

# Rodrigo del Rio do Valle

## **Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Saguí- de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós –  
Graduação em Reprodução Animal da  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em  
Medicina Veterinária

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de Concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz  
Guimarães

São Paulo  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1842  
FMVZ

Valle, Rodrigo del Rio do

Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Sagüi-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) / Rodrigo del Rio do Valle. – São Paulo: R. R. Valle, 2007.  
169 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.  
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães.

1. Sêmen animal. 2. Criopreservação animal. 3. *Callithrix jacchus*.  
4. Diaminobenzidina. 5. DNA. I. Título.

## ERRATA

<b>Página</b>	<b>Parágrafo</b>	<b>Linha</b>	<b>Onde se lê</b>	<b>Leia-se</b>
66	4	16	(500g)	(350g)
87	3	15	peca	peça
88	3	10	patologias	anormalidades
89	4	10	patologias	morfologia
93	2	11	Hepes-TALP	TALP-HEPES
93	2	11	TRIS Gema	TEST-Gema
122	1	1	patologias	morfologia
122	1	1	específica	espermática

<b>Página</b>	<b>Substituir</b>	<b>Por</b>
123	Gráfico 10	Gráfico 10 corrigido
123	Tabela 16	Tabela 16 corrigida
124	Tabela 17	Tabela 17 corrigida
125	Gráfico 11	Gráfico 11 corrigido

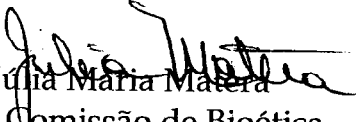
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de banco de sêmen de primatas neotropicais: criopreservação do sêmen de uma espécie modelo, sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*)", Protocolo nº489/2004, utilizando 40 saguis-de-tufo-branco, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Development of semen banking for neotropical primates: cryopreservation of semen from a model species, the common marmoset (*Callithrix jacchus*)" protocol number 489/2004, utilizing 40 marmosets, under the responsibility of Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting.

São Paulo, 04 de agosto de 2004

  
Prof.ª Dr.ª Julia Maria Matera  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VALLE, Rodrigo del Rio do

Título: Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## ***Dedico***

*Aos primatas não humanos e humanos, que por essência ou por consciência contribuem para um mundo mais equilibrado, onde todos têm o seu espaço.*

*Aos meus pais, Dilson e Zélia, por serem o melhor e maior exemplo de vida, a quem devo tudo que sou, e que sempre serão os maiores responsáveis pelos frutos que eu possa vir a colher.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, que mesmo antes de ser meu orientador já me ensinava, que sempre foi um exemplo de seriedade e competência, e que muito contribuiu para a minha formação científica.

À Dra. Penelope Lea Nayudu, pelos ensinamentos e contribuição em meu aprimoramento científico, pela oportunidade, apoio e convivência na Alemanha.

Ao Dr. José Augusto Pereira Carneiro Muniz, pelos ensinamentos, oportunidade, incansável apoio e por me fazer acreditar que um dia serei um bom pesquisador.

À minha família, meus pais, Dílson e Zélia, por seu ilimitado e incondicional apoio e incentivo, sem os quais eu não teria chegado até aqui, minhas irmãs, Lizandra e Milena, por me fazerem sentir importante, pelo apoio, incentivo e compreensão, e aos meus sobrinhos, Carolina, Bruno, Pedro e Ana, por trazerem alegria a minha vida.

À minha esposa, Cristiane, por seu amor e carinho, pelo inesgotável apoio e compreensão, pela ajuda em todas as etapas e por me acompanhar onde fosse necessário.

À minha irmã Milena e meu cunhado Leonardo, pela amizade e pelas boas conversas, sempre dispostos a deixar minha estadia em Belém mais confortável e



prazerosa.

Ao amigo Marcílio Nichi, pela ajuda na realização dos testes e interpretação estatística.

Ao amigo Dr. Ricardo Pimenta Bertolla e sua equipe da Escola Paulista de Medicina, pela ajuda na realização e análise de alguns testes (Ensaio Cometa e DAB), sem os quais esta tese não teria a mesma qualidade.

À Angelina Berenson e Kerstin Fuhrmann, pela inestimável ajuda e paciência durante as pesquisas no Centro de Primatas da Alemanha (*Deutsches Primatenzentrum* – DPZ).

Ao Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, pela oportunidade na pós graduação, pela confiança e pelo exemplo profissional.

À Dra. Maria Amélia Zogno, pela ajuda e ensinamentos, sempre com atenção e paciência.

À Profa. Dra. Mayra Assumpção, pelos ensinamentos, valiosas sugestões e por estar sempre disposta a ajudar.

À Profa. Dra. Camila Vannucchi e sua equipe, em especial à Ju e à Cris, pela ajuda na solução dos problemas de última hora.

À Eliana, estagiária do Centro Nacional de Primatas, pela incansável ajuda.

À Elena Tkachenko, Roma e Edris, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos brasileiros, que precisei atravessar um oceano para conhecer, mas que foram importantes em minha adaptação na Alemanha, vocês ficarão para sempre em meu coração.

À Liliane, pesquisadora do Instituto Evandro Chagas, pela inestimável ajuda e amizade.

