada macho individualmente, como consta das Tabelas 2 a 4 e das Figuras 14 a 20.

Tabela 2. Dados (média $\pm$ erro padrão), com resultados da comparação de médias e Análise de Variância (ANOVA), referentes ao exame a fresco de sêmen de *Alouatta caraya* cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA.

Animal	Ejaculados (n)	Volume (μ l)	pH	Concentração ($\times 10^6$ sptz/ml)	Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)
BAC	6	110,00 $\pm$ 26,70	7,60 $\pm$ 0,07	1.533,62 $\pm$ 325,42 ^a	60,83 $\pm$ 12,94	48,50 $\pm$ 12,37
BAB	5	65,40 $\pm$ 6,62	7,48 $\pm$ 0,10	682,83 $\pm$ 152,95 ^b	69,00 $\pm$ 16,16	58,00 $\pm$ 14,97
AAF	2	22,50 $\pm$ 2,50	7,05 $\pm$ 0,35	164,69 $\pm$ 80,31 ^b	30,00 $\pm$ 20,00	10,00 $\pm$ 10,00
ABJ	4	122,25 $\pm$ 31,16	7,55 $\pm$ 0,05	203,76 $\pm$ 87,61 ^b	60,00 $\pm$ 13,54	50,00 $\pm$ 13,54
AFZ	5	87,60 $\pm$ 14,07	7,40 $\pm$ 0,21	842,82 $\pm$ 106,78 ^b	68,00 $\pm$ 6,63	56,00 $\pm$ 6,00
BAA	4	74,25 $\pm$ 32,33	7,38 $\pm$ 0,09	223,81 $\pm$ 79,51 ^b	52,50 $\pm$ 16,52	36,25 $\pm$ 15,73
Média Geral		86,77	7,45	725,75	60,00	47,15
	CV	57,88	3,81	62,03	49,15	58,38
ANOVA	F	1,54	1,33	6,63	0,63	1,12
	P	0,2218	0,2932	0,0009	0,6767	0,3796

Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste LSD.

Tabela 3 Dados (média $\pm$ erro padrão), com resultados da comparação de médias e Análise de Variância (ANOVA), referentes aos parâmetros integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma de sêmen fresco de seis machos *Alouatta caraya*, cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA.

Animal	Ejaculados (n)	Membrana Plasmática Íntegra (%)	Acrossoma Íntegro Spermac (%)	Acrossoma Íntegro Pope (%)
BAC	6	44,67 $\pm$ 4,76 ^{ab}	66,83 $\pm$ 4,51	68,67 $\pm$ 6,02
BAB	5	56,60 $\pm$ 8,99 ^a	56,00 $\pm$ 7,56	56,60 $\pm$ 10,71
AAF	2	36,50 $\pm$ 0,50 ^{ab}	45,00 $\pm$ 10,00	40,50 $\pm$ 8,50
ABJ	4	27,00 $\pm$ 4,83 ^b	46,00 $\pm$ 10,09	50,50 $\pm$ 11,21
AFZ	5	54,60 $\pm$ 6,90 ^a	58,80 $\pm$ 6,17	66,20 $\pm$ 5,69
BAA	4	56,75 $\pm$ 3,75 ^a	52,75 $\pm$ 3,90	56,00 $\pm$ 5,15
Média Geral		47,15	56,15	58,96
	CV	28,70	25,55	29,37
ANOVA	F	3,22	1,39	1,24
	P	0,0271	0,2716	0,3281

Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste LSD.

Tabela 4. Dados (média $\pm$ erro padrão), com resultados da comparação de médias e Análise de Variância (ANOVA), referentes às classes (I, II, III e IV) de atividade citoquímica mitocondrial (ACM) de sêmen fresco de seis machos *Alouatta caraya* cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA.

Animal	Ejaculados (n)	ACM Classe I (%)	ACM Classe II (%)	ACM Classe III (%)	ACM Classe IV (%)
BAC	6	7,33 $\pm$ 4,52	49,17 $\pm$ 9,94	31,17 $\pm$ 7,13	12,33 $\pm$ 5,23
BAB	5	4,75 $\pm$ 1,93	57,75 $\pm$ 10,59	33,25 $\pm$ 11,14	4,25 $\pm$ 1,44
AAF	2	8,00 $\pm$ 3,00	50,00 $\pm$ 6,00	33,50 $\pm$ 10,50	8,50 $\pm$ 1,50
ABJ	4	15,00 $\pm$ 4,62	58,33 $\pm$ 8,74	18,33 $\pm$ 3,33	8,33 $\pm$ 1,76
AFZ	5	3,60 $\pm$ 1,69	34,40 $\pm$ 11,19	44,20 $\pm$ 9,62	17,80 $\pm$ 8,45
BAA	4	9,50 $\pm$ 3,50	63,75 $\pm$ 3,33	23,50 $\pm$ 3,48	3,25 $\pm$ 1,44
Média Geral		7,50	51,17	31,54	9,79
	CV	99,79	39,84	54,39	115,96
ANOVA	F	1,04	1,15	1,09	1,03
	P	0,4238	0,3699	0,3997	0,4305

Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

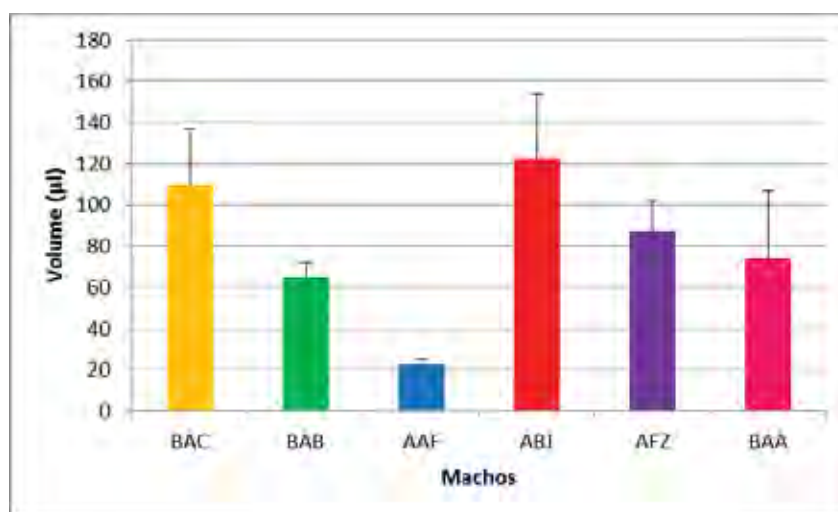


Figura 14. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de volume, referentes ao exame a fresco de sêmen de *Alouatta caraya* cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais.

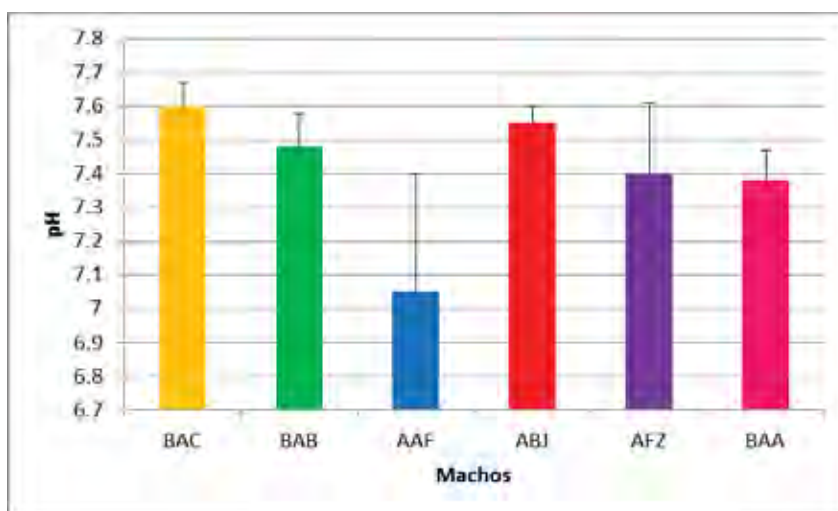


Figura 15. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de pH, referentes ao exame a fresco de sêmen de *Alouatta caraya* cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais.

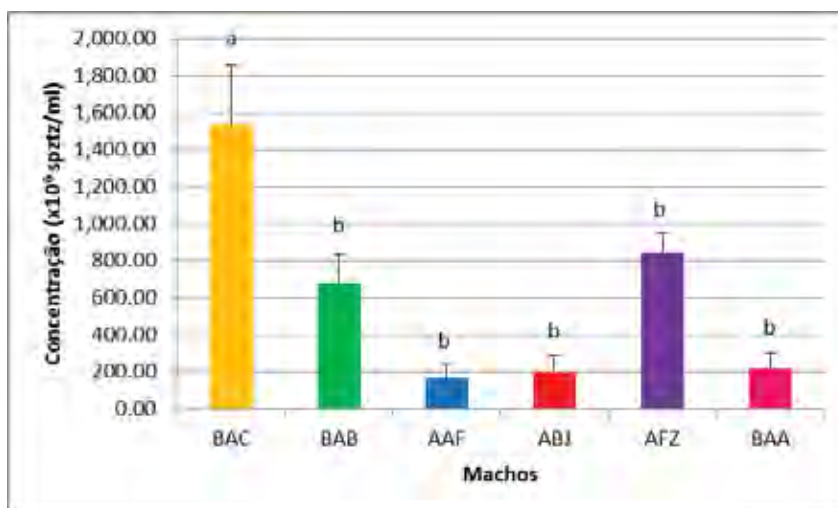


Figura 16. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de concentração, referentes ao exame a fresco de sêmen de *Alouatta caraya* cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais. Médias com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD.

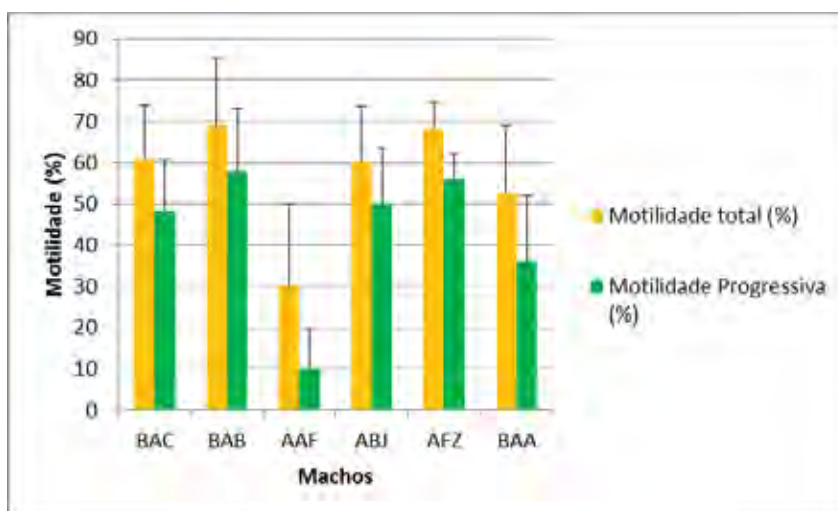


Figura 17. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de motilidade total e progressiva, referentes ao exame a fresco de sêmen de *Alouatta caraya* cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais.

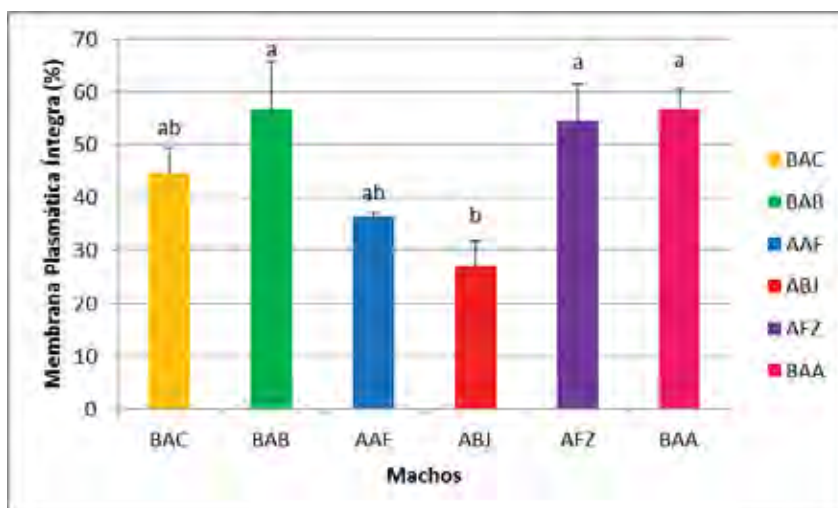


Figura 18. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de integridade de membrana plasmática, referentes ao exame a fresco de sêmen de *Alouatta caraya* cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais. Médias com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD.

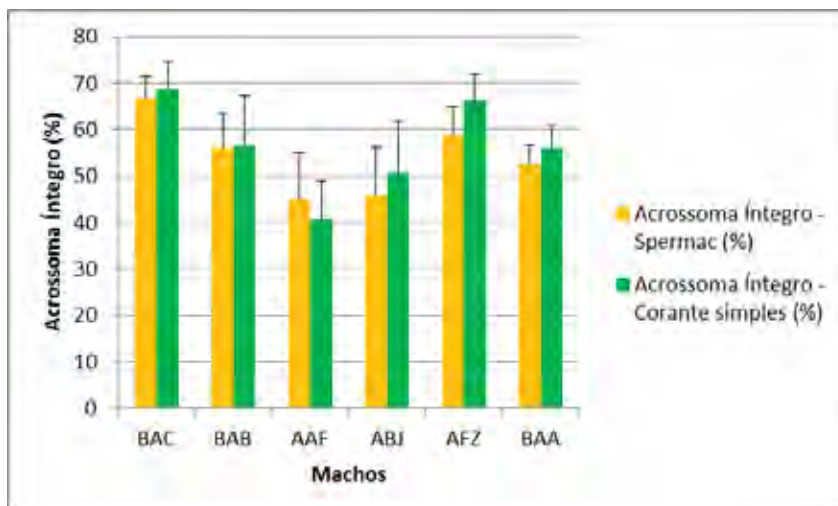


Figura 19. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de integridade de acrossoma, referentes ao exame a fresco de sêmen de *Alouatta caraya* cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais.

