

# USO DE SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO A 37 °C COMO DILUIDOR DE SÊMEN DE *Cebus apella* (MACACO-PREGO) MANTIDO EM CATIVEIRO

LUIZA LOUREIRO DE ARAÚJO,<sup>1</sup> JULIANNE SILVA DE LIMA,<sup>2</sup> KAROL GUIMARÃES OLIVEIRA,<sup>2</sup> JOSÉ AUGUSTO PEREIRA CARNEIRO MUNIZ,<sup>3</sup> RODRIGO DEL RIO DO VALLE<sup>4</sup> E SHEYLA FARHAYLDES SOUZA DOMINGUES<sup>5</sup>

1. Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPA

2. Acadêmica de Biologia (Bacharelado), UFPA

3. Médico veterinário de Centro Nacional de Primatas

4. Médico veterinário, doutor em Reprodução Animal (USP)

5. Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará. E-mail: shfarha@ufpa.br>

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de um diluidor de sêmen à base de água de coco *in natura* a 37 °C na dissolução da fração coagulada e conservação do sêmen de macacos-prego. Analisaram-se quinze ejaculados colhidos de cinco (n=5) machos adultos de *Cebus apella* através de eletroejaculação. Os volumes médios das frações líquida e coagulada foram  $0,26 \pm 0,06$  mL e  $0,98 \pm 0,02$  mL, respectivamente. A fração líquida apresentou baixa concentração média de espermatozoides ( $210 \cdot 10^6 \pm 50 \cdot 10^6$  mL) em relação à fração coagulada ( $1600 \cdot 10^6 \pm 900 \cdot 10^6$  mL) ( $p \leq 0,05$ ). O percentual médio de espermatozoides vivos após sete horas

de incubação a 37°C foi  $72 \pm 3\%$ . Em apenas uma amostra observaram-se 20% de motilidade e vigor 2. Os resultados sugerem que o protocolo de eletroejaculação utilizando amperagem máxima de 100 mA é eficaz para a obtenção de sêmen de *Cebus apella* e que o diluidor à base de água de coco pode ser utilizado para manter a viabilidade dos espermatozoides a 37 °C por até sete horas. Contudo, são necessários testes adicionais para avaliar a funcionalidade desses espermatozoides após a diluição do sêmen em água de coco *in natura*.

PALAVRAS CHAVE: Água de coco, *Cebus apella*, diluidor, eletroejaculação, sêmen.

## ABSTRACT

### USE OF COCONUT WATER SOLUTION AT 37°C AS EXTENDER OF CAPTIVE *Cebus apella* (CAPUCHIN MONKEY) SEMEN

The aim this study was to evaluate the efficiency of *in natura* coconut water solution at 37° C as seminal extender. Were analyzed fifteen ejaculates collected from 5 adult *Cebus apella* by electroejaculation. The means volumes of liquid and coagulated fractions were  $0.26 \pm 0.06$  mL and  $0.98 \pm 0.02$  mL, respectively. The sperm concentration in the liquid fraction ( $2.1 \times 10^8 \pm 0.5 \cdot 10^8$  mL) was lower than liquefied fraction ( $1.6 \times 10^9 \pm 0.9 \cdot 10^9$  mL) ( $p = 0.05$ ). The mean percentage of live spermatozoa after 7 hours incubated

at 37 °C was  $72 \pm 3\%$ . Only in one sample was observed sperm motility (20%) and vigor (2). The results suggest that electroejaculation protocol using 100mA maximum amperage is efficient to obtain semen from adult *Cebus apella*. The coconut water extender can be used to maintain sperm viability for up to 7 hours at 37 °C. However, studies are necessary to evaluate the sperm functionality extended *in natura* coconut water based solution.

KEY WORDS: *Cebus apella*, electroejaculation water, extender, semen.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, o desenvolvimento de protocolos para colheita de gametas masculinos de primatas neotropicais, visando à preservação de material genético (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 2000; BARNABE et al., 2002; VALLE et al., 2004; VALLE, 2007), bem como o emprego de técnicas de reprodução assistida (DOMINGUES & CALDAS-BUSSIÈRE, 2006) adquirem grande importância à medida que estudos constataam a ameaça de extinção na qual se encontram esses animais (AURICCHIO, 1995; DOMINGUES & CALDAS-BUSSIÈRE, 2006).