À todos do Departamento de Biologia Reprodutiva do Centro de Primatas da Alemanha – DPZ, em especial ao Prof. Dr. J. Keith Hodges, por me receber e pelo apoio à minha pesquisa.

Aos pós graduandos do Centro de Primatas da Alemanha - DPZ, pelas discussões e troca de conhecimentos, e pelo futebol, sempre que possível.

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP, em especial ao Miguel, pela ajuda e companhia nas horas dispensadas em seu laboratório.

Aos pós graduandos do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP, pelas discussões, sugestões, preparo de meios e por estarem todos sempre dispostos a ajudar.

Ao Prof. Dr. Aluizio e ao Prof. Dr. Souza, da UFPA, que sempre que solicitados estiveram prontos a ajudar, e pelo empréstimo de equipamentos essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos funcionários do Centro Nacional de Primatas, que direta ou indiretamente colaboraram com esta pesquisa.

Ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, pela licença para realização deste trabalho.

Ao *Deutsches Primatenzentrum* – DPZ, pelo apoio e pela extensão da bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa e, por juntamente com Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e Deutscher Akademischer Austauschdienst – DAAD, terem concedido a bolsa de doutorado sandwich no *Deutsches Primatenzentrum* – DPZ, Göttingen, Alemanha.

Ao Centro Nacional de Primatas – CENP, Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS, Ministério da Saúde – MS, pelo apoio fundamental para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

VALLE, R. R. **Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Sagui-de-Tufo-Branco (*Callithrix jacchus*).** [Collection, analysis and cryopreservation of semen from a model species, the common marmoset (*Callithrix jacchus*)]. 2007. 169 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A espécie *Callithrix jacchus* pode ser utilizada como modelo experimental para outras espécies de primatas neotropicais, principalmente Callithriquídeos. Colheu-se sêmen desta espécie com os objetivos de otimizar a colheita de sêmen por vibro estimulação peniana, validar técnicas de avaliação espermática que possam ser utilizadas a campo, comparar as características seminais de indivíduos de duas colônias (Brasil e Alemanha), testar diferentes protocolos de congelação espermática e avaliar a atividade citoquímica mitocondrial (DAB) e a fragmentação de DNA de espermatozoides congelados. As técnicas de coloração para avaliação espermática utilizadas foram: eosina-nigrosina, coloração dupla trypan-blue giemsa, coloração simples para acrossoma, FITC-PSA, SpermOscan<sup>®</sup>, Spermac<sup>®</sup>, coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e ensaio Cometa alcalino. A congelação foi realizada com 100 µL de sêmen com meio TEST-Gema de ovo clarificado com glicerol 4% em palhetas 0,25 mL, e os protocolos de congelação testados foram: 1) fase de equilíbrio com curva de resfriamento (25°C-4°C) em 2 horas, 10 minutos no vapor de nitrogênio e finalmente imersão em nitrogênio líquido; 2) como Protocolo 1, mas sem fase de equilíbrio/resfriamento; e 3) diretamente no nitrogênio líquido. As palhetas foram descongeladas em água a 37°C por 5-10 segundos. A técnica de colheita resultou em 83,33% dos procedimentos com ejaculação. A coloração simples para acrossomo foi eficiente e pôde ser validada para utilização a campo. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas características seminais avaliadas entre as colônias do Brasil e da Alemanha. As análises pós-descongelação demonstraram queda nas variáveis motilidade e integridade da membrana plasmática com discreta superioridade no Protocolo 1, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os protocolos para a atividade citoquímica mitocondrial e o Protocolo 2 apresentou a menor taxa de fragmentação de DNA.

Palavras-chave: Sêmen animal. Criopreservação animal. *Callithrix jacchus*. Diaminobenzidina. DNA.

## ABSTRACT

VALLE, R. R. **Collection, analysis and cryopreservation of semen from a model species, the common marmoset (*Callithrix jacchus*)**. [Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Sagui-de-Tufo-Branco (*Callithrix jacchus*)]. 2007. 169 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The *Callithrix jacchus* can be used as a model species for other Neotropical primates species, mainly Callithriquids, for reproductive studies. Semen samples were collected with the following objectives: to improve the penile vibrostimulation technique, validate sperm evaluation techniques for field work, analyse the semen characteristics from animals at 2 colonies (Brazil and Germany), use 3 different freezing protocols in common marmosets sperms, evaluate a cytochemical technique for mitochondrial activity demonstration and evaluate DNA damage in frozen-thawed sperms. The staining techniques used in this work were: Eosin-nigrosin, Trypan-blue Giemsa, simple staining for acrosome, FITC-PSA, SpermOscan<sup>®</sup>, Spermac<sup>®</sup>, demonstration of cytochrome c oxidase activity *in situ* by the oxidation of 3,3'-diaminobenzidina (DAB) and the Comet assay. Freezing was done in 100 µL semen with TEST-Yolk clarified medium plus 4% glycerol using 0.25 mL straws. The freezing protocols tested were: 1) straws at equilibrium phase with a 25°C to 4°C curve in 2 hours, 10 minutes at nitrogen vapour and finally into liquid nitrogen; 2) same as Protocol 1 without the equilibrium phase; and 3) straws directly into liquid nitrogen. All attempts resulted in 83,33% ejaculates. The simple staining technique for acrosome was validated and resulted in an obvious differentiation of the intact acrosome. Semen characteristics evaluation showed no difference between the 2 colonies. Post-thaw evaluation showed all protocols had negative effects on motility and plasmatic membrane integrity with a slightly superiority on Protocol 1. There was no difference between protocols in the mitochondrial activity demonstration and Protocol 2 presented the lowest DNA damage.