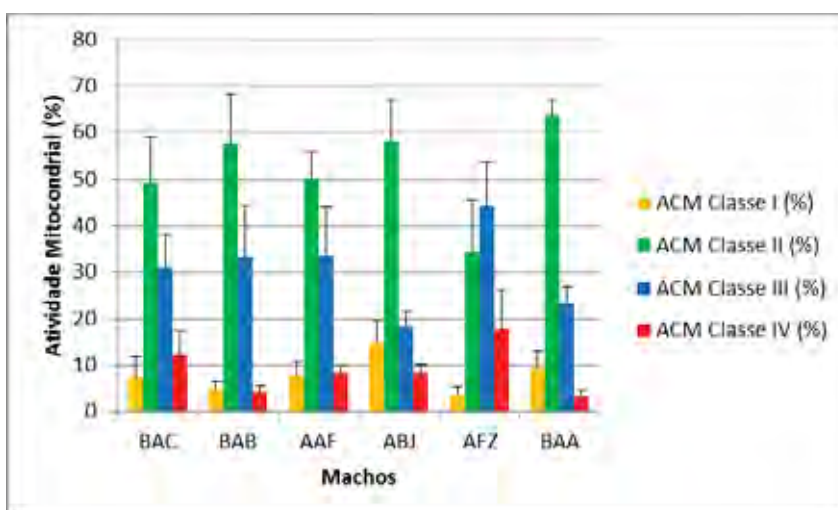


Figura 20. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de atividade citotóxica mitocondrial (ACM), referentes ao exame a fresco de sêmen de *Alouatta caraya* cativos do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, PA. Os conjuntos de letras abaixo das colunas correspondem às tatuagens de identificação dos animais.

A ANOVA acusou diferença significativa entre os machos para os parâmetros concentração (Tabela 2) e integridade de membrana plasmática (Tabela 3). A média de concentração espermática do macho BAC ($1.533,62 \times 10^6$ sptz/ml) foi significativamente maior que a dos demais machos. Com relação à integridade de membrana plasmática, os machos BAA (56,75%), BAB (56,60%) e AFZ (54,60%) tiveram as maiores médias, respectivamente, as quais diferiram significativamente da média do macho ABJ (27,00%). Não houve diferença estatística entre os machos para os demais parâmetros.

O volume de ejaculado variou de 20 a 218 μ l, com média geral de 86,77 μ l, valores semelhantes aos encontrados em trabalhos anteriores, realizados com *Alouatta caraya*, que variaram de 10 a 203 μ l (MORELAND et al., 2001) e 10 a 200 μ l (VALLE et al., 2004). O pH variou de 6,6 a 7,8, com média de 7,45, valores ligeiramente alcalinos e mais baixos do que os encontrados anteriormente para essa espécie que tiveram média de 8,9 (MORELAND et al., 2001) e 8,1 (VALLE et al., 2004). Segundo o Manual WHO (2010), o pH do sêmen humano é determinado pelo balanço entre os pHs das secreções provenientes das glândulas acessórias, principalmente das vesículas seminais (pH alcalino) e da próstata (pH ácido). Ainda segundo este Manual, o pH tende a aumentar ao longo do tempo pós-ejaculação, devido à perda de CO_2 , o que reduz a capacidade de tamponar o sêmen. Levando em consideração estas informações, as diferenças de pH entre os estudos podem ser devido a diferenças de estimulação das glândulas anexas pelo tamanho e/ou posicionamento dos eletrodos e a diferenças no momento da mensuração do pH. Além disso, como aventado por VALLE et al. (2004), possivelmente, fatores nutricionais e ambientais poderiam afetar o equilíbrio ácido-básico e, conseqüentemente, o pH do sêmen.

A concentração espermática variou de $52,29 \times 10^6$ sptz/ml a $2.489,36 \times 10^6$ sptz/ml, com média de $725,75 \times 10^6$ sptz/ml, valores dentro dos encontrados na literatura que variaram de 7×10^6 sptz/ml a $5.400,00 \times 10^6$ sptz/ml (MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004).

Com exceção de cinco colheitas que tiveram motilidades extremamente baixas (de 5 a 20%), a motilidade total ficou entre 50 e 90%, com média de 60%, valores também dentro do relatado nos trabalhos anteriores que variaram de 30 a 95%

(MORELAND et al., 2001; VALLE et al., 2004). Com exceção das mesmas cinco colheitas em que a motilidade progressiva também ficou extremamente baixa (entre 0 e 10%), a motilidade progressiva variou de 20 a 80%, com média de 47,15%. Nos demais estudos a motilidade progressiva foi avaliada de outra forma, sendo classificada em uma escala de 0 a 5, o que impossibilita a comparação dos resultados.

A porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (anteriormente classificados como espermatozoides vivos) variou de 19 a 82%, com média de 47,15%, inferior à média de 68,3% relatada por VALLE et al. (2004), porém com variação próxima à de 21 a 90%, relatada por estes autores. Isso indica que o presente trabalho apresentou maior número de animais com sêmen de qualidade inferior do que o trabalho anterior, o que pode ser decorrente da idade, do manejo e da alimentação dos animais.

A porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro variou de 24 a 83%, com médias de 56,15% (coloração simples) e 58,96% (Spermac). Não foram encontrados relatos de avaliação da integridade de acrossoma em sêmen de *Alouatta caraya*, o que ressalta a importância da obtenção destes dados para a espécie, uma vez que o acrossoma contém enzimas envolvidas no processo de fecundação (GARNER & HAFEZ, 2004) e, portanto, a porcentagem de espermatozoides com acrossomas íntegros está diretamente ligada à fertilidade do sêmen. A média encontrada foi próxima das médias de 61,8 e 67,4%, encontradas para sêmen de *Cebus apella*, (PAZ et al., 2006a, 2006b), e de 61 e 65%, encontradas para sêmen de *Callimico goeldii*, (ARAKAKI et al., 2011). Porém, foi inferior às médias de 84,13% e 85,04% encontradas para sêmen de *Callithrix jacchus* no Brasil e na Alemanha, respectivamente (VALLE, 2007), e de 78,9% para sêmen de *Callithrix penicillata* (MASSAROTO et al., 2010).

Com relação à atividade citoquímica mitocondrial, 58,67% dos espermatozoides apresentaram atividade mitocondrial alta (Classes I e II), valor inferior ao relatado para sêmen de *Callithrix penicillata* em que 78,3% dos espermatozoides foram classificados como Classe I (MASSAROTO et al., 2010). Além das diferenças decorrentes do fato de serem espécies diferentes, essa inferioridade na qualidade do sêmen, tanto com

relação à integridade de acrossoma, como com relação à atividade mitocondrial, pode ser decorrente do método de colheita, visto que no presente trabalho e nos trabalhos realizados com *Cebus apella* e *Callimico goeldii* o sêmen foi colhido por eletroejaculação, enquanto nos trabalhos com *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*, o sêmen foi colhido por vibroestimulação peniana. Estudos realizados com *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997, 1998) e *Callithrix jacchus* (SCHNEIDERS et al., 2004) demonstraram que o sêmen colhido por vibroestimulação peniana possui qualidade superior quando comparado ao colhido por eletroejaculação.

Os dados apresentados no Quadro 1 são relativos à análise de correlação entre os parâmetros avaliados em sêmen fresco. O volume correlacionou positivamente com o pH, motilidade total, motilidade progressiva e integridade de acrossoma. A partir dessas informações pode-se inferir que quanto maior o volume, maior a contribuição das vesículas seminais, visto que a secreção destas glândulas possui pH alcalino (WHO, 2010), o que proporciona aumento do pH seminal. Além disso, é possível que a secreção proveniente das vesículas seminais contenha substâncias que contribuem para o aumento da motilidade e manutenção da integridade de acrossoma.

A concentração correlacionou positivamente com as motilidades total e progressiva, com a integridade de acrossoma e com a atividade mitocondrial classes I e III. Isso, provavelmente, reflete o aumento da qualidade geral do sêmen a cada colheita, fato que foi observado ao longo do estudo. O mesmo vale para as correlações entre os demais parâmetros que não dependem um do outro. Já a correlação observada entre a motilidade total e a progressiva era esperada, visto que a motilidade total inclui a motilidade progressiva. Adicionalmente, as correlações observadas entre as diferentes classes de atividade mitocondrial também eram esperadas já que são classes dentro de um mesmo parâmetro. Contudo, a correlação negativa entre a motilidade total e a atividade mitocondrial classe I, é um dado paradoxal, que pode refletir uma possível dificuldade do DAB em penetrar a membrana do espermatozoide de *Alouatta caraya*, conforme sugerido por HRUDKA (1987) para sêmen de suínos. A atividade mitocondrial classe I apresentou tendência estatística ($P=0,0773$) de correlação negativa ($r=-0,36749$) com a integridade de membrana plasmática. Adicionalmente, os dados

observados na comparação entre o sêmen fresco e o criopreservado demonstram que ao mesmo tempo em que a atividade mitocondrial classe I aumentou após a descongelação, a integridade de membrana diminuiu. Ambos os resultados corroboram a suposição de que existe certa dificuldade do DAB em penetrar a membrana plasmática íntegra do espermatozoide de *Alouatta caraya*.

Quadro 1. Análise da correlação entre os parâmetros avaliados em sêmen fresco de *Alouatta caraya*. O primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação (r) e o segundo valor corresponde ao P (probabilidade estatística).

Parâmetro	Vol	pH	Conc	Mot	MotP	IMP	IA (Spermac)	IA (Pope)	ACM Classe I	ACM Classe II	ACM Classe III	ACM Classe IV
Vol	1,00	0,38799 (0,0502)	0,14295 (0,4860)	0,53668 (0,0047)	0,53701 (0,0047)	0,03508 (0,8649)	0,33801 (0,0912)	0,44251 (0,0236)	0,17187 (0,4219)	-0,04773 (0,8247)	0,02638 (0,9026)	-0,04168 (0,8467)
pH		1,00	0,10549 (0,6080)	-0,11281 (0,5832)	-0,06931 (0,7365)	-0,01546 (0,9402)	0,14522 (0,4791)	0,14075 (0,4928)	0,14047 (0,5127)	0,22314 (0,2946)	-0,31178 (0,1380)	-0,06363 (0,7677)
Conc			1,00	0,45476 (0,0196)	0,47959 (0,0132)	0,35443 (0,0756)	0,57143 (0,0023)	0,55286 (0,0034)	0,72910 ($<0,0001$)	-0,43181 (0,0351)	0,45369 (0,0260)	0,37252 (0,0730)
Mot				1,00	0,96840 ($<0,0001$)	0,37518 (0,0589)	0,64337 (0,0004)	0,69924 ($<0,001$)	-0,55373 (0,0050)	-0,11979 (0,5771)	0,28731 (0,1734)	-0,01325 (0,9510)
MotP					1,00	0,42075 (0,0323)	0,61337 (0,0009)	0,65829 (0,003)	-0,47779 (0,0182)	-0,08317 (0,6992)	0,22169 (0,2978)	-0,00967 (0,9642)
IMP						1,00	0,45112 (0,0207)	0,41578 (0,0346)	-0,36749 (0,0773)	0,16398 (0,4439)	-0,05453 (0,8002)	-0,2477 (0,243)
IA (Spermac)							1,00	0,96525 ($<0,0001$)	-0,64082 (0,0007)	-0,05146 (0,8113)	0,15115 (0,4808)	-0,06200 (0,7735)
IA (Pope)								1,00	-0,68699 (0,0002)	-0,01853 (0,9315)	0,15940 (0,4569)	-0,08162 (0,7046)
ACM Classe I									1,00	0,43973 (0,0315)	-0,62101 (0,0012)	-0,31713 (0,1311)
ACM Classe II										1,00	-0,86132 ($<0,0001$)	-0,82208 ($<0,0001$)
ACM Classe III											1,00	0,62352 (0,0011)

Vol=volume; Conc=concentração; Mot=motilidade total; MotP=motilidade progressiva; IMP=integridade de membrana plasmática; IA=integridade de acrossoma; ACM=atividade citotóxica mitocondrial.

2. EXPERIMENTO II – Efeito da criopreservação com diferentes diluidores

Os dados das Tabelas 5 a 8 e as Figuras 21 a 26 refletem o desempenho de cada diluidor testado – Test-lecitina de soja com glicerol 3% (L3) ou 4% (L4) e Test-gema de ovo com glicerol 3% (G3) ou 4% (G4) – por meio da comparação entre os parâmetros analisados no sêmen fresco e no sêmen criopreservado com cada diluidor. De modo geral, o sêmen criopreservado com diluidores à base de gema de ovo teve

desempenho semelhante ao criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com relação ao sêmen fresco, quanto à motilidade total, motilidade progressiva, integridade de membrana e atividade citoquímica mitocondrial. Entretanto, o sêmen criopreservado com diluidores à base de gema de ovo teve desempenho melhor quanto à suscetibilidade ao estresse oxidativo (TBARS) e à suscetibilidade da cromatina à desnaturação ácida (IFD).

Tabela 5. Dados (média $\pm$ erro padrão) e resultados do teste t de Student referentes ao exame de sêmen (n=20) de *Alouatta caraya* antes e após a criopreservação com diluidor à base de lecitina de soja com glicerol a 3%.

Parâmetro	Sêmen fresco	Sêmen congelado	P
Motilidade Total	73,00 $\pm$ 3,25	20,15 $\pm$ 2,86	<0,0001
Motilidade Progressiva	59,50 $\pm$ 3,94	8,80 $\pm$ 1,92	<0,0001
Membrana Plasmática Íntegra	50,00 $\pm$ 3,80	20,15 $\pm$ 2,86	<0,0001
Acrossoma Íntegro	65,70 $\pm$ 2,80	69,30 $\pm$ 1,80	0,2862
ACM Classe I	4,72 $\pm$ 1,09	27,25 $\pm$ 2,34	<0,0001
ACM Classe II	49,83 $\pm$ 5,47	39,50 $\pm$ 2,19	0,0932
ACM Classe III	34,56 $\pm$ 4,24	24,90 $\pm$ 1,70	0,0460
ACM Classe IV	10,89 $\pm$ 3,04	8,35 $\pm$ 0,91	0,4329
TBARS	166,13 $\pm$ 53,76	522,04 $\pm$ 156,22	0,0423
IFD	14,54 $\pm$ 3,86	28,64 $\pm$ 5,70	0,0476

Os valores em negrito indicam P significativo ao nível de 5%. ACM=atividade citoquímica mitocondrial; TBARS=espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; IFD=índice de fragmentação de DNA.