No tocante à obtenção de gametas masculinos, a eletroejaculação (EEJ) foi descrita na espécie *Cebus apella* (BARNABE et al., 2002; PAZ et al., 2006 a, b) assim como em *Macaca mulata* (LANZENDORF et al., 1990) e *Alouatta caraya* (VALLE et al., 2004). O protocolo de eletroejaculação descrito para *C. apella* utiliza estímulos crescentes de 50 a 300 mA (BARNABE et al., 2002). Em homens, é indicado realizar a EEJ com estímulos de no máximo 100 mA, devido ao risco de se utilizarem amperagens mais altas (HALSTEAD et al., 1987; OHL et al., 1996; BRACKETT et al., 2002). Em *C. apella* não foi descrito um protocolo de EEJ que utilize amperagens máximas de 100 mA, sendo necessário desenvolver um procedimento de EEJ eficiente e seguro para os animais.

Assim como acontece em outras espécies de primatas, o sêmen de *C. apella* coagula rapidamente após a ejaculação (GREER et al., 1968; NAGLE & DENARI, 1983; SCHAFFER et al., 1989; PAZ et al., 2006ab). Foi descrito, por NAGLE & DENARI (1983), que a liquefação do coágulo pode ser otimizada pela sua fragmentação mecânica em solução fisiológica (NaCl, 0,9%). Nesse âmbito, a utilização de substâncias naturais como a água de coco *in natura*, que é uma solução natural, de baixo custo, estéril e que fornece os nutrientes necessários para a conservação de células espermáticas (BLUME & MARQUES JR., 1994; NUNES & COMBARNOUS, 1995), pode ser uma alternativa para a liquefação e diluição do coágulo seminal de *C. apella*, possibilitando sua utilização em programas de reprodução assistida.

No entanto, a utilização da água de coco *in natura* para diluição de sêmen de primatas ainda não foi descrita. Portanto, o presente trabalho objetivou: 1) estabelecer um protocolo de EEJ que ofereça menor risco aos animais; 2) avaliar a liquefação do coágulo seminal de *C. apella* em solução à base de água de coco; 3) avaliar a viabilidade espermática na fração líquida e no coágulo liquefeito do sêmen de *C. apella* colhido por EEJ, após a diluição em solução à base de água de coco *in natura*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto Evandro Chagas (CEPAN - IEC - SVS - Protocolo N°0014/2006).

### Local de execução

O presente estudo foi realizado no Centro Nacional de Primatas (CENP), órgão da Secretaria de Vigilância em Saúde, pertencente ao Ministério da Saúde (CENP/SVS/MS). O CENP está localizado na cidade de Ananindeua, Pará, Brasil (latitude: 1° 22' 57" sul, longitude: 48° 22' 52" oeste, Google Earth).

### Animais

O grupo experimental era composto por cinco machos (n=5) adultos de *Cebus apella*, com idades estimadas entre quinze e vinte anos, selecionados pelo seu bom estado de saúde, confirmado por análises clínicas de rotina e características fenotípicas normais para a espécie. Submeteu-se cada animal a uma avaliação prévia da biometria, consistência, forma, calor, simetria e mobilidade dos testículos e epidídimos, bem como ausência de defeitos no escroto. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de alvenaria com dimensões 3 x 3 x 2 m, dentro de galpões telados, sujeitando-os ao fotoperíodo natural, com alimentação diária à base de frutas, verduras, legumes, ração peletizada (FOXY Junior Supreme, 28% proteína bruta; PROVIMI, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e água *ad libitum*.

## Procedimentos com os animais

Para os procedimentos de biometria testicular, avaliação testicular e EEJ, submeteram-se os animais à contenção química com a administração intramuscular da associação de cloridrato de quetamina (10mg/kg) (Laboratórios Köning S.A., Avellaneda, Argentina) e cloridrato de xilazina (1mg/kg) (Laboratórios Köning S.A., Avellaneda, Argentina). Os procedimentos da biometria e avaliação testicular foram realizados pela mensuração dos diâmetros longitudinais, dorsoventrais e transversais dos testículos com o auxílio de um paquímetro.