Key.words: Animal Semen. Semen. Cryopreservation. *Callithrix jacchus*. Diaminobenzidine. DNA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Callithrix jacchus</i> do Centro Nacional de Primatas – CENP Ananindeua, Brasil.....	57
Figura 2 -	Sede do Deutsches Primatenzentrum – DPZ, Göttingen, Alemanha.....	57
Figura 3 -	Colônia de <i>Callithrix jacchus</i> do Deutsches Primatenzentrum – DPZ, Göttingen, Alemanha.....	57
Figura 4 -	Sede do Centro Nacional de Primatas – CENP Ananindeua, Brasil....	59
Figura 5 -	Laboratórios e galpões de reprodução do Centro Nacional de Primatas - CENP Ananindeua, Brasil.....	59
Figura 6 -	Aparelho para vibroestimulação peniana adaptado para colheita de sêmen de <i>Callithrix jacchus</i> .....	62
Figura 7 -	Realização de colheita de sêmen em <i>Callithrix jacchus</i> por vibro estimulação peniana.....	62
Figura 8 -	Pênis de <i>Callithrix jacchus</i> dentro do tubo de vidro para colheita de sêmen.....	62
Figura 9 -	Tubo Eppendorf preparado com amostra de sêmen (1), gradiente 40% (2) e gradiente 80% (3) para centrifugação.....	67
Figura 10 -	Pellet de espermatozoides após a centrifugação.....	67
Figura 11 -	Palheta cortada e marcada para criopreservação de sêmen.....	80
Figura 12 -	Suporte com palheta para a fase de equilíbrio.....	81
Figura 13 -	a) Balde térmico com armação de ferro; b) Armação de ferro para balde térmico; c) Parte móvel da armação de ferro.....	82

Figura 14 - Amostras de sêmen de <i>Callithrix jacchus</i> colhidas por vibro estimulação peniana.....	99
Figura 15 - Fotomicrografia de espermatozóides de <i>Callithrix jacchus</i> corados por Trypan-blue Giemsa, em microscopia de luz com campo claro, objetiva 100 x sob imersão em óleo, aumento digital 4,6x.....	100
Figura 16 - Espermatozóide de <i>Callithrix jacchus</i> corados por FITC-PSA com (a) acrossomo não íntegro e (b) acrossomo íntegro, microscopia a laser sistema LSM 5 Pascal, objetiva 100x sob imersão em óleo.....	102
Figura 17 - Espermatozóides de <i>Callithrix jacchus</i> (a) e (b) corados pela técnica de coloração simples para acrossomo com (1) acrossomo íntegro e (2) acrossomo não íntegro, microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo.....	102
Figura 18 - Espermatozóides de <i>Callithrix jacchus</i> corados com Eosina-nigrosina, microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo.....	105
Figura 19 - Espermatozóide de <i>Callithrix jacchus</i> (a) com cauda fortemente dobrada e (b) morfologia normal corados com SpermOscan <sup>®</sup> , microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo.....	109
Figura 20 - Espermatozóides corados com Spermac <sup>®</sup> , (a) espermatozóide com acrossomo não íntegro e (b) com acrossomo íntegro, microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo.....	117
Figura 21 - Espermatozóides de <i>Callithrix jacchus</i> corados por DAB. (a) Classe I, (b) Classe II, (c) Classe III e (d) Classe IV, em microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo.....	131

Figura 22 - Ensaio Cometa alcalino em espermatozoides de *Callithrix jacchus* criopreseervados. (a) Classe I, (b) Classe II, (c) Classe III e (d) Classe IV, em microscopia com módulo de epifluorescência, filtro de excitação 490nm e barreira 590 nm, objetiva 40x.....134



## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com acrossoma íntegro corados por coloração simples para acrossoma e por coloração fluorescente - FITC-PSA.....26
- Gráfico 2 - Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com acrossoma íntegro, antes do tratamento e após indução da reação acrossômica, corados pela técnica de coloração fluorescente com FITC-PSA.....26
- Gráfico 3 - Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com acrossoma íntegro, antes do tratamento e após indução da reação acrossômica, corados pela técnica de coloração simples para acrossoma.....26
- Gráfico 4 - Características seminais de *Callithrix jacchus* nos diluidores TALP-HEPES e TEST-GEMA clarificado.....26
- Gráfico 5 - Características seminais de *Callithrix jacchus* das colônias do CENP, Brasil e do DPZ, Alemanha.....26
- Gráfico 6 - Características seminais de *Callithrix jacchus* antes e após a adição de glicerol.....26
- Gráfico 7 - Características seminais de *Callithrix jacchus* congelados pelo Protocolo 1 antes da congelação e após a descongelação.....26
- Gráfico 8 - Características seminais de *Callithrix jacchus* congelados pelo Protocolo 2 antes da congelação e após a descongelação.....26
- Gráfico 9 - Características seminais de *Callithrix jacchus* congelados pelo Protocolo 3 antes da congelação e após a descongelação.....26
- Gráfico 10 - Características seminais de *Callithrix jacchus* antes da congelação e