Tabela 6. Dados (média $\pm$ erro padrão) e resultados do teste t de Student referentes ao exame de sêmen (n=20) de *Alouatta caraya* fresco e criopreservado com diluidor à base de lecitina de soja com glicerol a 4%.

Parâmetro	Sêmen fresco	Sêmen congelado	P
Motilidade Total	73,00 $\pm$ 3,25	20,45 $\pm$ 2,21	<0,0001
Motilidade Progressiva	59,50 $\pm$ 3,94	7,00 $\pm$ 1,19	<0,0001
Membrana Plasmática Íntegra	50,00 $\pm$ 3,80	19,50 $\pm$ 2,17	<0,0001
Acrossoma Íntegro	65,70 $\pm$ 2,80	71,00 $\pm$ 2,29	0,1509
ACM Classe I	4,72 $\pm$ 1,09	26,95 $\pm$ 2,67	<0,0001
ACM Classe II	49,83 $\pm$ 5,47	38,05 $\pm$ 2,29	0,0591
ACM Classe III	34,56 $\pm$ 4,24	25,00 $\pm$ 1,39	0,0444
ACM Classe IV	10,89 $\pm$ 3,04	10,00 $\pm$ 2,13	0,8092
TBARS	166,13 $\pm$ 53,76	485,35 $\pm$ 147,00	0,0532
IFD	14,54 $\pm$ 3,86	30,60 $\pm$ 6,49	0,0415

Os valores em negrito indicam P significativo ao nível de 5%. ACM=atividade citoquímica mitocondrial; TBARS=espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; IFD=índice de fragmentação de DNA.

Tabela 7. Dados (média $\pm$ erro padrão) e resultados do teste t de Student referentes ao exame de sêmen (n=20) de *Alouatta caraya* fresco e criopreservado com diluidor à base de gema de ovo com glicerol a 3%.

Parâmetro	Sêmen fresco	Sêmen congelado	P
Motilidade Total	73,00 $\pm$ 3,25	22,55 $\pm$ 2,63	<0,0001
Motilidade Progressiva	59,50 $\pm$ 3,94	12,80 $\pm$ 2,25	<0,0001
Membrana Plasmática Íntegra	50,00 $\pm$ 3,80	27,45 $\pm$ 2,80	<0,0001
Acrossoma Íntegro	65,70 $\pm$ 2,80	64,95 $\pm$ 2,23	0,8352
ACM Classe I	4,72 $\pm$ 1,09	28,20 $\pm$ 2,19	<0,0001
ACM Classe II	49,83 $\pm$ 5,47	43,05 $\pm$ 2,42	0,2684
ACM Classe III	34,56 $\pm$ 4,24	20,80 $\pm$ 1,66	0,0063
ACM Classe IV	10,89 $\pm$ 3,04	7,05 $\pm$ 0,98	0,2430
TBARS	166,13 $\pm$ 53,76	342,50 $\pm$ 150,52	0,2815
IFD	14,54 $\pm$ 3,86	19,12 $\pm$ 4,90	0,4674

Os valores em negrito indicam P significativo ao nível de 5%. ACM=atividade citoquímica mitocondrial; TBARS=espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; IFD=índice de fragmentação de DNA.

Tabela 8. Dados (média $\pm$ erro padrão) e resultados do teste t de Student referentes ao exame de sêmen (n=20) de *Alouatta caraya* fresco e criopreservado com diluidor à base de gema de ovo com glicerol a 4%.

Parâmetro	Sêmen fresco	Sêmen congelado	P
Motilidade Total	73,00 $\pm$ 3,25	26,40 $\pm$ 2,98	<0,0001
Motilidade Progressiva	59,50 $\pm$ 3,94	16,80 $\pm$ 2,55	<0,0001
Membrana Plasmática Íntegra	50,00 $\pm$ 3,80	27,15 $\pm$ 3,08	<0,0001
Acrossoma Íntegro	65,70 $\pm$ 2,80	66,75 $\pm$ 2,26	0,7719
ACM Classe I	4,72 $\pm$ 1,09	28,80 $\pm$ 2,15	<0,0001
ACM Classe II	49,83 $\pm$ 5,47	38,80 $\pm$ 2,56	0,0802
ACM Classe III	34,56 $\pm$ 4,24	22,80 $\pm$ 1,57	0,0165
ACM Classe IV	10,89 $\pm$ 3,04	9,60 $\pm$ 1,18	0,6965
TBARS	166,13 $\pm$ 53,76	272,66 $\pm$ 95,56	0,3390
IFD	14,54 $\pm$ 3,86	21,89 $\pm$ 22,55	0,2545

ACM=atividade citoquímica mitocondrial; TBARS=espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; IFD=índice de fragmentação de DNA.

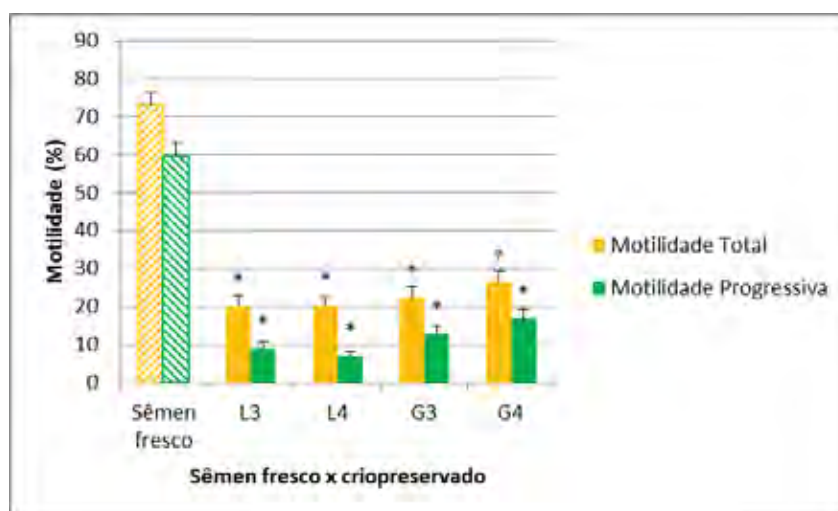


Figura 21. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de motilidade total e progressiva, referentes ao sêmen de *Alouatta caraya* fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). *indica diferença estatística do sêmen criopreservado em relação ao fresco pelo teste LSD.

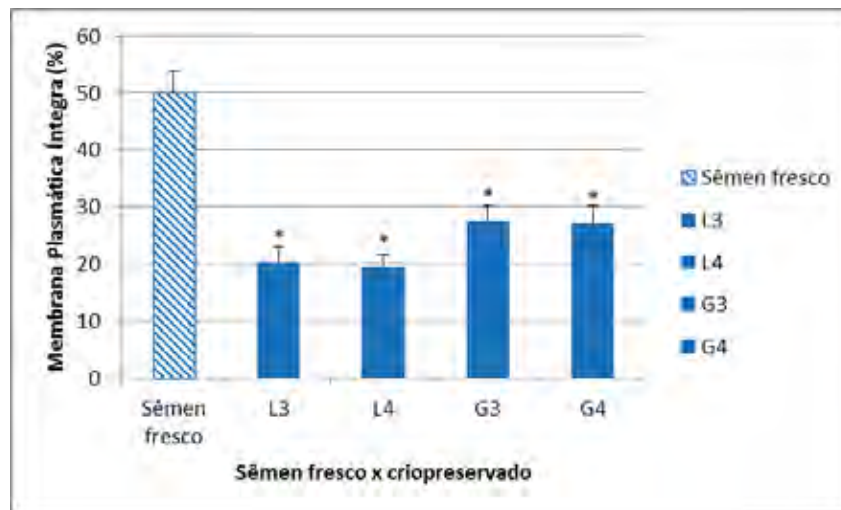


Figura 22. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de membrana plasmática íntegra, referentes ao sêmen de *Alouatta caraya* fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). *indica diferença estatística do sêmen criopreservado em relação ao fresco pelo teste LSD.

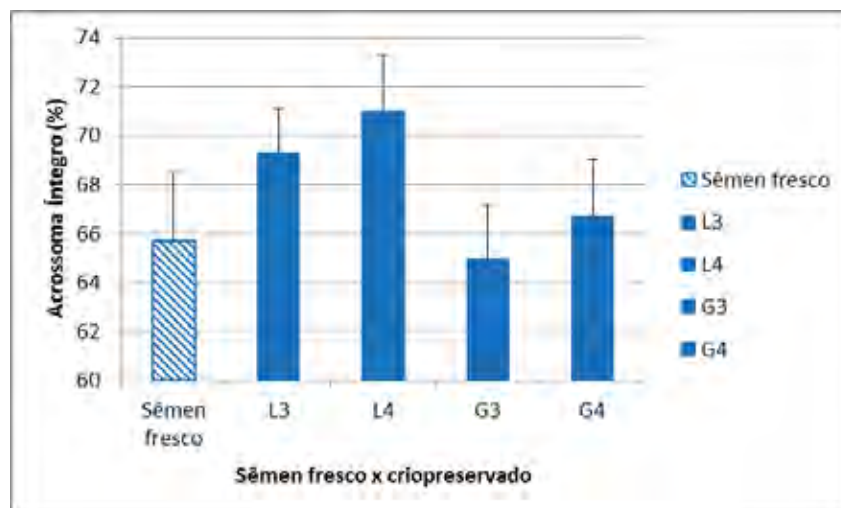


Figura 23. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de integridade de acrossoma, referentes ao sêmen de *Alouatta caraya* fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4).

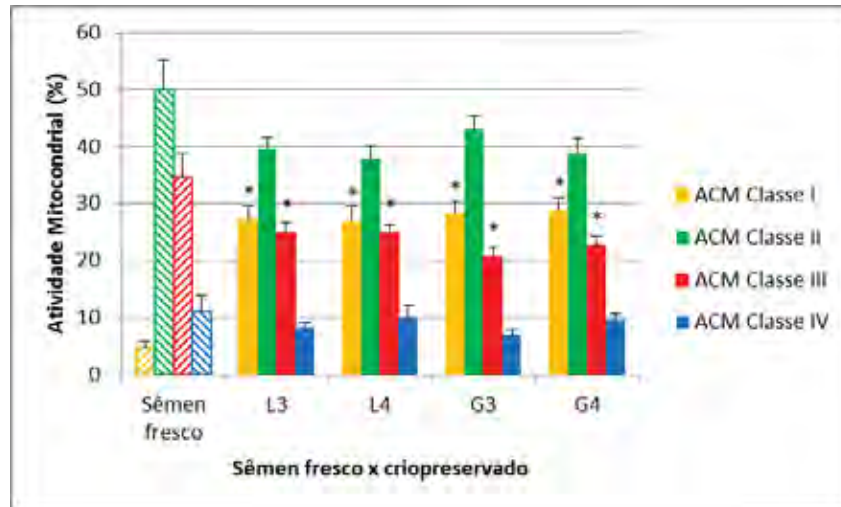


Figura 24. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de atividade citoquímica mitocondrial (ACM), referentes ao sêmen de *Alouatta caraya* fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). *indica diferença estatística do sêmen criopreservado em relação ao fresco pelo teste LSD.

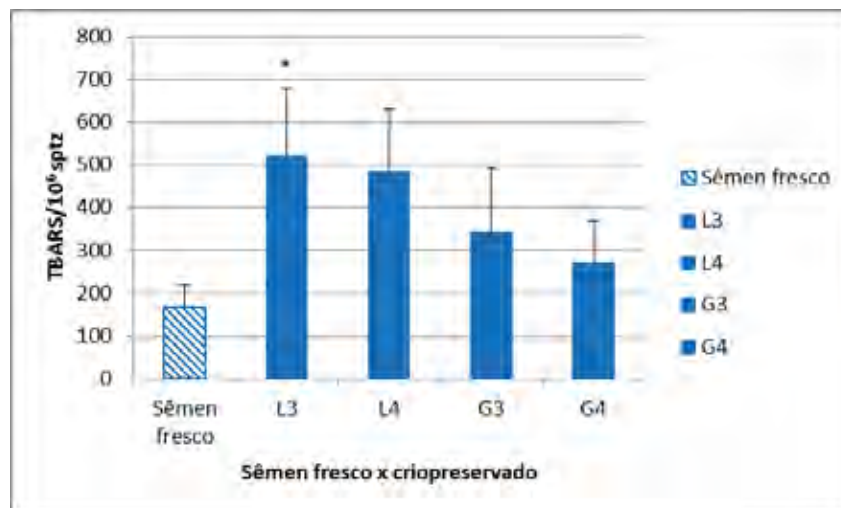


Figura 25. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de concentração de TBARS, referentes ao sêmen de *Alouatta caraya* fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). *indica diferença estatística do sêmen criopreservado em relação ao fresco pelo teste LSD.

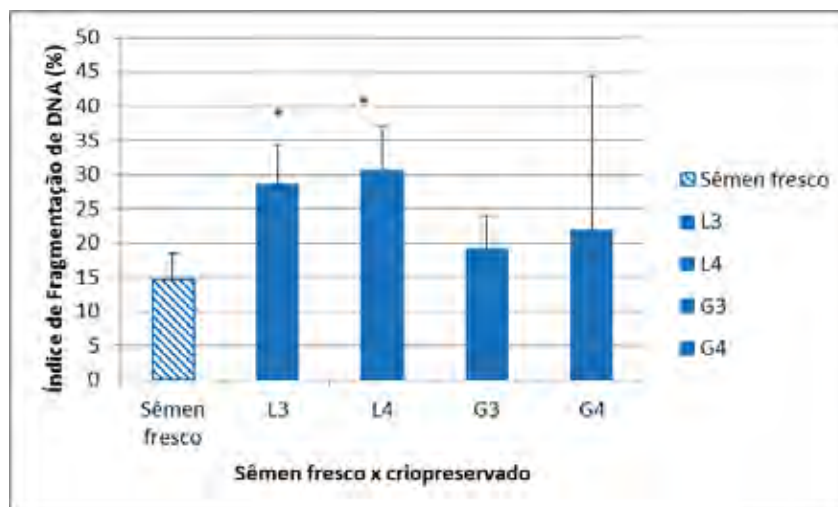


Figura 26. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de índice de fragmentação de DNA, referentes ao sêmen de *Alouatta caraya* fresco e criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). *indica diferença estatística do sêmen criopreservado em relação ao fresco pelo teste LSD.