Para a colheita de sêmen, realizou-se inicialmente a higienização da região prepucial com água e sabão líquido neutro (Samira Indústria e Comércio de Produtos de Limpeza Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), sendo em seguida seca com toalhas descartáveis de papel. Cada animal foi manipulado em intervalos mínimos de vinte dias entre os procedimentos, com uma média de três coletas por animal, totalizando quinze coletas. Desenvolveu-se a EEJ com um eletroejaculador à bateria (DUBOI, Campo Grande, MS, Brasil), equipado com uma sonda retal bipolar com 9 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento, composta por dois eletrodos longitudinais. A sonda foi previamente lubrificada com pomada de penicilina e dihidroestreptomicina (Ganadol® - Laboratório Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brasil) e posicionada no reto, com introdução de 5 cm a partir do esfíncter anal e os eletrodos posicionados ventralmente. A estimulação consistiu em cinco sessões com cinco séries de vinte estímulos elétricos, com intervalo de trinta segundos entre cada série e estímulos crescentes de 12,5 mA; 25 mA; 50 mA; 75 mA e 100 mA.

## Processamento do sêmen

O sêmen colhido foi acondicionado em tubos de microcentrífuga de 1 mL mantidos à temperatura de 37 °C. Cada tubo continha 0,5 mL de solução à base de água de coco (50% de água de coco + 25% de citrato de sódio a 5% + 25% de água destilada) (NUNES et al., 1995) e pH 7,5. A ejaculação da fração líquida sempre antecedia a da fração coagulada, sendo coletadas e mantidas em

tubos individuais com o mesmo volume inicial de diluidor (0,5 mL) durante todo o procedimento. Procedeu-se a fragmentações mecânicas do coágulo com o auxílio de uma ponteira de plástico para facilitar sua liquefação no diluidor (NAGLE & DENARI, 1983). Analisaram-se as frações líquidas e os coágulos dissolvidos imediatamente após a coleta para verificação de suas características macroscópicas (aspecto, volume total, viscosidade e cor) e microscópicas (vigor, motilidade, concentração espermática, número total de espermatozoides por fração e integridade da membrana plasmática). A cada meia hora, durante um total de sete horas de incubação em banho-maria a 37 °C, foram verificadas a movimentação espermática (vigor e motilidade) e a quantidade de espermatozoides vivos e mortos (integridade da membrana plasmática). Determinaram-se as concentrações das frações líquida e coagulada com o auxílio da câmara de Neubauer, a uma diluição de 1:1 em formol salino (10%). O número total de espermatozoides por fração foi obtido pela multiplicação da concentração espermática pela referida fração de ejaculado (concentração de sptz  $\times$  volume da fração). Para avaliação da integridade da membrana plasmática e da quantidade de espermatozoides vivos e mortos, empregou-se o método de coloração por eosina-nigrosina (VALLE, 2007).

## Análise estatística

Apresentaram-se todos os dados em média  $\pm$  EPM (erro-padrão da média). O teste T de Student foi utilizado para comparar as dimensões entre testículos direito e esquerdo, bem como a concentração espermática da fração líquida e coagulada. Efetuou-se a análise de variância para comparar o percentual de espermatozoides vivos entre as diferentes horas de incubação do sêmen a 37° C em solução à base de água de coco. Todos os testes foram aplicados a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os diâmetros testiculares longitudinais, dorsoventrais e transversais foram  $2,00 \pm 0,10$  cm;  $1,40 \pm 0,06$  cm;  $1,65 \pm 0,10$  cm, respectivamente.

Não houve diferença estatística entre o testículo direito e o esquerdo. Todos os animais apresentaram testículos e epidídimos normais, bem como ausência de defeitos no escroto. A avaliação testicular quanto à posição, simetria, mobilidade, consistência, forma e tamanho é necessária na escolha de animais experimentais que farão parte de programas de reprodução assistida (GARNER & HAFEZ, 2004), uma vez que patologias como o criptorquidismo e anorquidismo podem ser limitantes ao sucesso de determinadas técnicas reprodutivas e podem ser detectadas por essas avaliações. Apesar das informações obtidas acerca do volume testicular, a relação entre o volume testicular e a produção espermática não pôde ser comparada com outros autores, uma vez que não há na literatura consultada registros relacionados aos parâmetros testiculares normais para a espécie (BUSH et al., 1975; BARNABE et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2004).

Neste estudo foi demonstrado que é possível induzir a ejaculação em machos adultos de *C. apella* por meio da EEJ com estímulos que variam entre 12,5 mA e 100 mA, como o observado por HALSTEAD et al. (1987) e OHL et al. (1996). Este protocolo é vantajoso em relação aos atualmente utilizados para a espécie, pois oferece menor risco de injúrias aos indivíduos.