após a descongelação com a média dos protocolos 1, 2 e 3.....	26
Gráfico 11 - Características seminais de <i>Callithrix jacchus</i> após a descongelação de sêmen congelado pelos protocolos 1, 2 e 3.....	26
Gráfico 12 - Percentual de espermatozóides de <i>Callithrix jacchus</i> nas Classes I (sem fragmentação de DNA), II (pouca fragmentação), III (fragmentação moderada) e IV (DNA altamente fragmentado) em Ensaio Cometa alcalino.....	26

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com acrossomo íntegro corados pela técnica de coloração simples com diferentes temperaturas de incubação.....100
- Tabela 2 - Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com acrossomo íntegro corados pela técnica de coloração simples e por FITC-PSA.....101
- Tabela 3 - Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com acrossomo íntegro antes e após indução da reação acrossômica corados pela técnica de coloração simples e por FITC-PSA.....103
- Tabela 4 - Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com membrana plasmática íntegra de amostras de sêmen submetidas à congelação em nitrogênio líquido diluídas em amostras mantidas a 37°C.....105
- Tabela 5 - Características seminais de *Callithrix jacchus* após diluição em TEST GEMA clarificado ou TALP-HEPES.....107
- Tabela 6 - Características seminais de *Callithrix jacchus* das colônias do CENP, Brasil e do DPZ, Alemanha.....108
- Tabela 7 - Características espermáticas morfológicas de *Callithrix jacchus* das colônias do CENP, Brasil e do DPZ, Alemanha.....110
- Tabela 8 - Características seminais de *Callithrix jacchus* diluído em TEST-GEMA clarificado antes e após a adição de glicerol.....114
- Tabela 9 - Características espermáticas morfológicas de *Callithrix jacchus* diluído

em TEST-GEMA clarificado antes e após a adição do glicerol.....	115
Tabela 10 - Características seminais de <i>Callithrix jacchus</i> antes da congelação pelo Protocolo 1 e após a descongelação.....	117
Tabela 11 - Características espermáticas morfológicas de <i>Callithrix jacchus</i> antes da congelação pelo Protocolo 1 e após a descongelação.....	118
Tabela 12 - Características seminais de <i>Callithrix jacchus</i> antes da congelação pelo Protocolo 2 e após a descongelação.....	119
Tabela 13 - Características espermáticas morfológicas de <i>Callithrix jacchus</i> antes da congelação pelo Protocolo 2 e após a descongelação.....	120
Tabela 14 - Características seminais de <i>Callithrix jacchus</i> antes da congelação pelo Protocolo 3 e após a descongelação.....	121
Tabela 15 - Características espermáticas morfológicas de <i>Callithrix jacchus</i> antes da congelação pelo Protocolo 3 e após a descongelação.....	122
Tabela 16 - Características seminais de <i>Callithrix jacchus</i> antes da congelação e das médias dos protocolos 1, 2 e 3 após a descongelação.....	123
Tabela 17 - Características espermáticas morfológicas de <i>Callithrix jacchus</i> antes da congelação e das médias dos protocolos 1, 2 e 3 após a descongelação.....	124
Tabela 18 - Características seminais de <i>Callithrix jacchus</i> após a descongelação de sêmen congelado pelos protocolos 1, 2 e 3.....	126
Tabela 19 - Características espermáticas morfológicas de <i>Callithrix jacchus</i> após a descongelação de sêmen congelado pelos protocolos 1, 2 e 3.....	127
Tabela 20 - Percentual de espermatozóides móveis no sêmen de <i>Callithrix jacchus</i> congelado pelos protocolos 1, 2 e 3, nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelação.....	128

Tabela 21 - Percentual de espermatozóides com motilidade progressiva no sêmen de <i>Callithrix jacchus</i> congelado pelos protocolos 1, 2 e 3, nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelação.....	128
Tabela 22 - Percentual de espermatozóides com membrana plasmática íntegra no sêmen de <i>Callithrix jacchus</i> congelado pelos protocolos 1, 2 e 3, nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelação.....	129
Tabela 23 - Características seminais de <i>Callithrix jacchus</i> das médias dos protocolos 1, 2 e 3 nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelação.....	130
Tabela 24 - Características seminais de <i>Callithrix jacchus</i> dos protocolos 1, 2 e 3 nas médias dos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelação.....	130
Tabela 25 - Percentual de espermatozóides de <i>Callithrix jacchus</i> congelados pelos protocolos 1, 2 e 3, nas classes I, II, III e IV da avaliação da atividade citoquímica mitocondrial 1 e 2 horas após a descongelação.....	132
Tabela 26 - Percentual de espermatozóides de <i>Callithrix jacchus</i> das médias dos protocolos 1, 2 e 3, nas classes I, II, III e IV da avaliação da atividade citoquímica mitocondrial 1 e 2 horas após a descongelação.....	133
Tabela 27 - Percentual de espermatozóides de <i>Callithrix jacchus</i> congelados pelos protocolos 1, 2 e 3 nas classes I, II, III e IV da taxa de fragmentação de DNA após a descongelação.....	135

## LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Protocolo para colheita de sêmen em <i>Callithrix jacchus</i> por vibro estimulação peniana.....	63
--	----

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	26
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
3	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	32
3.1	<b>Classificação taxonômica e distribuição geográfica da espécie <i>Callithrix jacchus</i></b> .....	32
3.2	<b>Considerações sobre a espécie <i>Callithrix jacchus</i></b> .....	35
3.3	<b>Colheita de sêmen em primatas não humanos</b> .....	42
3.4	<b>O sêmen de <i>Callithrix jacchus</i></b> .....	45
3.5	<b>Criopreservação de sêmen de <i>Callithrix jacchus</i></b> .....	49
3.6	<b>Avaliação do sêmen</b> .....	50
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
4.1	<b>Animais</b> .....	56
4.2	<b>Colheita de sêmen</b> .....	60
4.3	<b>Processamento e avaliação do sêmen no local de colheita</b> .....	64
4.4	<b>Processamento e avaliação do sêmen no laboratório</b> .....	65
4.5	<b>Capacitação espermática</b> .....	68
4.6	<b>Indução da reação acrossômica</b> .....	69
4.7	<b>Protocolos de coloração espermática</b> .....	70
4.7.1	<b>Coloração para avaliação da viabilidade da membrana plasmática – Eosina – nigrosina</b> .....	70
4.7.2	<b>Coloração simples para avaliação da integridade do acrossomo</b> .....	71

4.7.3	Coloração dupla Trypan-Blue e Giemsa para avaliação da integridade acrossomal.....	72
4.7.4	Coloração por fluorescência para avaliação da integridade do acrossomo - FITC-PSA.....	73
4.7.5	Coloração para avaliação da morfologia espermática – SpermOscan® ....	74
4.7.6	Coloração para avaliação da integridade do acrossomo e morfologia espermática - Spermac® .....	75
4.7.7	Coloração para avaliação da atividade citoquímica mitocondrial – DAB...76	
4.7.8	Coloração para avaliação da taxa de fragmentação de DNA – Ensaio Cometa alcalino.....	77
4.8	<b>Protocolos de congelação.....</b>	<b>79</b>
4.8.1	Centro de Primatas da Alemanha – DPZ.....	80
4.8.1.1	<i>Congelação com fase de equilíbrio (Protocolo 1).....</i>	<i>80</i>
4.8.2	Centro Nacional de Primatas – CENP.....	82
4.8.2.1	<i>Congelação sem fase de equilíbrio (Protocolo 2).....</i>	<i>83</i>
4.8.2.2	<i>Congelação sem fase de equilíbrio e de vapor (Protocolo 3).....</i>	<i>83</i>
4.9	<b>Descongelamento das palhetas.....</b>	<b>83</b>
4.10	<b>Experimentos.....</b>	<b>84</b>
4.10.1	Experimento 1: Avaliação do uso de 3 diferentes colorações para integridade do acrossoma – Coloração simples, FITC-PSA e Trypan-blue giemsa.....	84
4.10.2	Experimento 2: Validação da coloração para avaliação da integridade da membrana plasmática – Eosina-nigrosina.....	85
4.10.3	Experimento 3: Avaliação do efeito de 2 diluidores nas características seminais de <i>Callithrix jacchus</i> .....	86



4.10.4	Experimento 4: Avaliação das características seminais em duas colônias de <i>Callithrix jacchus</i> , no DPZ, Alemanha e no CENP, Brasil.....	87
4.10.5	Experimento 5: Avaliação do efeito da adição do glicerol nas características seminais.....	88
4.10.6	Experimento 6: Avaliação do efeito de 3 protocolos de congelação de sêmen de <i>Callithrix jacchus</i> nas características seminais.....	88
4.10.7	Experimento 7: Avaliação da atividade citoquímica mitocondrial após a descongelação.....	89
4.10.8	Experimento 8: Avaliação da taxa da fragmentação de DNA do espermatozóide após a descongelação.....	90
4.11	<b>Análise Estatística</b> .....	91
4.11.1	Experimento 1: Avaliação do uso de 3 diferentes colorações para integridade do acrossomo – Coloração simples, FITC-PSA e Trypan-blue giemsa.....	92
4.11.2	Experimento 2: Validação da coloração para avaliação da integridade da membrana plasmática – Eosina-nigrosina.....	93
4.11.3	Experimento 3: Avaliação do efeito de 2 diluidores nas características seminais de <i>Callithrix jacchus</i> .....	93
4.11.4	Experimento 4: Avaliação das características seminais em duas colônias de <i>Callithrix jacchus</i> , no DPZ, Alemanha e no CENP, Brasil.....	94
4.11.5	Experimento 5: Avaliação do efeito da adição do glicerol nas características seminais.....	95
4.11.6	Experimento 6: Avaliação do efeito de 3 protocolos de congelação de sêmen de <i>Callithrix jacchus</i> nas características seminais.....	95
4.11.6.1	<i>Efeito do tempo após a descongelação e dos protocolos de congelação</i> .....	96