O sêmen criopreservado apresentou diminuição significativa dos parâmetros motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática com relação ao sêmen fresco, independente do diluidor utilizado. A diminuição da motilidade e da integridade de membrana plasmática era esperada devido aos danos causados pelo processo de congelação. Entretanto, a queda desses parâmetros foi muito brusca. Vários fatores relativos tanto aos diluidores, como ao protocolo de congelação poderiam ser responsáveis pela resposta obtida no presente trabalho. Uma possível causa para isto seria a hiperosmolalidade dos meios utilizados. Segundo MORELAND et al. (2001) o sêmen de *Alouatta caraya* possui osmolalidade de $356,70 \pm 26,10$ mmol/kg. Um estudo que comparou vários diluidores para criopreservação de sêmen de *Macaca fascicularis*, mostrou melhores resultados para diluidores com hiperosmolalidade moderada (344-425 mOsm/kg) com relação ao sêmen (LI et al., 2005). No presente estudo a osmolalidade dos meios diluidores não foi avaliada, porém no estudo de LI et al. (2005), um diluidor muito semelhante aos diluidores à base de gema de ovo utilizados neste estudo apresentou osmolalidade de 728 mOsm/kg, o que caracteriza

hiperosmolalidade alta com relação ao sêmen de *Alouatta caraya*. A utilização de diluidores com osmolalidade mais próxima da osmolalidade do sêmen seria uma possível solução para esse problema. Outra possível causa para a queda destes parâmetros seria a lesão osmótica causada pela adição do glicerol (GAO et al., 1995). Apesar de já ter sido demonstrado que a adição de glicerol em fração única é benéfica em algumas espécies (MORRIER et al., 2002; SALOMON & RITAR, 1982; SILVA et al., 2003), a tolerância ao estresse osmótico pode variar de espécie para espécie. Para seres humanos determinou-se que o ideal para minimizar a lesão osmótica é a adição do glicerol em quatro frações com molaridade fixa e remoção em oito frações com molaridade fixa (GAO et al., 1995). Possivelmente, a utilização deste protocolo seja mais apropriada para sêmen de *Alouatta caraya*. Além disso, o diluidor foi adicionado a 37°C, o que pode ter aumentado a toxicidade do glicerol. A adição do glicerol em temperaturas mais baixas poderia reduzir a toxicidade do mesmo (GAO et al., 1995) com consequente melhora da qualidade do sêmen criopreservado. Outro fator que pode ter influenciado negativamente esses parâmetros é a curva de congelação utilizada. Utilizou-se, empiricamente, a curva padrão estabelecida para bovinos. Entretanto, essa curva é utilizada para palhetas de 250 µl, enquanto no presente trabalho utilizaram-se palhetas de 100 µl. Por ser um volume menor, a velocidade de resfriamento provavelmente foi maior, o que pode ter influenciado negativamente tanto na integridade de membrana como na motilidade dos espermatozoides. Possivelmente, a utilização de uma curva de congelação mais lenta poderia ser mais adequada para o volume de sêmen utilizado.

Com relação à atividade citoquímica mitocondrial, o sêmen criopreservado apresentou aumento significativo da classe I e diminuição significativa da classe III com relação ao sêmen fresco, independente do diluidor utilizado. Como descrito por HRUDKA (1987), existem substâncias que podem inibir a atividade mitocondrial reversível ou irreversivelmente. Isso poderia ser uma possível causa para o aumento da atividade mitocondrial pós-descongelação. Ou seja, alguma substância presente no plasma seminal, ou na solução de Ringer com lactato poderia atuar como inibidor da atividade mitocondrial. Ao diluir o sêmen com os diluidores crioprotetores, essa inibição

teria sido diminuída ou até cessada, com consequente aumento da atividade mitocondrial. Ainda segundo este autor, o DAB penetra facilmente a membrana plasmática intacta em várias espécies, mas tem dificuldade em penetrar a membrana do espermatozoide suíno. Embora o autor não discuta as possíveis causas desta dificuldade, é possível que também exista certa dificuldade em penetrar o espermatozoide de *Alouatta caraya*. A instabilidade das membranas plasmáticas no pós-descongelamento poderia facilitar a penetração do corante na célula, e isto teria aumentado o número de espermatozoides com a bainha mitocondrial totalmente corada (classe I) e, conseqüentemente, diminuído os espermatozoides classificados como classe III. Mais estudos são necessários para avaliar se realmente existe essa dificuldade e determinar as causas.

A suscetibilidade ao estresse oxidativo foi significativamente maior após a criopreservação apenas para o sêmen criopreservado com o diluidor L3. Já a fragmentação de DNA foi significativamente maior para o sêmen criopreservado com os diluidores L3 e L4. Os dados sugerem que a lecitina de soja conferiu menor proteção da membrana plasmática, deixando o espermatozoide mais suscetível ao estresse oxidativo, com consequente fragmentação de DNA. Possivelmente, a concentração de lecitina de soja utilizada (1%) tenha sido muito baixa para a espécie em questão, o que impossibilitou a proteção necessária para impedir os efeitos deletérios da criopreservação. São necessários estudos com outras concentrações de lecitina de soja para avaliar a viabilidade deste aditivo para congelamento de sêmen de *Alouatta caraya* e de outros primatas não-humanos. O glicerol também foi um fator importante, visto que os espermatozoides congelados com glicerol a 3% foram mais suscetíveis ao estresse oxidativo do que aqueles congelados com glicerol a 4%. A partir destes resultados, pode-se inferir que, se respeitada a tolerância ao estresse osmótico e a temperatura ideal para adição do glicerol, os espermatozoides dessa espécie podem ser beneficiados por concentrações maiores de glicerol.

Como não foram encontrados relatos de criopreservação de sêmen de *Alouatta caraya*, os dados obtidos neste experimento foram comparados com os obtidos em outras espécies de PN, quando disponíveis, ou de PVM.

As médias de motilidade total pós-descongelação variaram de 20,15 a 26,40%, dependendo do diluidor utilizado. Essas médias foram mais baixas que as médias de 51,80 e 53,80%, obtidas para sêmen de dois machos de *Saimiri sciureus* (DENIS et al., 1976) e de 41% obtida para sêmen de *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997). Também foram mais baixas do que os valores de 50 a 70% obtidos para sêmen de *Saguinus labiatus* (SANKAI et al., 1997), todavia, estes últimos lavaram o sêmen antes e após a congelação pelo método Percoll 90%, o que elimina grande parte dos espermatozoides mortos ou imóveis, aumentando, assim, a porcentagem de espermatozoides móveis. Quando comparados aos resultados obtidos por VALLE (2007), para sêmen de *Callithrix jacchus*, que variaram de 0 a 7,38%, a motilidade total foi bem maior e, em ambos os casos, foram considerados todos os espermatozoides, pois não houve lavagem da amostra após a descongelação. Quanto à motilidade progressiva pós-descongelação, apenas o trabalho de VALLE (2007) relata esse parâmetro, sendo que os valores de 8,80 a 16,80%, obtidos no presente trabalho, superam os valores de 0 a 4,23% obtidos para sêmen de *Callithrix jacchus*. Além de se tratar de espécies diferentes, fato que poderia explicar esta diferença, os protocolos de congelação utilizados em cada estudo foram diferentes e este fator pode ter contribuído ainda mais para os valores mais altos no presente estudo. Uma diferença importante entre os estudos que pode ter influenciado nos valores foi o uso de um congelador automático para a congelação do sêmen de *Alouatta caraya*, o que propiciou maior controle e regularidade na curva de resfriamento e de congelação.

Com relação à integridade de membrana plasmática (anteriormente denominada vitalidade espermática) pós-descongelação, as médias variaram de 20,15 a 27,15%. Estas médias foram superiores à média de 13,20% (diluidor à base de água de coco com glicerol a 2,5%) e semelhantes à média de 26,20% (diluidor TES-TRIS com glicerol a 3,5%) obtidas para sêmen de *Cebus apella* (OLIVEIRA et al., 2011). De acordo com estes autores a média inferior (13,20%), provavelmente foi consequência da concentração menor de glicerol utilizada, o que também ocorreu no presente trabalho. Ou seja, concentrações maiores de glicerol foram benéficas para a integridade de membrana em ambos os trabalhos. Quando comparadas ao trabalho de VALLE (2007),

que avaliou três protocolos de congelação diferentes, as médias foram superiores às médias de 2,5% (sem fase de equilíbrio e de vapor) e 18% (sem fase de equilíbrio), e semelhantes à média de 24,96% (com fase de equilíbrio e de vapor), obtidas com os diferentes protocolos de congelação. Neste último trabalho a utilização tanto da fase de equilíbrio, como da fase de vapor foram benéficas para manutenção da integridade de membrana. No presente trabalho foi utilizada fase de equilíbrio semelhante ao trabalho de VALLE (2007), o que justifica os resultados semelhantes.

A integridade de acrossoma pós-descongelção variou de 64,95 a 71,00%, valores bem superiores aos obtidos por VALLE (2007), para sêmen de *Callithrix jacchus*, que variaram de 16,58 a 33,38%. Os resultados indicam que o acrossoma dos espermatozoides de *Alouatta caraya* é bastante resistente visto que a porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro foi mantida após a congelção, independente do diluidor utilizado. Em trabalhos futuros, é importante observar se as alterações necessárias para melhorar os demais parâmetros não vão atuar negativamente na integridade de acrossoma.

Levando em consideração a soma das classes I e II de atividade citoquímica mitocondrial pós-descongelção, que indicam boa atividade mitocondrial, as médias variaram de 65,00 a 71,30%, valores próximos das médias obtidas por VALLE (2007), para sêmen de *Callithrix jacchus*, que variaram de 72,30 a 76,00%. Essa consistência nos dados para ambas as espécies, independente do protocolo utilizado para criopreservação, permite inferir que a respiração celular não foi afetada pelo processo de congelção, ou seja, os espermatozoides se mantiveram vivos e respirando após a criopreservação. A ausência de motilidade na maior parte dos espermatozoides não foi decorrente de morte celular. Outros processos estão envolvidos na perda de motilidade. Como afirmado por HRUDKA (1987), a motilidade e a fertilidade dos espermatozoides são funções superiores que não dependem somente da citocromo c oxidase, mas de muitos outros fatores. A citocromo c oxidase está relacionada com a geração de energia, enquanto a motilidade está relacionada com a utilização da mesma.

As médias de peroxidação lipídica variaram de 272,66 a 522,04 mg de TBARS/10⁶ sptz. Como apontado na Introdução deste trabalho, o acúmulo de

hidroperóxidos e a formação de produtos citotóxicos alteram a membrana celular e geram transtornos de permeabilidade com consequentes alterações de DNA, proteínas e componentes da matriz extracelular (LUZ et al., 2011). Apesar do papel fisiológico da peroxidação lipídica no processo de capacitação do espermatozoide, segundo AITKEN et al. (1989), a peroxidação lipídica é mais acelerada em populações de espermatozoides defeituosos, os quais se tornam refratários aos sinais de cálcio, de forma que a fusão espermatozoide-oócito não ocorra na presença de ionóforo A23187. Ou seja, quando a peroxidação lipídica é muito alta, os espermatozoides ficam incapacitados para a fusão com o oócito. As médias de concentração de TBARS do sêmen congelado com diluidores à base de lecitina de soja foram significativamente maiores após a descongelação, enquanto as do sêmen congelado com diluidores à base de gema de ovo não diferiram do sêmen fresco. Possivelmente, o sêmen congelado com diluidores à base de gema de ovo tem maior probabilidade de sucesso na fusão com o oócito, visto que foi menos suscetível ao estresse oxidativo.

A média de índice de fragmentação de DNA (IFD) do sêmen fresco foi de 14,54%, valor maior do que os valores obtidos para sêmen fresco de *Macaca mulatta* que foram de 1,9 e 8,5%, para animais tratados com dieta com restrição calórica e dieta controle, respectivamente (SITZMANN et al., 2010). Entretanto, o valor obtido no presente trabalho está dentro dos valores de 11,2 e 15,5% para sêmen de homens de casais que obtiveram gestação dentro de três meses ou 4-12 meses, respectivamente (EVENSON & JOST, 2000). As médias de IFD pós-descongelação variaram de 19,12 a 30,60%, valores superiores ao de 17,2%, obtido para homens de casais que não obtiveram gestação por mais de um ano (EVENSON & JOST, 2000). Ainda segundo estes autores, amostras de sêmen humano com valores de IFD iguais ou maiores que 30%, provavelmente não serão capazes de fecundar o óvulo, tanto *in vivo* como *in vitro*. A partir desta informação, podemos inferir que as amostras criopreservadas com diluidores à base de gema de ovo (IFD de 19,12 e 21,89%) têm maior possibilidade de sucesso na fecundação quando comparadas as amostras congeladas com diluidores à base de lecitina de soja (IFD de 28,64 e 30,60%). Apesar dos índices de fragmentação relativamente altos, é possível que o sêmen criopreservado com os diluidores L3, G3 e

G4 seja viável para uso em fecundação *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), visto que apresentaram IFD inferior a 30%. Todavia, devemos levar em consideração que são espécies diferentes e as informações obtidas para sêmen humano podem não ser válidas para sêmen de *Alouatta caraya*.

3. EXPERIMENTO III – Efeito do tempo de incubação e do diluidor sobre as características seminais pós-descongelção

Os dados das Tabelas 9 a 11 refletem o desempenho do sêmen criopreservado com os diferentes diluidores ao longo do tempo pós-descongelção. A ANOVA mostrou que não houve interação entre os fatores tempo e tratamento para nenhum dos parâmetros. Quanto ao efeito do tratamento (Figuras 27 a 32), o sêmen criopreservado com os diluidores G3 e G4 teve desempenho melhor quanto aos parâmetros motilidade progressiva e integridade de membrana, enquanto o sêmen criopreservado com os diluidores L3 e L4 teve desempenho melhor quanto ao parâmetro integridade de acrossoma. Quanto ao efeito do tempo (Figuras 33 a 35), os parâmetros motilidade total e motilidade progressiva diminuíram significativamente dos 10 minutos aos 40 minutos pós-descongelção e se mantiveram dos 40 minutos aos 80 minutos pós-descongelção. Não houve diferença entre os diluidores ou entre os tempos para os demais parâmetros.