Os intervalos de trinta segundos entre cada série de estímulos otimizaram o processo de ejaculação em *C. apella* e foi possível obter frações líquidas e coaguladas de sêmen, nos intervalos entre cada série de estímulos. Em estudos que visam à colheita de sêmen por EEJ em homens com disfunções ejaculatórias, tem sido descrito que os intervalos entre cada série de estímulos possibilitam o relaxamento do esfíncter uretral externo e favorecem a ejaculação em direção anterógrada com otimização do procedimento de eletroejaculação (OHL et al., 2000; SØNKSEN et al., 2001; SØNKSEN & OHL, 2002), assim como observado no presente estudo. A EEJ é uma técnica importante como método de indução da ejaculação na espécie *C. apella*, em virtude do seu volume corpóreo e comportamento agressivo, fatores que predispõem contenção química para o manuseio seguro dos animais e que dificultam a

utilização de outras técnicas de colheita seminal nessa espécie.

As médias do volume, concentração (sptz/mL), número total de espermatozoides e viabilidade espermática das frações líquidas no tempo 0 (T0) e coágulo imediatamente após a liquefação estão representadas na Tabela 1. Os volumes médios das frações foram próximos aos relatados em trabalhos anteriores ao empregar a EEJ na espécie *C. apella*, nos quais o volume das frações líquida e coagulada variou de 0,2 a 0,7 mL (BUSH et al., 1975; GUIMARÃES, 1994; BARNABE et al., 2002; PAZ et al., 2006a, b) e 0,3 a 2,6 mL (NAGLE & DENARI, 1983; BARNABE et al., 2002), respectivamente.

A fração coagulada liquefez-se completamente após fragmentação mecânica e período de incubação de uma a duas horas no diluidor à base de água de coco a 37 °C. Como descrito por NAGLE & DENARI (1983), a fragmentação mecânica do coágulo facilitou sua liquefação. A fração líquida apresentou-se viscosa, translúcida, com baixa concentração espermática e menor número de espermatozoides quando comparada com a fração coagulada ( $p \leq 0,05$ ). A concentração e o número total de espermatozoides por fração descritos em outros trabalhos variam de  $2,8 \times 10^6 - 56.169 \times 10^6$  sptz/mL e  $1,96 \times 10^6 - 11.233 \times 10^6$  sptz para a fração líquida (BARNABE et al., 2002; PAZ et al., 2006a, b),  $207 \times 10^6$  sptz/mL e  $209 \times 10^6$  sptz para a fração coagulada, sendo que este último dado foi relatado apenas por NAGLE & DENARI (1983). De acordo com o relatado por outros autores, ocorre uma grande variação da concentração e do número de espermatozoides por fração entre os diferentes trabalhos. Comparações entre as concentrações e o número de espermatozoides obtidos no presente trabalho em *Cebus apella* com o relatado por outros autores são difíceis de serem realizadas, porque fatores como o funcionamento das glândulas sexuais acessórias, idade dos animais, intervalos entre ejaculações, época das coletas com relação à estação reprodutiva ou hora do dia, estresse e métodos de indução da ejaculação podem afetar a concentração espermática (AMANN, 1981; AMANN & SCHANBACHER, 1983; VANDEVOORT, 2004).

**TABELA 1.** Médias  $\pm$  EPM do volume, concentração (sptz/mL), número total de espermatozoides e viabilidade espermática das frações líquidas no tempo 0 (T0) e coágulo imediatamente após a liquefação

Volume (mL)	Fração líquida		Coágulo
			liquefeito
	0.26 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>		0.98 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
Concentração (sptz/mL)	210 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 50 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>		1.600 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 900 x 10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>
Nº total de sptz	54,6 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>		1568 x 10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>
Vivos (%)	83,0 $\pm$ 6,0 <sup>a</sup>		82,0 $\pm$ 8,0 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup> Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre colunas.