4.11.7	Experimento 7: Avaliação da atividade citoquímica mitocondrial após a descongelação.....	97
4.11.8	Experimento 8: Avaliação da taxa da fragmentação de DNA do espermatozóide após a descongelação.....	98
5	<b>RESULTADOS</b> .....	99
5.1	<b>Experimento 1: Avaliação do uso de 3 diferentes colorações para integridade do acrossomo – Coloração simples, FITC-PSA e Trypan-blue giemsa.....</b>	99
5.2	<b>Experimento 2: Validação da coloração para avaliação da integridade da membrana plasmática – Eosina-nigrosina.....</b>	105
5.3	<b>Experimento 3: Avaliação do efeito de 2 diluidores nas características seminais de <i>Callithrix jacchus</i>.....</b>	106
5.4	<b>Experimento 4: Avaliação das características seminais em duas colônias de <i>Callithrix jacchus</i>, no DPZ, Alemanha e no CENP, Brasil.....</b>	107
5.5	<b>Experimento 5: Avaliação do efeito da adição do glicerol nas características seminais.....</b>	113
5.6	<b>Experimento 6: Avaliação do efeito de 3 protocolos de congelação de sêmen de <i>Callithrix jacchus</i> nas características seminais.....</b>	116
5.7	<b>Experimento 7: Avaliação da atividade citoquímica mitocondrial após a descongelação.....</b>	131
5.8	<b>Experimento 8: Avaliação da taxa da fragmentação de DNA do espermatozóide após a descongelação.....</b>	134
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	137
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	154

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>156</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>168</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, 26 espécies e subespécies de primatas não humanos são consideradas ameaçadas de extinção (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004). Isto se deve principalmente à constante destruição do meio ambiente, acompanhada pela redução do *habitat* natural, ocasionadas pela urbanização desordenada das cidades, pela pressão da caça e pelo comércio clandestino da fauna e flora. Este quadro traz como consequência maior a necessidade de desenvolvimento de biotecnologias na área da reprodução (VALLE, 2002).

A preservação da biodiversidade da fauna é o principal objetivo do desenvolvimento destas biotecnologias, pois se constituem em ferramentas valiosas para a reprodução, tanto em vida livre como em cativeiro, e principalmente, para a manutenção da diversidade genética.

Porém, não devemos desconsiderar a importância do conhecimento de cada espécie através da pesquisa básica, que não deve ser deixada de lado apenas por se ter solucionado um problema individual com o uso da biotecnologia, posto que ambas são de extrema importância para a conservação e preservação das informações genéticas de cada espécie (THOMPSON, 1993).

Muitas vezes, se faz necessário um estudo básico a respeito da biologia das espécies para que se possam utilizar biotecnologias, porém, é bastante comum que uma espécie atinja um estágio onde se encontre altamente ameaçada e nada se conheça a respeito da mesma (WILDT et al., 1995).

Os macacos, tanto os do velho mundo quanto os neotropicais, possuem um papel muito importante, que é o de servir como modelos experimentais nas

pesquisas da área das ciências da saúde (VALLE, 2002).

Os primatas neotropicais (PN) são de grande importância biomédica devido à sua ocorrência no ecossistema tropical da América Central e do Sul, sua grande diversidade e sua proximidade filogenética com o Homem.

Os símios brasileiros ocupam cada vez mais espaço nesta área, uma vez que algumas espécies são largamente utilizadas em pesquisas relacionadas, por exemplo, a neurociência, xenotransplantes, câncer, genética, diversas zoonoses como tuberculose e malária, e, inclusive, servem como modelo experimental para desenvolvimento de vacinas para malária e leishmaniose, entre outras (PIECZARKA, 1998; VALLE, 2002; CARVALHO et al., 2003; MANSFIELD, 2003).

Ainda, algumas espécies não ameaçadas de PN criadas em cativeiro são amplamente utilizadas em pesquisas na área da reprodução, principalmente na América do Norte e Europa.

As espécies mais utilizadas são: sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*), mico de cheiro (*Saimiri sciureus*), macaco da noite (*Aotus spp*), e macaco prego (*Cebus spp*) (MITTERMEIER; COIMBRA-FILHO, 1983; PIECZARKA, 1998; VALLE, 2002; MANSFIELD, 2003), porém, atualmente, estudos com inúmeras outras espécies estão em andamento para verificação de seu potencial para uso em pesquisas biomédicas (PIECZARKA, 1998; VALLE, 2002).

Outro papel fundamental desempenhado pelos primatas não humanos diz respeito ao meio ambiente, visto que são essenciais para o equilíbrio ecológico, pois participam em diversas escalas da cadeia alimentar, além de serem grandes dispersores de sementes, contribuindo para a manutenção das florestas (VALLE, 2002).

No entanto, para a utilização rotineira de espécies de PN como modelos

biológicos para pesquisas na área da reprodução, assim como para a conservação de populações selvagens, há necessidade de mais estudos sobre a fisiologia reprodutiva destas espécies, uma vez que apresentam variações entre as espécies de PN e diferem marcadamente das espécies de primatas do Velho Mundo, que têm sido mais estudadas.