Tabela 9. Resultados da Análise de Variância (ANOVA) dos parâmetros avaliados em sêmen (n=20) de *Alouatta caraya* em três tempos pós-descongelamento (fator tempo) para comparação de quatro diluidores para criopreservação (fator tratamento).

Parâmetro	ANOVA		
	Tempo	TTM	Tempo*TTM
Motilidade Total	<0,0001	0,2210	0,8461
Motilidade Progressiva	<0,0001	<0,0001	0,0974
Membrana Plasmática Íntegra	0,1701	<0,0001	0,9665
Acrossoma Íntegro	0,1237	<0,0001	0,7144
ACM Classe I	0,0670	0,4120	0,9589
ACM Classe II	0,0591	0,7839	0,4853
ACM Classe III	0,7906	0,2619	0,9326
ACM Classe IV	0,3645	0,3854	0,9582
TBARS	-	0,5381	-
IFD	-	0,6532	-

C.V.=coeficiente de variação; TTM=tratamento; ACM=atividade citoquímica mitocondrial; TBARS=espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; IFD=índice de fragmentação de DNA.

Tabela 10. Resultados (média $\pm$ erro padrão) da Análise de Variância (ANOVA) e do teste de comparação de médias (LSD) dos parâmetros avaliados em sêmen (n=20) criopreservado de *Alouatta caraya* para o fator tratamento.

Parâmetro	Diluidor				P
	L3	L4	G3	G4	
Motilidade Total	15,59 $\pm$ 1,43	16,29 $\pm$ 1,18	17,68 $\pm$ 1,31	19,08 $\pm$ 1,55	0,2854
Motilidade Progressiva	5,12 $\pm$ 0,85 ^b	5,12 $\pm$ 0,62 ^b	9,23 $\pm$ 1,04 ^a	9,76 $\pm$ 1,21 ^a	0,0001
MPI	17,40 $\pm$ 1,50 ^b	18,22 $\pm$ 1,28 ^b	24,32 $\pm$ 1,64 ^a	26,76 $\pm$ 1,68 ^a	<0,0001
AI	70,04 $\pm$ 1,06 ^a	68,71 $\pm$ 1,20 ^a	63,71 $\pm$ 1,29 ^b	63,19 $\pm$ 1,43 ^b	<0,0001
ACM Classe I	25,90 $\pm$ 1,48	24,03 $\pm$ 1,33	27,20 $\pm$ 1,37	26,32 $\pm$ 1,27	0,4098
ACM Classe II	40,79 $\pm$ 1,26	42,15 $\pm$ 1,44	42,64 $\pm$ 1,42	41,22 $\pm$ 1,48	0,7791
ACM Classe III	23,98 $\pm$ 1,00	24,05 $\pm$ 0,93	21,66 $\pm$ 0,97	22,78 $\pm$ 0,97	0,2496
ACM Classe IV	9,33 $\pm$ 0,69	9,76 $\pm$ 0,84	8,36 $\pm$ 0,66	9,53 $\pm$ 0,61	0,3767
TBARS	522,04 $\pm$ 156,22	485,35 $\pm$ 147,00	342,50 $\pm$ 150,52	272,66 $\pm$ 95,56	0,5381
IFD	28,64 $\pm$ 5,70	30,60 $\pm$ 6,49	19,12 $\pm$ 4,90	21,89 $\pm$ 5,04	0,6532

MPI=membrana plasmática íntegra; AI=acrossoma íntegro; ACM=atividade citoquímica mitocondrial; TBARS=espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; IFD=índice de fragmentação de DNA; Diluidor L3=Test-lecitina de soja com glicerol 3%; Diluidor L4=Test-lecitina de soja com glicerol 4%; Diluidor G3=Test-gema de ovo com glicerol 3%; Diluidor G4=Test-gema de ovo com glicerol 4%.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste LSD

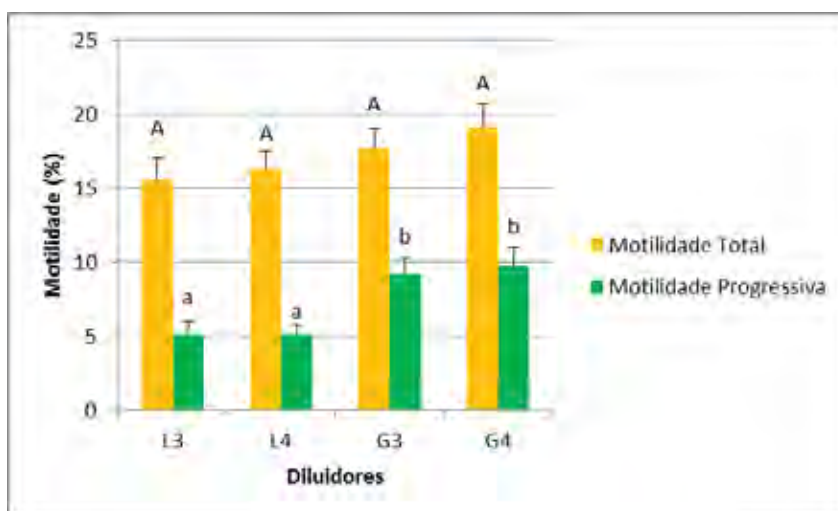


Figura 27. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de motilidade total e progressiva de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). Médias, referentes ao mesmo parâmetro, com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD.

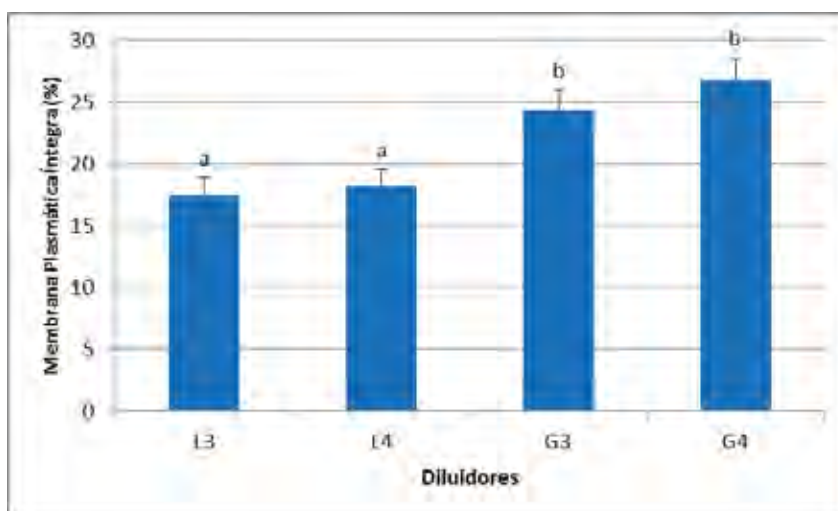


Figura 28. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de integridade de membrana plasmática de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). Médias com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD.

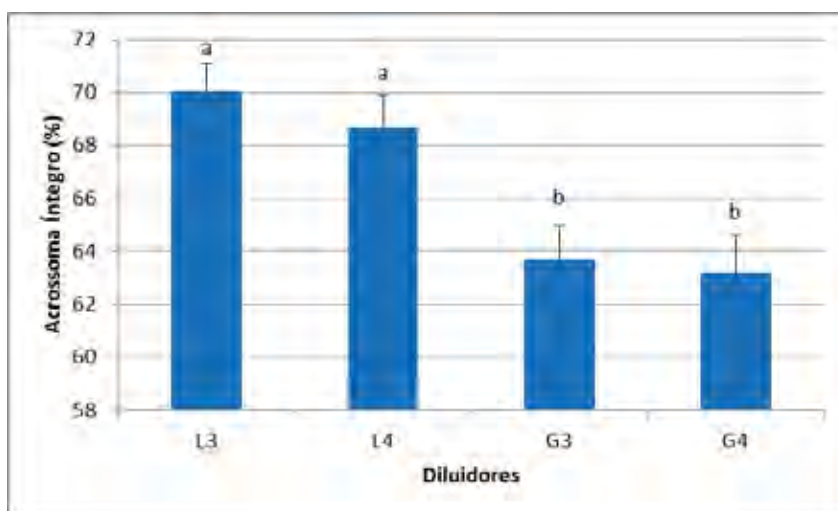


Figura 29. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de integridade de acrossoma de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4). Médias com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD.

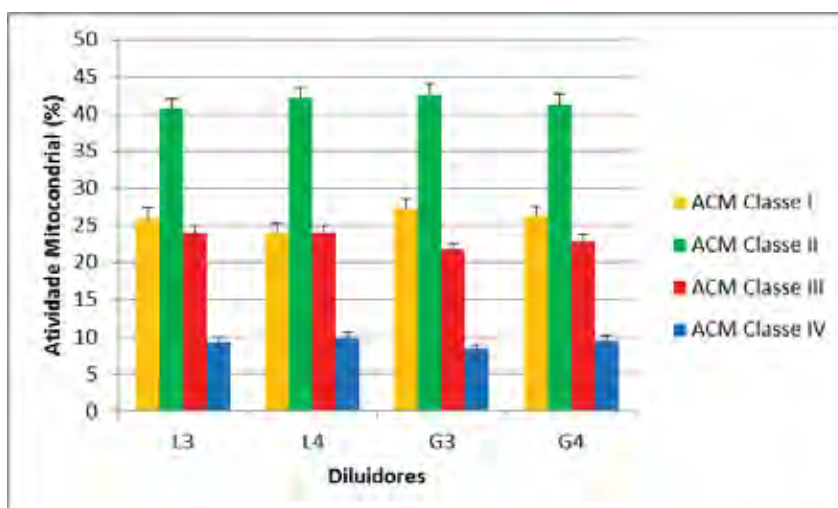


Figura 30. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de atividade citoquímica mitocondrial (ACM) de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4).

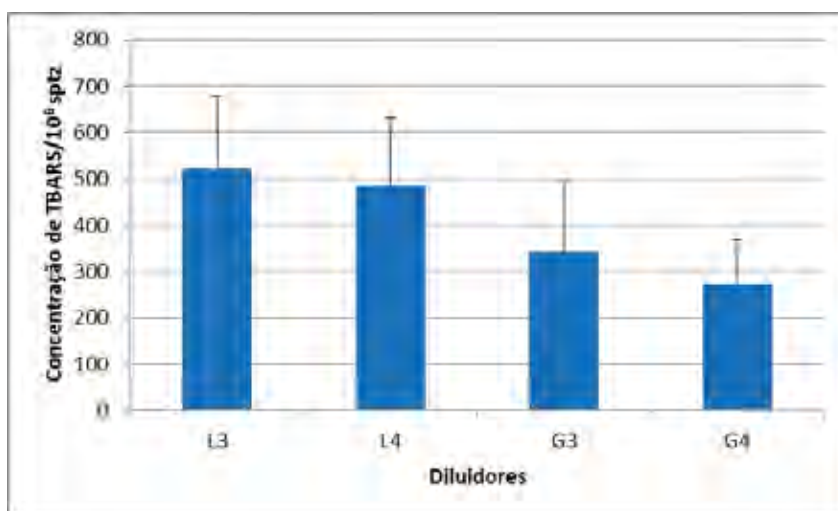


Figura 31. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de concentração de TBARS de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4).

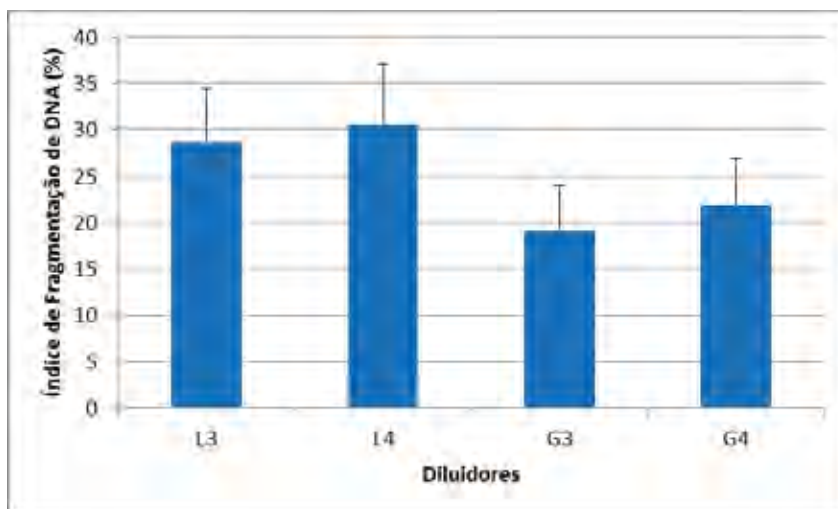


Figura 32. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de índice de fragmentação de DNA de sêmen de *Alouatta caraya* criopreservado com diluidores à base de lecitina de soja com glicerol a 3% (L3) ou 4% (L4) e de gema de ovo com glicerol a 3% (G3) ou 4% (G4).

Tabela 11. Resultados (média $\pm$ erro padrão) da Análise de Variância (ANOVA) e do teste de comparação de médias (LSD) dos parâmetros avaliados em sêmen (n=20) criopreservado de *Alouatta caraya* para o fator tempo.