Em apenas uma amostra constituída de fração líquida, acrescida de diluidor, verificaram-se 20% de motilidade e vigor 2 durante todo o período de análise. BARNABE et al. (2002), utilizando sêmen de *C. apella*, submetidos à EEJ, avaliaram apenas a fração líquida em incubação a 37 °C, sem adição de diluidores, obtendo uma média de 68,4% de motilidade e vigor 2,6. PAZ et al. (2006a), utilizando a fração coagulada em meio TCM 199 acrescido das enzimas tripsina e hialuronidase, obtiveram 24% de motilidade e vigor 1,6. O efeito deletério da EEJ na motilidade espermática foi descrito em outras espécies de primatas (MORREL et al., 1996; YEOMAN et al., 1998; CSEH et al., 2000; SCHNEIDERS et al., 2004), o que torna necessária a identificação dos fatores responsáveis por essa diminuição na qualidade do ejaculado e/ou a adição de substâncias no diluidor à base de água de coco que possam melhorar a qualidade do sêmen colhido por EEJ. Quando a finalidade é utilizá-lo em biotecnologias de reprodução assistida como inseminação artificial ou protocolos de fertilização *in vitro*, a motilidade e o vigor espermático são fundamentais para o sucesso na realização de tais procedimentos (GARNER & HAFEZ, 2004).

A ausência de motilidade espermática não inviabilizaria o emprego de outras técnicas de fertilização oocitária como, por exemplo, a injeção intracitoplasmática de células espermáticas, posto que se trata de técnica que não exige a utilização de espermatozoides móveis (NG et al., 2002). Sugere-se, portanto, que é possível o emprego das

frações líquidas e coaguladas do sêmen diluídas em solução à base de água de coco.

No tocante à avaliação da vitalidade espermática pela eosina-nigrosina, do sêmen diluído em solução à base de água de coco, não houve diferença quando comparado à fração líquida no T0 e ao coágulo imediatamente após a liquefação (Tabela 1). Após as sete horas de incubação em banho-maria a 37 °C, o percentual médio total de espermatozoides vivos foi de 72,0  $\pm$  3,0 %. Não houve diferença estatística para esse parâmetro entre os diferentes tempos analisados e quando comparado à fração líquida com o coágulo liquefeito, sugerindo que a solução à base de água de coco *in natura* é eficiente na manutenção da vitalidade do espermatozoide de *C. apella* por um período de até sete horas após a colheita do sêmen por EEJ. Além disso, apresenta também vantagens em relação a meios diluidores contendo enzimas proteolíticas para dissolução do coágulo, como a tripsina e a hialuronidase, que, além da queda da motilidade e do vigor espermático, podem causar danos às membranas espermáticas, impedindo o sucesso da criopreservação (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2002; PAZ et al., 2006a).

## CONCLUSÃO

Foi possível obter-se sêmen de *C. apella* por eletroejaculação, mediante a adoção de estímulos de no máximo 100 mA. A solução à base de água de coco *in natura* é eficiente na liquefação do coágulo seminal e na manutenção da vitalidade espermática por um período de até sete horas após a EEJ a 37° C. Contudo, torna-se necessária a realização de testes adicionais para avaliar a funcionalidade do espermatozoide de *Cebus apella* do sêmen diluído em solução à base de água de coco *in natura*.

## AGRADECIMENTOS

Ao Centro Nacional de Primatas (CENP-SVS-Ananindeua, Pará), pelos recursos humanos e materiais gentilmente cedidos.

## REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology**, v. 2, p. 37-58, 1981.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. **Animal Science**, v. 57 (Suppl. 2), p. 380-403, 1983.
- AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis. 1995. 168 p.
- 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. 6, n. 39, p. 331-333, 2002.
- BLUME, H.; MARQUES-JÚNIOR, A. P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 18, n. 3-4, p. 97-104, 1994.
- BRACKETT, N. L.; EAD, D. N.; ABALLA, T. C.; FERRELL, S. M.; LYNNE, C. M. Semen retrieval in men with spinal cord injury is improved by interrupting current delivery during electroejaculation. **Journal of Urology**, v. 167, p. 201-203, 2002.
- BUSH, D. E.; RUSSEL, L. H.; FLOWERS, A. I.; SORENSON, A. M. Semen evaluation in capuchin monkey (*Cebus apella*). **Laboratory Animal Science**, v. 25, p. 588-593, 1975.
- CSEH, S.; CHAN, P. L.; CORSELLI, L.; BAILEY, L. Electroejaculated baboon (*Papio anubis*) sperm requires a higher dosage of pentoxifylline to enhance motility. **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, v. 17, n. 8, p. 449-453, 2000.
- DOMINGUES, S.F.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de primatas neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 1/2, p. 57-71, jan.-jun. 2006.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatózoide e plasma seminal (capítulo 7). In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Editora Manole, 2004. 582 p.
- GREER, W. E.; ROUSSEL, J. D.; AUSTIN, C. R. Prevention of coagulation in monkey sêmen by surgery. **Journal of reproduction and Fertility**, v.15, p. 153-155, 1968.
- GUIMARÃES, A. B. B. **Contribuição para o estudo de colheita e avaliação do sêmen de macaco-prego (*Cebus apella*) (ERXLEBEN, 1777)**. 1994. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- HALSTEAD, L. S.; VERVOORT, S.; SEAGER, S. W. J. Rectal probe electrostimulation in the treatment of anejaculatory spinal cord injured men. **Paraplegia**, v. 25, p. 120-129, 1987.
- 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, p. 4-6, 2002.
- LANZENDORF, S. E.; GLIESSMAN, P. M.; ARCHIBONG, A. E.; ALEXANDER, M.; WOLF, D. P. Collection and quality of rhesus monkey semen. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, p. 61-66, 1990.
- MORREL, J. M.; KUEDERLING, I.; HODGES, J. K. Influence of semen collection method on ejaculate characteristics in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 164-172, 1996.
- NAGLE, C. A.; DENARI J.H. The cebus monkey (*Cebus apella*), p 39-67. In: HEARN, J.P. **Reproduction of new world primates**. Lancaster: MTP Press, 1983. p. 149-179.
- NG, S. C.; MARTELLI, P.; LIOW, S. L.; HERBERT, S.; OH, S. H. Intracytoplasmic injection of frozen-thawed epididymal spermatozoa in a nonhuman primates model, the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). **Theriogenology**, v. 58, p. 1385-1397, 2002.
- NUNES, J. F.; COBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor de sêmen dos mamíferos domésticos. **Ciência Animal**, v. 5, n. 1/2, p. 15-21, 1995.
- OHL, D. A.; SØNKSEN, J.; BOLLING, R. New stimulation pattern for electroejaculation based on physiological studies. **Journal of Urology**, v.163 (Suppl.), p. 15-22, 2000.
- OHL, D. A.; SØNKSEN, M. M.; RANDOLPH, J. J. F.; MENGE, A. C. Management of infertility in spinal cord injury. **Topics Spinal Cord Injury Rehabilitation**, v. 1, 65-75, 1996.
- PAZ, R.C.R.; ZACARIOTTI, R.L.; TEIXEIRA, R.H.F.; 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, 2006a.
- 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, n. 4, p. 561-567, 2006b.
- SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; MAGINNIS, G.; DOMINKO, T.; MARTINOVICH, C.; MCVAY, B.; FANTON, J.; SCHATTEN, G. Live Rhesus offspring by artificial insemination using fresh sperm and cryopreserved sperm. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1092-1097, 2000.
- SCHAFFER, N.; CRANFIELD, M.; MEEHAN, T.; KEMPSKE, S. Semen collection and analysis in the conservation of endangered nonhuman primates. **Zoo Biology**, v. 1, p. 47-60, 1989.
- 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 Medical Primatology**, v. 33, p. 98-104, 2004.
- SØNKSEN, J.; OHL, D. A. Penile vibratory stimulation and electroejaculation in the treatment of ejaculatory dysfunction. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 324-332, 2002.
- SØNKSEN, J.; OHL, D. A.; WEDEMEYER, G. Sphincteric events during penile vibratory ejaculation and electroejaculation in men with spinal cord injuries. **Journal of Urology**, v. 165, p. 426-429, 2001.
- TEIXEIRA, D. G.; VERAS, M. M.; MIGLINO, M. A.; GUERRA, J. L. *Cebus apella*: description of the macro and microanatomy of the testis and scrotum. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro; INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Belo Horizonte. **Proceedings...** Belo Horizonte: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004. v. 1. p. 163.
- VALLE, R. R. **Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*)**. São Paulo, 2007. 535 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, 2007.
- 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, n. 1-2, p. 131-138, 2004.
- VANDEVOORT, C. A. High quality sperm for nonhuman primate ART: production and assessment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 33, 2004.
- YEOMAN, R. R.; SONKSEN, J.; GIBSON, S.V.; RIZK, B. M.; ABEE, C. R. Penile vibratory stimulation yields increased spermatozoa and accessory gland production compared with rectal electroejaculation in a neurologically intact primate (*Saimiri boliviensis*). **Human Reproduction**, v. 13, p. 2527-2531, 1998.

---

Protocolado em: 12 dez. 2007. Aceito em: 1º out. 2008.