Existem estudos sobre os aspectos da fisiologia reprodutiva das 4 espécies citadas anteriormente (BUSH et al., 1975; NAGLE; DENARI, 1982; CUI et al., 1991; YEOMAN et al., 1997a, 1997b; BARNABE et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2002; GUIMARÃES; OLIVEIRA; BARNABE, 2003) e de *Alouatta caraya* (VALLE et al., 2004; KUGELMEIER et al., 2005), porém, estudos com sêmen, oócitos e desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas para utilização em reprodução assistida têm sido mais realizados em sagui-de-tufo-branco e mico de cheiro (DUKELOW, 1983; HEARN, 1983; DUKELOW et al., 1990; GILCHRIST et al. 1995; CUI, 1996; KUEDERLING; MORREL; NAYUDU, 1996; MORREL; KUEDERLING; HODGES, 1996; GILCHRIST; NAYUDU; HODGES, 1997; MORREL et al., 1997; YEOMAN et al., 1997a, 1997b; MORREL et al., 1998; YEOMAN et al., 1998; KUEDERLING et al., 2000; VALLE et al., 2005a; VALLE; GUIMARÃES; NAYUDU, 2006).

A utilização de tecnologias de reprodução assistida como uma ferramenta eficaz no manejo genético de populações de animais selvagens em cativeiro ou semicativeiro tem sido defendida e incentivada dentro do contexto de um programa de conservação integrado (BALLOU, 1992; MORREL; e HODGES, 1998; HOWARD; MARINARI; WILDT, 2003; HOLT et al., 2003).

Entretanto, para que estas tecnologias sejam eficazes e seguras para utilização em espécies ameaçadas, elas precisam ser otimizadas por meio de

estudos que utilizem espécies não ameaçadas como modelo (NOWSHARI; NAYUDU; HODGES, 1994; NOWSHARI; NAYUDU; HODGES, 1995; ISACHENKO; NAYUDU, 1999).

Adicionalmente, uma estratégia apropriada deve ser desenvolvida para um manejo genético com objetivos específicos. O banco de sêmen é um elemento chave neste programa, e é o método mais eficaz e menos invasivo para introdução de material genético em uma população, por exemplo, com seu uso em programas de inseminação artificial e transferência de embriões.

Atualmente não existe nenhum banco de sêmen específico de primatas, ou programas de inseminação artificial, que sejam utilizados rotineiramente em manejo genético de populações em cativeiro ou vida livre.

A formação de um banco de sêmen pode ser uma solução viável como o passo inicial para se estudar e promover a diversidade genética em populações isoladas (WILDT, 1989; MORRELL; HODGES, 1998).

Este estudo teve o intuito de ser o primeiro passo para o início de um plano cooperativo internacional que envolve as três instituições discriminadas abaixo para implantação de um banco de sêmen de primatas neotropicais no Brasil (VALLE et al., 2005a).

O Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo – SP, Brasil, é pioneiro no estudo da biologia, fisiologia e biotecnologia da reprodução de animais selvagens no Brasil, incluindo diversas espécies de primatas como *Cebus apella* (GUIMARÃES, 1994; GUIMARÃES, 1999; BARNABE et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2002; GUIMARÃES; OLIVEIRA; BARNABE, 2003) *Alouatta*

*caraya* (VALLE, 2002; VALLE et al., 2004; KUGELMEIER et al., 2005) e *Callithrix jacchus* (VALLE; GUIMARÃES; NAYUDU, 2006).

O Centro Nacional de Primatas – CENP, órgão da Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS, Ministério da Saúde – MS, Ananindeua – PA, Brasil, possui um valioso e numeroso plantel de espécies brasileiras de primatas, incluindo espécies ameaçadas, infra-estruturas laboratorial e para manutenção dos animais, e tem apoiado pesquisadores da FMVZ – USP no estudo reprodutivo de PN.

O Centro de Primatas da Alemanha – DPZ (Deutsches Primatenzentrum – DPZ), Goettingen, Alemanha, por meio de seus pesquisadores, desenvolveu durante muitos anos um programa de reprodução assistida para o sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*), uma espécie que foi escolhida como modelo para espécies de callitriquídeos ameaçadas (GILCHRIST et al., 1995; KUEDERLING; MORREL; NAYUDU, 1996; MORREL; KUEDERLING; HODGES, 1996; GILCHRIST; NAYUDU; HODGES, 1997; MORREL et al., 1997; KUEDERLING et al., 2000).

Este centro possui excelente infra-estruturas laboratorial e para manutenção de primatas, além de ampla colônia de *Callithrix jacchus*.

O projeto foi executado no CENP, Ananindeua - Pará, Brasil, no Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP, São Paulo – São Paulo, Brasil e no DPZ, Göttingen - Niedersachsen, Alemanha.