Parâmetro	Tempo (min)			P
	10	40	80	
Motilidade Total	22,39 $\pm$ 1,35 ^a	15,55 $\pm$ 1,01 ^b	13,32 $\pm$ 0,92 ^b	<0,0001
Motilidade Progressiva	11,35 $\pm$ 1,09 ^a	5,79 $\pm$ 0,62 ^b	4,65 $\pm$ 0,54 ^b	<0,0001
MPI	23,56 $\pm$ 1,41	21,41 $\pm$ 1,37	20,00 $\pm$ 1,39	0,1941
AI	68,00 $\pm$ 1,09	66,19 $\pm$ 1,08	64,84 $\pm$ 1,22	0,1428
ACM Classe I	27,80 $\pm$ 1,15	25,80 $\pm$ 1,19	23,87 $\pm$ 1,17	0,0634
ACM Classe II	39,85 $\pm$ 1,18	41,48 $\pm$ 1,29	43,93 $\pm$ 1,10	0,0573
ACM Classe III	23,38 $\pm$ 0,80	23,31 $\pm$ 0,85	22,63 $\pm$ 0,87	0,7880
ACM Classe IV	8,75 $\pm$ 0,69	9,54 $\pm$ 0,55	9,45 $\pm$ 0,58	0,3573

MPI=membrana plasmática íntegra; AI=acrossoma íntegro; ACM=atividade citoquímica mitocôndria.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste LSD

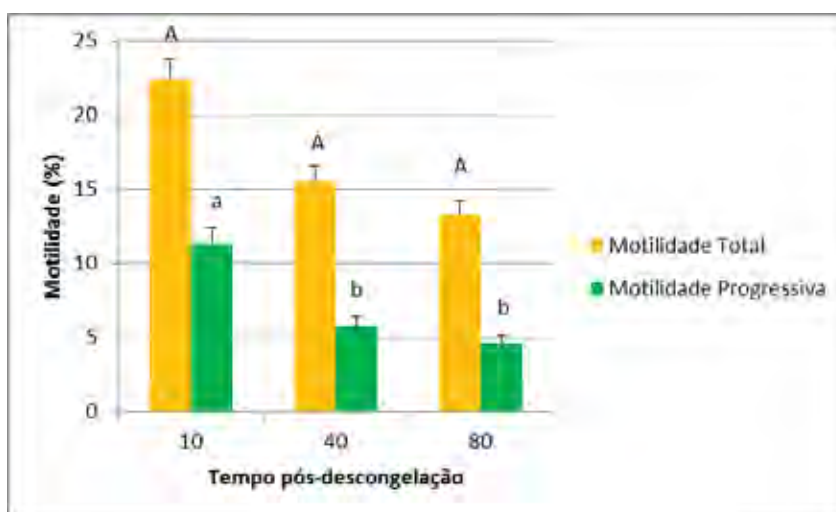


Figura 33. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de motilidade total e progressiva de sêmen descongelado de *Alouatta caraya* incubado em banho-maria a 37°C durante 10, 40 e 80 minutos pós-descongelamento. Médias, referentes ao mesmo parâmetro, com a mesma letra (acima das barras) não diferem entre si pelo teste LSD.

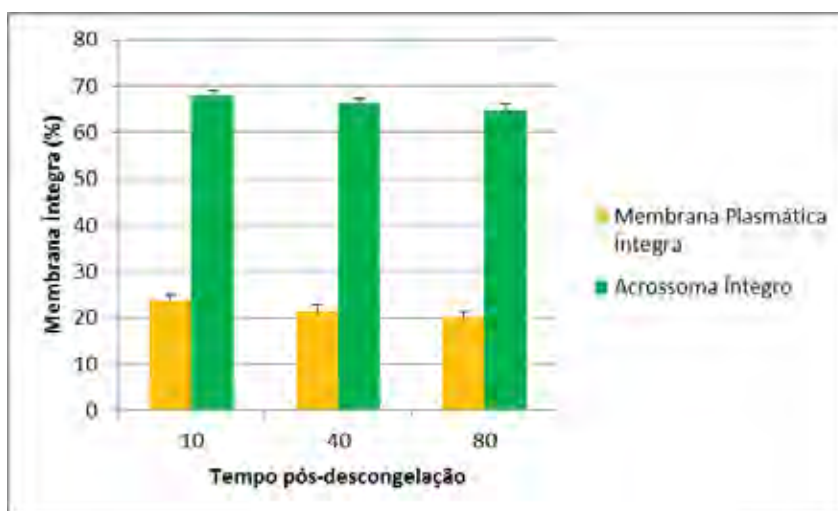


Figura 34. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de membrana plasmática e acrossoma íntegros de sêmen descongelado de *Alouatta caraya* incubado em banho-maria a 37°C durante 10, 40 e 80 minutos pós-descongelção.

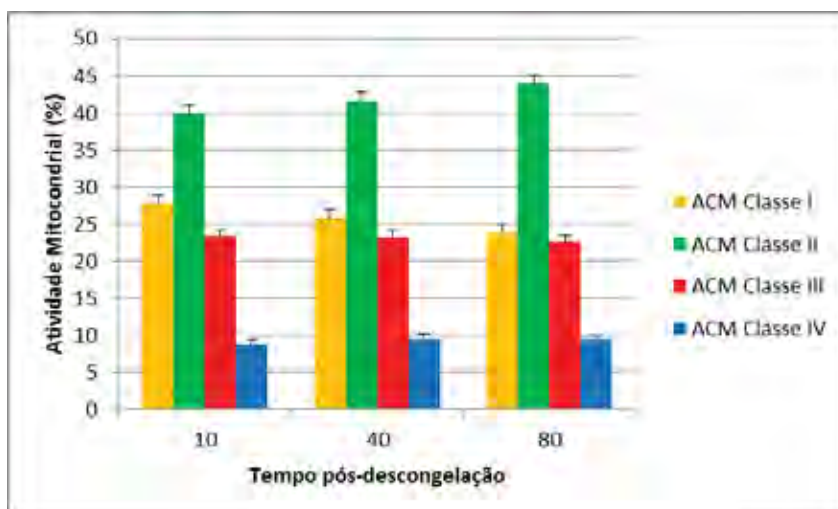


Figura 35. Representação gráfica das médias (colunas) e erros padrões (barras nos topos das colunas) de atividade citotóxica mitocondrial (ACM) de sêmen descongelado de *Alouatta caraya* incubado em banho-maria a 37°C durante 10, 40 e 80 minutos pós-descongelção.

De acordo com revisão realizada por STOREY (1997), a peroxidação lipídica causa lesão à membrana plasmática do espermatozoide, o que leva à perda dos

componentes do citosol e consequente morte celular, caracterizada por perda total da motilidade. Os resultados do presente experimento corroboram essas informações, visto que os espermatozoides com estresse oxidativo maior (diluidores L3 e L4), apresentaram integridade de membrana plasmática e motilidade progressiva significativamente menores do que os espermatozoides com estresse oxidativo menor (diluidores G3 e G4).

Os dados apresentados no Quadro 2 são referentes à análise de correlação entre os parâmetros analisados em sêmen criopreservado. Como esperado, houve correlação negativa da motilidade e da integridade de membrana plasmática com o estresse oxidativo (TBARS) e a fragmentação de DNA, de acordo com o discutido anteriormente. Ou seja, quanto maior o estresse oxidativo maior a fragmentação de DNA e menor a porcentagem de espermatozoides móveis e com membrana plasmática íntegra. Estes resultados sugerem que tanto a integridade de membrana plasmática quanto a motilidade são parâmetros importantes, ligados diretamente ao estresse oxidativo e à fragmentação de DNA, e devem ser preservados durante o processo de congelação para manutenção do potencial de fecundação dos espermatozoides.

Quadro 2. Análise da correlação entre os parâmetros avaliados em sêmen criopreservado de *Alouatta caraya*. O primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação (r) e o segundo valor corresponde ao P (probabilidade estatística).

Parâmetro	Mot	MotP	IMP	IA (Pope)	ACM Classe I	ACM Classe II	ACM Classe III	ACM Classe IV	TBARS	SCDA
Mot	1,00	0,81140 ($<0,0001$)	0,70424 ($<0,0001$)	0,12346 ($<0,0593$)	-0,03042 (0,6427)	-0,03849 (0,5572)	0,15453 (0,0178)	-0,08578 (0,1901)	-0,30152 (0,0077)	-0,25829 (0,0207)
MotP		1,00	0,58667 ($<0,0001$)	-0,05534 (0,3994)	0,01978 (0,7629)	-0,09063 (0,1661)	0,19046 (0,0034)	-0,04215 (0,5202)	-0,44147 ($<0,0001$)	-0,13551 (0,2307)
IMP			1,00	0,03137 (0,6330)	-0,05946 (0,3641)	0,11544 (0,0774)	-0,10383 (0,1124)	-0,14988 (0,0215)	-0,43720 ($<0,0001$)	-0,28307 (0,0110)
IA (Pope)				1,00	0,12753 (0,0514)	-0,09720 (0,1382)	-0,05151 (0,4329)	0,07335 (0,2637)	-0,04733 (0,6827)	-0,15952 (0,1575)
ACM Classe I					1,00	-0,55869 ($<0,0001$)	-0,43284 ($<0,0001$)	-16522 (0,0112)	-0,15305 (0,1839)	0,04640 (0,6827)
ACM Classe II						1,00	-0,34583 ($<0,0001$)	-0,41596 ($<0,0001$)	0,07795 (0,5004)	-0,12778 (0,2587)
ACM Classe III							1,00	0,30024 ($<0,0001$)	0,06843 (0,5543)	0,00960 (0,9326)
ACM Classe IV								1,00	-0,04914 (0,6713)	0,09754 (0,3894)
TBARS									1,00	0,16705 (0,1465)

Vol=volume; Conc=concentração; Mot=motilidade total; MotP=motilidade progressiva; IMP=integridade de membrana plasmática; IA=integridade de acrossoma; ACM=atividade citotóxica mitocondrial.

São necessários mais estudos para obtenção de um diluidor para criopreservação de sêmen dessa espécie que apresente resultados melhores, com motilidade de pelo menos 30%. Este trabalho trouxe informações inéditas a respeito de características seminais e aspectos da criopreservação de sêmen dessa espécie que servirão de base para estudos futuros, tanto com essa, como com outras espécies de primatas neotropicais.

VII. CONCLUSÕES

- A avaliação andrológica de *Alouatta caraya* mantido em cativeiro evidenciou a ausência de correlação do volume testicular com a produção de espermatozoides e que os valores dos parâmetros motilidade e integridade de membrana plasmática podem ser menores do que já foi relatado na literatura;
- A criopreservação deixou os espermatozoides mais suscetíveis ao estresse oxidativo, a cromatina mais suscetível à desnaturação ácida e afetou negativamente a motilidade e a integridade de membrana plasmática independente do diluidor utilizado;
- Os diluidores à base de gema de ovo, principalmente com glicerol a 4%, apresentaram resultados melhores para criopreservação de sêmen de *Alouatta caraya*.
- Houve relação inversa entre o tempo de incubação pós-descongelção (10, 40 e 80 minutos) e a motilidade geral e progressiva dos espermatozoides, embora os demais parâmetros não tenham sido afetados, independentemente do diluidor.
- Os protocolos de congelação de sêmen de *Alouatta caraya* testados no presente estudo não atingiram desempenho satisfatório.

VIII. REFERÊNCIAS

ACKERMAN, D. R.; ROUSSEL, J. D. Fructose, lactic acid and citric acid content of the semen of eleven subhuman primate species and of man. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, p. 563-566, 1968.

AIRES, V. A.; HINSCH, K.D.; SCHLOESSER, F. M.; BOGNER, K.; SCHLOESSER, S. M.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 269-279, 2003.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 183-197, 1989.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993.

AKHTER, S.; ANSARI, M. S.; ANDRABI, S. M. H.; RAKHA, B. A.; ULLAH, N.; KHALID, M. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Reproduction in domestic animals**. 2011. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01973.x. (Epub ahead of print). Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2011.01973.x/abstract>. Acesso em: 29/01/2012.

ARAKAKI, P. R.; CARVALHO, F. M.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VALLE, R. R. Collection and analysis of semen from Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*). In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS CONFERENCE, 2011, Kansas City. **Proceedings...** Kansas City: American Association of Zoo Veterinarians, 2011a. p. 14-15.

ARAKAKI, P. R.; CARVALHO, F. M.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VALLE, R. R. Morfologia espermática em mico-de-Goeldi (*Callimico goeldii*). In: Congresso Brasileiro de Primatologia, 14., 2011, Curitiba. **Livro de Resumos**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Primatologia, 2011b. p. 178.

ARAÚJO, L. L.; LIMA, J. S.; OLIVEIRA, K. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VALLE, R. R.; DOMINGUES, S. F. S. Uso de solução à base de água de coco a 37°C como diluidor de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) mantido em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 588-594, 2009.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995. p. 128-134.

BALLACHEY, B. E.; EVENSON, D. P.; SAACKKE, R. G. The sperm chromatin structure assay relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 109-115, 1988.

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

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)**. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BECCAGLIA, M.; ANASTASI, P.; LUVONI, G. C. Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. **Veterinary Research Communications**, v. 33, p. 77-80, 2009. Supplement

BENNET, J. P. Semen collection in the squirrel monkey. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 13, p. 353-355, 1967.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; LIMA, M. C. C.; ALVES, S. G. G.; VASCONCELOS, M. F.; BISCARDE, C. E.; LEAL, L. S.; OBA, E. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 4, p. 305-312, 2008.

BOE-HANSEN, G. B.; MORRIS, I. D.; ERSBOLL, A. K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, p. 1789-1802, 2005.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M.; Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. **Theriogenology**, v. 50, n.5, p. 699-706, 1998.

BUSH, D. E.; RUSSEL, L. H.; FLOWERS, A. I.; SORENSEN, A. M. Semen evaluation in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Laboratory Animal Science**, v. 25, p. 588-593, 1975.

BUTLER, T. M.; BROWN, B. G.; DYSKO, R. C.; FORD, E. W.; HOSKINS, D. E.; KLEIN, H. J.; LEVIN, J. L.; MURRAY, K. A. ROSENBERG, D. P.; SOUTHERS, J. L. SWENSEN, R. B. Medical Management. In: BENNETT, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. (Ed.). **Nonhuman primates in biomedical research: biology and management**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 255-334.

CHIARELLO, A. G.; AGUIAR, L. M. S.; CERQUEIRA, R.; MELO, F. R.; RODRIGUES, F. H. G.; SILVA, V. M. Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**, v. II. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. p. 681-702.

COLLAR, N. F. Taxonomy and conservation: chicken and egg. **Bull. B. O. C.**, v. 117, n. 2, 1997. p. 122.

CROCKETT, C. M.; EISENBERG, J. F. Howlers: variations in group size and demography. In: SMUTS, B. B.; CHENEY, D. L.; SEYFARTH, R. M.; WRANGHAM, R. W.; SRUHSACKER, T. T. **Primate Societies**. Chicago: University of Chicago Press, 1987. p. 54-68.

CUI, K. H. The effect of stress on semen reduction in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Human Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 568-573, 1996.

CUI, K. H.; FLAHERTY, S. P; NEWBLE, C. D; GUERIM, M. V; NAPIER, A. J; MATTHEUS, C. D. Collection and analysis of semen from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Andrology**, v.12, n.3, p. 214-220, 1991.

DAVIS, M. L. The spermatozoon of the common marmoset, *Callithrix jacchus* (Primates, Callitrichidae): an ultrastructural investigation. **Dissertation Abstracts International**, v. 43, n. 6, p.1696B-1697B, 1982.

DENIS, L. T.; POINDEXTER, A. N.; RITTER, M. B.; SEAGER, S. W. J.; DETER, R. L. Freeze preservation of squirrel monkey sperm for use in timed fertilization studies. **Fertility and Sterility**, v. 27, n. 6, p. 723-729, 1976.

D'OCCHIO, M. J.; HENGSTBERGER, K.J.; JOHNSTON, S. D. Review: Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 1-17, 2007.

DONG, Q.; RODENBURG, S. E.; HUANG, C.; VANDEVOORT, C. A. Cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) epididymal spermatozoa before and after refrigerated storage. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 3, p. 283-292, 2008b.

DONG, Q.; RODENBURG, S. E.; HUANG, C.; VANDEVOORT, C. A. Effect of pre-freezing conditions on semen cryopreservation in rhesus monkeys. **Theriogenology**, v. 70, p. 61-69, 2008a.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

EVENSON, D. P.; EMERICK, R. J.; JOST, L. K. KAYONGO-MALE, H.; STEWART, S. R. Zinc-silicon interactions influencing sperm chromatin integrity and testicular cell development in the rat as measured by flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 955-962, 1993.

EVENSON, D. P.; LARSON, K. L. JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 25-43, 2002.

EVENSON, D. P.; THOMPSON, L.; JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, v. 41, p. 637-651, 1994.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v. 22, p. 169-189, 2000.

FERADIS, A. H.; PAWITRI, D.; SUATHA, I. K.; AMIN, M. R.; YUSUF, T. L.; SAJUTHI, D.; BUDIARSA, I. N.; HAYES, E. S. Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Medical Primatology**, v. 30, p. 100-106, 2001.

FERNANDEZ-DUQUE, E.; WALLACE, R. B.; RYLANDS, A. B. 2008. *Alouatta caraya*. In: IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 23/01/2012.

FOSTER, W. G.; MCMAHON, A.; RICE, D. C.; Sperm chromatin structure is altered in cynomolgus monkeys with environmentally relevant blood lead levels. **Toxicology and Industrial Health**, v. 12, n. 5, p. 723-735, 1996.

GAGLIARDI, C.; MYERS, L.; KUBISCH, H. M. Post thaw survival of rhesus macaque sperm: variation in the response of individual males to different freezing protocols. **American Journal of Primatology**, v. 70, p. 1093-1096, 2008.

GAO, D. Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L. E.; WATSON, P. F.; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, P. CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**, v. 10, n. 5, p. 1109-1122, 1995.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.). **Reprodução animal**, 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 97-110.

GILCHRIST, R. B.; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Maturation, fertilization, and development of marmoset monkey oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 238-246, 1997.

GLIOZZI, T. M.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; LUZI, F.; MAERTENS, L.; CEROLINI, S. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. **Theriogenology**, v. 71, p. 910-919, 2009.

GÓES, P.A.A. **Dosagem dos níveis anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio**. 2008. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GOFF, K.; LIUKKONEN, J.; KUBISCH, H. M. Postmortem recovery and cryopreservation of spermatozoa from the *vas deferens* of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Theriogenology**, v. 72, p. 834-840, 2009.

GOULD, K. G.; WARNER, H.; MARTIN, D. E. Rectal probe electroejaculation of primates. **Journal of Medical Primatology**, New York, v. 7, p. 213-222, 1978.

GREGORIN, R.; KUGELMEIER, T.; VALLE, R. R. Gênero *Alouatta* Lacépède 1799. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; ANDRADE, F. R. **Primatas Brasileiros**. Londrina: Technical Books, 2008. p. 189-204.

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

GRUPEN, C. G.; SCOTT, S. J.; GILCHRIST, R. B.; Effects of animal pairing on marmoset sperm collected by penile vibratory stimulation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 263, 2004. Supplement SBR Abstracts, abst. 263.

GUIMARÃES, M. A. B. V. **Contribuição para o estudo da colheita e avaliação do sêmen do macaco prego *Cebus apella* (Erxleben, 1777)**. 1994. 41 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

HARRISON, R. M.; WOLF, R. H. Sperm parameters and testicular volumes in *Saguinus mystax*. **Journal of Medical Primatology**, v. 14, p. 281-284, 1985.

HATAMOTO, L. K.; BATISTA SOBRINHO, C. A.; NICHI, M.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, p. 1610-1614, 2006.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; CERDA-MOLINA, A. L.; PÁEZ-PONCE, L. D.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Seasonal emission of seminal coagulum and in vivo sperm dynamics in the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **Theriogenology**, v. 69, p. 466-472, 2008.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; PARRA, G. C.; CERDA-MOLINA, A. L.; PÉREZ-BOLAÑOS, S. C.; SÁNCHEZ, V. D.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Sperm quality differences between the rainy and dry seasons in captive black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). **American Journal of Primatology**, v. 57, p. 35-41, 2002a

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; PARRA, G. C.; CERDA-MOLINA, A. L.; PÉREZ-BOLAÑOS, S. C.; SÁNCHEZ, V. D.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Digestion by trypsin enhances assessment of sperm parameters in the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **Laboratory Primate Newsletter**, v. 41, n. 3, 2002b.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; UMLAND, N.; MONDRAGON-CEBALLOS, R.; NAYUDU, P. L. Comparison of the effects of Percoll and PureSperm® on the common marmoset (*Callithrix jacchus*) semen. **Journal of Medical Primatology**, v. 34, p. 86-90, 2005.

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

HSIEH, M. L.; HUANG, S. T.; HUANG, H. C.; CHEN, Y.; HSU, Y. C. The reliability of ultrasonographic measurements for testicular volume assessment: comparison of three common formulas with true testicular volume. **Asian Journal of Andrology**, v. 11, p. 261-265, 2009.

International Union for Conservation of Nature/Species Survival Commission (IUCN/SSC) - Primate Specialist Group. **Global Primate Biodiversity**, 2007. Disponível em: <<http://www.primatesg.org/diversity.htm>> Acesso em: 22/01/2012. 2008.

IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2011.2. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 14/02/2012.

JEYENDRAN, R. S.; ACOSTA, V. C.; LAND, S.; COULAM, C. B. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 4, p. 1263-1265, 2008.

KATO, M.; MAKINO, S.; KIMURA, H.; OTA, T.; FURUASHI, T.; NAGAMURA, Y. Evaluation of mitochondrial function and membrane integrity by dual fluorescent staining for assessment of semen status in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 27, n.1, p.11-18, 2002.

KUEDERLING, I.; MORREL, J. M.; NAYUDU, P. L. Collection of semen from marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) for experimental use by vaginal washing. **Laboratory Animals**, v. 30, p. 260-266, 1996.

KUEDERLING, I.; SCHNEIDERS, A.; SONKSEN, J.; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. **American Journal of Primatology**, v. 52, n. 3, p. 149-154, 2000.

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

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.

LEIBO, S. P.; KUBISCH, H. M.; SCHRAMM, R. D.; HARRISON, R. M.; VANDEVOORT, C. A. Male-to-male differences in post-thaw motility of rhesus spermatozoa after

cryopreservation of replicate ejaculates. **Journal of Medical Primatology**, v. 36, p. 151-163, 2007.

LEIBO, S. P.; PICTON, H. M.; GOSDEN, R. G. Cryopreservation of human spermatozoa. In: Vayena, E. (Ed.). **Current Practices and Controverses in Assisted Reproduction**. Geneva: World Health Organization. p. 152-165, 2001.

LEWIN, L. M.; GOLAN, R.; FREIDLIN, P.; SHOCHAT, L. A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 133-137, 1999.

LI, M. W.; MEYERS, S.; TOLLNER, T. L.; OVERSTREET, J. W. Damage to chromosomes and DNA of rhesus monkey sperm following cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 4, p. 493-501, 2007.

LI, X.; GAO, D.; JI, W. Cryopreservation of sperm of an endangered species: Assamese macaque. **Cell Preservation Technology**, v. 2, n. 1, p. 29-33, 2004.

LI, Y. H.; CAI, K. J.; KOVACS, A.; JI, W. Z. Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 3, p. 387-395, 2005.

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Review article: Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-13, 2011.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**, v. II. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. p. 681-702.

MARQUES, A. A. B.; FONTANA, C. S.; VÉLEZ, E.; BENCKE, G. A.; SCHNEIDER, M.; REIS, R. E. **Lista das Espécies da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul**. Decreto no. 41.672, de 11 de junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGEA, 2002. 52p. (Publicações Avulsas FZB, 11)

MASSAROTO, V. M., CARVALHO, F. M.; ARAKAKI, P. R.; CALVI, T. S.; NICHII, M.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; MIGLINO, M.A.; VALLE, R. R. Collection and analysis of semen from *Callithrix penicillata*. **Primate Research**, v. 26, p. 164, 2010.

MIKICH, S. B.; BÉRNILS, R. S. **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná**. 2004. Disponível em: > <http://www.pr.gov.br/iap>. Acesso em: 23/01/2012.

MITTERMEIER, R. A.; WALLIS, J.; RYLANDS, A. B.; GANZHORN, J. U.; OATES, J. F.; WILLIAMSON, E. A.; PALACIOS, E.; HEYMANN, E. W.; KIERULFF, M. C. M.; YONGCHENG, L.; SUPRIATNA, J.; ROOS, C.; WALKER, S.; CORTÉS-ORTIZ, L.; SCHWITZER, C. (Ed.). 2009. **Primates in Peril: The World's 25 Most Endangered Primates 2008–2010**. IUCN/SSC Primate Specialist Group (PSG), International Primatological Society (IPS), and Conservation International (CI), Arlington, VA. 84pp.

MOLLER, A. P. Ejaculate quality, testes size and sperm competition in primates. **Journal of Human Evolution**, v. 17, p. 479-488, 1988.

MORELAND, R. B.; RICHARDSON, M. E.; LAMBERSKI, N.; LONG, J. A. Characterizing the reproductive physiology of the male southern black howler monkey, *Alouatta caraya*. **Journal of Andrology**, v. 22, n.3, p. 395-403, 2001.

MORREL, J. M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A. M. HAMMAR, L.; SANDEBERT, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 2, 2008.

MORREL, J. M.; HODGES, J. K. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. Review. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1-4, p. 43-63, 1998.

MORREL, J. M.; KÜDERLING, I.; HODGES, J. K. Influence of semen collection method on ejaculate characteristics in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 2, p. 164-172, 1996.

MORRIER, A.; CATONGUAY, F.; BAILEY, J. L. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 82, p. 347-356, 2002.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. São Paulo, 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, K. G.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; DOMINGUES, S. F. S. Conservação do sêmen e liquefação do coágulo seminal de macaco-prego (*Cebus apella*) em água de coco em pó (ACP-118®), em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 617-621, 2010.

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 TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 75-80, 2011.

PAPA, F. O.; FELÍCIO, G. B.; MELO-OÑA, C. M.; ALVARENGA, M. A.; VITA, B.; TRINQUE, C.; PUOLI-FILHO, J. N. P.; DELL'AQUA JR, J. A. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 73-77, 2011.

PAZ, P.; ESTESO, M. C.; ALVAREZ, M.; MATA, M.; CHAMORRO, C. A.; ANEL, L. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. **Theriogenology**, v. 74, p. 663-671, 2010.

PAZ, R. C. R.; TEIXEIRA, R. H. F.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Avaliação das características seminais de macacos pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, antes e após vasectomia bilateral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 561-567, 2006a.

PAZ, R. C. R.; ZACARIOTTI, R. L.; TEIXEIRA, R. H. P.; GUIMARÃES, M. A. B. V. O efeito das enzimas hialuronidase e tripsina na liquefação do sêmen de macacos pregos (*Cebus apella*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 196-201, 2006b.

PERCEQUILLO, A. R.; KIERULFF, M. C. M. Mamíferos. In: BRESSAN, P. M.; KIERULFF, M. C. M. (coord.). **Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: vertebrados**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretária do Meio ambiente, 2009. p. 31-85.

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

PUDRITZ, S. **Untersuchungen zu Kapazitierung und Akrosomreaktion der Spermatozoen des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) in vitro**. 2000. 115 f. Doutorado (Doctoral thesis) - Faculty of Biology, University of Marburg, Marburg.

REED, M. L.; EZEH, P. C.; HAMIC, A.; THOMPSON, D. J.; CAPERTON, C. L. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 5, p. 1787-1790, 2009.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; ANDRADE, F. R. (Ed.). **Primatas Brasileiros**. Londrina: Technical Books, 2008. p. 205-207.

ROTH, T. L. Gamete biotechnology for assisting reproduction in endangered species. In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS CONFERENCE, 1993, Saint Louis. **Proceedings...** Saint Louis: American Association of Zoo Veterinarians, 1993. p. 240-243.

ROUDEBUSH, W. E.; MATHUR, R. S. Presence of platelet-activating factor in squirrel monkey (*Saimiri boliviensis*) spermatozoa: seasonal differences. **American Journal of Primatology**, v. 45, p. 301-305, 1998.

ROYERE, D.; BARTHELEMY, C.; HAMAMAH, S.; LANSAC, J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 6, p. 553-559, 1996.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. The diversity of the New World primates (Platyrrhini): an annotated taxonomy. In: GARBER, P. A., ESTRADA, A., BICCA-MARQUES, J. C., HEYMANN, E. W. (Ed.) **South American primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation** (Developments in primatology: progress and prospects), 2009. p. 23-54.

SALOMON, S.; RITAR, A. J. Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and methods and rate of dilution on survival of spermatozoa. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 35, p. 295-303, 1982.

SANKAI, T.; TSUCHIYA, H.; OGONUKI, N.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y. A trial of oocyte maturation and in vitro fertilization by frozen-thawed spermatozoa in the red-bellied tamarin (*Saguinus labiatus*). **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 14, p. 205-208, 1997.

SARIOZKAN, S.; TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; BUYUKLEBLEBICI, S.; KINET, H.; BILGEN, A. Evaluation of post-thaw quality of Brown-Swiss and Holstein bull semen diluted with different extenders. **Eurasian Journal of Veterinary Sciences**, v. 26, n. 1, p. 51-55, 2010.

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, p. 98–104, 2004.

SHARAFI, M.; FOROUZANFAR, M.; HOSSEINI, S. M.; HAIJAN, M.; OSTADHOSSEINI, S.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H. R.; JAVAHERI, A. R.; ESFAHANI, M. H. N. In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 3, n. 3, p. 149-152, 2009.

SI, W.; WANG, H.; REID, C.; HILDEBRANDT, T. B.; JI, W. Effect of sugar type on the survival of frozen-thawed rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm. **American Journal of Primatology**, v. 68, p. 103-108, 2006.

SI, W.; ZHENG, P.; TANG, X.; HE, X.; WANG, H.; BAVISTER, B. D.; JI, W. Cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa and their functional assessment by *in vitro* fertilization. **Cryobiology**, v. 41, p. 232-240, 2000.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-829, 2003.

SILVA, K. S. M. **Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de Ateles (macaco-aranha) mantidos em cativeiro**. 2005. 83 f. Dissertação (Ciência Animal) - Centro Agropecuário, Universidade Federal do Pará, Belém.

SITZMANN, B. D.; LEONE, E. H.; MATTISON, J. A.; INGRAM, D. K.; ROTH, G. S.; URBANSKI, H. F.; ZELINSKI, M. B.; OTTINGER, M. A. Effects of moderate calorie restriction on testosterone production and semen characteristics in young rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 635-640, 2010.

SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, v. 63, p. 2063-2072, 2005.

STOREY, B. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 203-213, 1997.

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

VALLE, R. R.; VALLE, C. M. R.; NICHI, M.; MUNIZ, J. A. P. C.; NAYUDU, P. L.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Validations of non-fluorescent methods to reliably detect acrosomal and plasma membrane integrity of common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Theriogenology**, v. 70, p. 115-120, 2008.

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

VALTONEN-ANDRÉ, C.; OLSSON, A. Y.; NAYUDU, P. L.; LUNDWALL, A. Ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) contain semenogelin and beta-microseminoprotein but not prostate-specific antigen. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 247-255, 2005.

VERONA, C. E. S.; SOUZA, F. F.; TONIOLLO, G. H.; GARCIA, J. M.; ESPER, C. R. Colheita e avaliação do sêmen de sagui-de-tufo-preto (*Callithrix jacchus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 544-552, 2009.

VICK, M. M.; BATEMAN, H. L.; SWANSON, W. F. Improved cryopreservation of domestic cat spermatozoa in a soy lecithin-based extender. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 153-154, 2010.

VIDAL, F. D.; LUZ, M. S.; PINHO, T. G.; PISSINATTI, A. Coleta de sêmen em mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (Kuhl, 1820) através da eletroejaculação. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 67-71, 2007.

WHO (World Health Organization). **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**, 5. ed. Suíça: WHO Press, 2010. 271 p.

WILTON, L. J.; MARSHALL, V. S.; PIERCY, E. C.; MOORE, H. D. M. In vitro fertilization and embryo development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 481-486, 1993.

YANG, S.; PING, S.; JI, S.; LU, Y.; NIU, Y.; WANG, H.; JI, W.; SI, W. The positive effects of seminal plasma during the freezing process on cryosurvival of sperm with poor

freezability in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*). **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 6, p. 737-743, 2011.

YEOMAN, R. R.; RICKER, R. B.; HOSSAIN, A. M.; ABEE, C. R. Cryopreservation of spermatozoa from squirrel monkeys. **American Journal of Primatology**. v. 42, p. 157, 1997.

YEOMAN, R. R.; RICKER, R. B.; WILLIAMS, L. E.; SONKSEN, J.; ABEE, C. R. 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.

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.

YEUNG, C. H.; MORRELL, J. M.; COOPER, T. G.; WEINBAUER, G. F.; HODGES, J. K.; NIESCHLAG, E. Maturation of sperm motility in the epididymis of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). **International Journal of Andrology**, v. 19, p. 113-121, 1996.

ZHANG, S. S.; HU, J. H.; LI, Q. W.; JIANG, Z. L.; ZHANG, X. Y.; The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6476-6480, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Experimento para validação do SCDA para sêmen de *Alouatta caraya*

Para validação do SCDA, uma palheta de sêmen foi descongelada em banho-maria a 37°C por 15 segundos e dividida em duas alíquotas de 50 µl cada. Uma alíquota foi considerada como controle negativo (alíquota 1 - células não suscetíveis à desnaturação ácida - fluorescência verde) e a outra alíquota passou por um processo de fragmentação induzida e foi considerada como controle positivo (alíquota 2 - células suscetíveis à desnaturação ácida - fluorescência vermelha). Inicialmente, ambas as amostras foram lavadas com 500 µl de PBS.

- Controle negativo

Após a lavagem em PBS, ressuspendeu-se a amostra com 50 µl de PBS. Cinco microlitros dessa amostra foram colocados em um tubo tipo eppendorf contendo 45 µl de água (diluição 1:10), para avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer. O restante da amostra foi acrescido de 50 µl de solução tampão TNE e de 100 µl de detergente ácido e incubado por 30 segundos. Em seguida, após adição de 300 µl de laranja de acridina, o tubo foi reservado pelo tempo necessário para a fragmentação da alíquota 2 (controle positivo). A leitura foi feita dentro do período permitido pela técnica (de 2 minutos até 4 horas após adição do laranja de acridina).

- Controle positivo

Após lavagem em PBS, foram adicionados 50 µl de PBS e 100 µl de peróxido de hidrogênio 30%. A solução foi, então, incubada em banho-maria a 37°C por 1,5 horas. Após o período de incubação, foi feito o mesmo procedimento descrito para o controle negativo.

Para a validação, foi mensurada a quantidade de fragmentação de cada amostra (controle negativo e controle positivo) em separado e em combinação nas proporções de 1:1, 1:3 e 3:1. Com isso, foi possível identificar as duas

populações de células (fragmentadas e não fragmentadas), cujas quantidades variaram de forma dependente e em consonância com as proporções das alíquotas.

Após realização do SCDA, obteve-se histograma de AlfaTYlog com pico único tanto para o controle negativo (Figura 1A), como para o positivo (Figura 1B). A análise da mistura 1:1 gerou um gráfico com dois picos (Figura 1C). O ponto médio entre os dois picos foi estabelecido como ponto de corte para determinação de quais células eram positivas e quais eram negativas.

O AlfaTYlog foi obtido pela divisão da fluorescência vermelha pela fluorescência total (vermelho + verde) e permitiu a quantificação da extensão da desnaturação da estrutura da cromatina de cada espermatozoide.

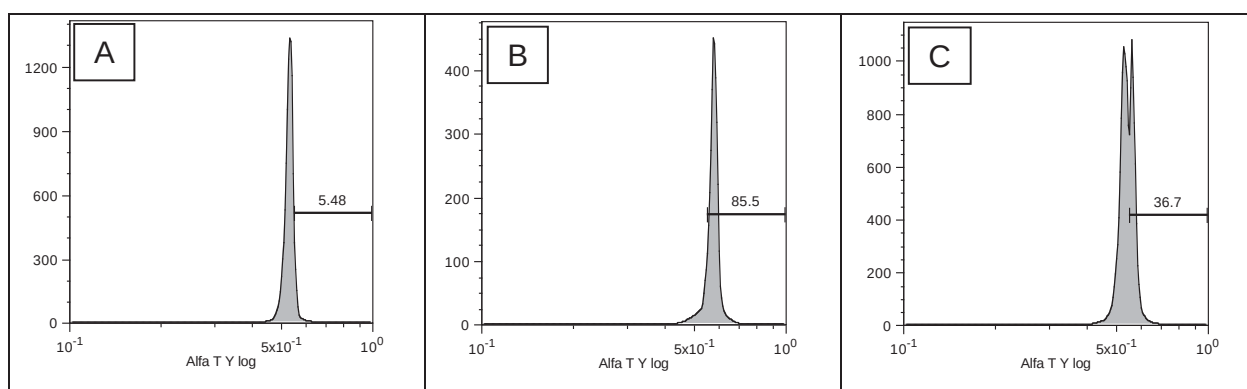


Figura 1. Gráficos de AlfaTYlog obtidos pelo Ensaio de Suscetibilidade da Cromatina à Desnaturação Ácida (SCDA) do sêmen de *Alouatta caraya*. A. Controle negativo; B. Controle positivo. C. Mistura 1:1 dos controles negativo e positivo, respectivamente.

APÊNDICE B

Composição das soluções utilizadas para o Ensaio de Suscetibilidade da Cromatina à Desnaturação Ácida (SCDA)

Solução Tampão TNE (pH 7,4)			
Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
Tris-HCl	Fluka	93363	0,01 M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15 M
EDTA	Sigma	E-5134	1 mM
Água destilada (q.s.p.)	-	-	500 ml

Solução detergente ácida (pH 1,2)			
Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
HCl	Merck	K24537117	0,08 M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15 M
Triton x-100	Sigma	X-100	0,1% (v/v)
Água destilada (q.s.p.)	-	-	500 ml

Solução de Laranja de Acridina – estoque			
Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
Laranja de Acridina	Sigma	A-6014	1 mg/ml
Água destilada (q.s.p.)	-	-	10 ml

Solução de Laranja de Acridina – Uso			
Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
Ácido cítrico	Sigma	0,12	0,1 M
Na ₂ HPO ₄	Sigma	S-5136	0,2 M
EDTA	Sigma	E-5134	0,001 M
NaCl	Sigma	S-5886	0,15 M
Laranja de Acridina - estoque	-	-	6 µg/ml
Água destilada (q.s.p.)	-	-	120 ml

APÊNCICE C

Composição dos diluidores utilizados para criopreservação de sêmen de *Alouatta caraya*

TEST-GEMA CLARIFICADA COM GLICEROL A 3%				
Componentes	Quantidade			Concentração
Gema de ovo clarificada	8 ml	16 ml	80 ml	20%
TES 229,2 g/mol	0,482 g	0,964 g	4,83 g	210 mM
TRIS Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) 121,1 g/mol	0,115 g	0,23 g	1,15 g	95,04 mM
Glicose 180,2 g/mol	0,040 g	0,080 g	0,40 g	221,98 mM
Pen./Estreptomicina 5000 U/5 mg/ml	0,1 ml	0,2 ml	1,0 ml	1 ml/100 ml= 5 mg/ml
H ₂ O bidest. Estéril	1,6 ml	3,2 ml	16 ml	-
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃) ou H ₂ O bidest. Estéril	0,3 ml	0,6 ml	3,0 ml	Glicerol=3%
TOTAL	10 ml	20 ml	100 ml	-

TEST-GEMA CLARIFICADA COM GLICEROL A 4%				
Componentes	Quantidade			Concentração
Gema de ovo clarificada	8 ml	16 ml	80 ml	20%
TES 229,2 g/mol	0,482 g	0,964 g	4,83 g	210 mM
TRIS Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) 121,1 g/mol	0,115 g	0,23 g	1,15 g	95,04 mM
Glicose 180,2 g/mol	0,040 g	0,080 g	0,40 g	221,98 mM
Pen./Estreptomicina 5000 U/5 mg/ml	0,1 ml	0,2 ml	1,0 ml	1 ml/100 ml= 5 mg/ml
H ₂ O bidest. Estéril	1,5 ml	3,0 ml	15 ml	-
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃) ou H ₂ O bidest. Estéril	0,4 ml	0,8 ml	4,0 ml	Glicerol=4%
TOTAL	10 ml	20 ml	100 ml	-

TEST-LECITINA DE SOJA GLICEROL A 3%				
Componentes	Quantidade			Concentração
Lecitina de soja em água bidestilada	8 ml	16 ml	80 ml	1%
	0,0032 g	0,0064 g	0,032 g	
TES 229,2 g/mol	0,482 g	0,964 g	4,83 g	210 mM
TRIS Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) 121,1 g/mol	0,115 g	0,23 g	1,15 g	95,04 mM
Glicose 180,2 g/mol	0,040 g	0,080 g	0,40 g	221,98 mM
Pen./Estreptomicina 5000 U/5 mg/ml	0,1 ml	0,2 ml	1,0 ml	1 ml/100 ml= 5 mg/ml
H ₂ O bidest. Estéril	1,6 ml	3,2 ml	16 ml	-
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃) ou H ₂ O bidest. Estéril	0,3 ml	0,6 ml	3,0 ml	Glicerol=3%
TOTAL	10 ml	20 ml	100 ml	-

TEST-LECITINA DE SOJA COM GLICEROL A 4%				
Componentes	Quantidade			Concentração
Lecitina de soja em água bidest.	8 ml	16 ml	80 ml	1%
	0,0032 g	0,0064 g	0,032 g	
TES 229,2 g/mol	0,482 g	0,964 g	4,83 g	210 mM
TRIS Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) 121,1 g/mol	0,115 g	0,23 g	1,15 g	95,04 mM
Glicose 180,2 g/mol	0,040 g	0,080 g	0,40 g	221,98 mM
Pen./Estreptomicina 5000 U/5 mg/ml	0,1 ml	0,2 ml	1,0 ml	1 ml/100 ml= 5 mg/ml
H ₂ O bidest. Estéril	1,5 ml	3,0 ml	15 ml	-
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃) ou H ₂ O bidest. Estéril	0,4 ml	0,8 ml	4,0 ml	Glicerol=4%
TOTAL	10 ml	20 ml	100 ml	-

Preparo da Gema de ovo clarificada:

- Lavar o ovo e secar bem
- Separar gema da clara e colocar gema sobre papel filtro para remoção do restante da clara sobre a película da gema
- Após remoção da clara, furar a película da gema com agulha e deixar 10 ml de gema escorrer em um cilindro graduado sem tocar em nada
- Adicionar água bidestilada estéril, na quantidade de 3X o volume da gema de ovo (30 ml)
- Homogeneizar por 15-30 minutos em agitador magnético; centrifugar por 1 hora a 4500 U/min, 4°C
- Retirar sobrenadante e colocar em tubo estéril, para posterior adição dos químicos.