## 2 OBJETIVOS

O estudo visou:

- ❶ Otimizar e estabelecer uma técnica segura e eficaz para colheita de sêmen, a vibroestimulação peniana, da espécie modelo *Callithrix jacchus*.
- ❷ Otimizar e validar técnicas para análise e avaliação espermática.
- ❸ Avaliar o efeito de 2 diluidores, TALP-HEPES e TEST-GEMA clarificado nas características seminais de *Callithrix jacchus*.
- ❹ Avaliar e comparar as características seminais da colônia de *Callithrix jacchus* do Centro Nacional de Primatas – CENP e do *Deutsches Primatenzentrum* – DPZ.
- ❺ Avaliar o efeito do glicerol nas características seminais da espécie *Callithrix jacchus*.
- ❻ Avaliar e comparar três protocolos para a criopreservação do sêmen de *Callithrix jacchus*.
- ❼ Avaliar a atividade citoquímica mitocondrial de espermatozóides criopreservados de *Callithrix jacchus*.
- ❽ Avaliar a taxa de fragmentação do DNA de espermatozóides criopreservados de *Callithrix jacchus*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Os primatas neotropicais (PN) ou primatas do novo mundo pertencem à infraordem Platyrrhini (AURICCHIO, 1995). Esta infraordem é composta por 3 Famílias, 18 gêneros, 111 espécies e 205 espécies e subespécies, distribuídos desde o sul do México até o norte da Argentina e Paraguai, e provavelmente nordeste do Uruguai (SCHNEIDER; ROSENBERGER, 1996; RYLANDS et al., 2000).

O Brasil é o país com o maior número de espécies e subespécies de primatas Neotropicais, com 17 gêneros, 85 espécies e 126 espécies e subespécies, destas, 76 são endêmicas (AURICCHIO, 1995; RYLANDS; MITTERMEIER; RODRÍGUEZ-LUNA, 1995; RYLANDS et al., 2000).

#### 3.1 Classificação taxonômica e distribuição geográfica da espécie *Callithrix jacchus*

A taxonomia dos primatas neotropicais é constantemente revisada. Existe uma grande discordância entre os diversos autores quanto ao posicionamento de determinadas espécies, ou até mesmo quanto ao número de famílias.

Ainda, o desenvolvimento de técnicas mais modernas e precisas para análise genética, as recentes descobertas e a descrição de novas espécies contribuem para a freqüente mudança na taxonomia e aumento no número de espécies de primatas, principalmente na Amazônia brasileira.

Por este motivo deve-se ter cautela ao classificar taxonomicamente determinada espécie de primata ou descrever uma nova espécie. Sempre que uma classificação diferente ou uma espécie nova é sugerida, são necessários diversos estudos para confirmação e aceitação pela comunidade científica.

No caso de uma nova denominação para determinada espécie, muitas vezes a comunidade científica decide por continuar a utilizar o termo mais conhecido em detrimento do novo termo (RYLANDS et al., 2000), mesmo que muitas vezes o novo termo seja considerado mais correto, por exemplo, por ser o termo mais antigo utilizado para denominar a espécie em questão.

Ao considerar os animais que ocorrem na Amazônia e na Mata Atlântica, até então classificados no gênero *Callithrix*, como dois gêneros separados, Rylands et al. (2000) sugeriram classificar os animais do grupo amazônico como gênero *Mico* e o outro grupo como *Callithrix*.

Com base nesta classificação, o gênero *Callithrix* é composto, atualmente, por 6 espécies reconhecidas, *Callithrix jacchus*, *C. penicillata*, *C. kuhlii*, *C. geoffroyi*, *C. aurita* e *C. flaviceps*, todas endêmicas no Brasil (RYLANDS; MITTERMEIER; RODRÍGUEZ-LUNA, 1995; RYLANDS et al., 2000). Destas, 50% encontram-se ameaçadas de extinção, são elas: *C. kuhlii*, *C. aurita* e *C. flaviceps* (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004).

A espécie *Callithrix jacchus* é conhecida pelos nomes vulgares sagui-de-tufo-branco, sagui-do-nordeste, sagui comum, mico estrela, *Common Marmoset* (Ing.) e *Weissbuchenaffen* (Alem.).

Classificação taxonômica do Sagui-de-tufo-branco segundo Schneider em Schneider e Rosenberg (1996):

**Classe**

Mammalian

**Ordem**

Primate

**Infraordem**

Platyrrhini

**Família**

Cebidae

**Subfamília**

Callitrichinae

**Tribo**

Callitrichini

**Gênero***Callithrix* (Erxleben, 1777)**Espécie***Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758)

A área de ocorrência natural da espécie *Callithrix jacchus* abrange o nordeste brasileiro, ao norte do rio São Francisco e ao leste do rio Parnaíba. Atualmente, a espécie pode ser encontrada em todo o território nacional como consequência de sua introdução nas diferentes regiões, onde é considerada espécie invasora (STEVENSON; RYLANDS, 1988; AURICCHIO, 1995).

### 3.2 Considerações sobre a espécie *Callithrix jacchus*

A espécie *Callithrix jacchus* possui cariótipo  $2n = 46$  (PEDREIRA; PEIXOTO, 1975).

Habitam originalmente a Caatinga e o Cerrado, em formações arbóreas baixas (STEVENSON; RYLANDS, 1988; AURICCHIO, 1995).

Os animais desta espécie apresentam tufo de pêlos brancos na região supra auricular, a pelagem do corpo com colorações preta, cinza e laranja e a cauda preta e cinza. Há presença de garra em todos os dedos, com exceção do halux oposto que apresenta unha achatada. Possuem 36 dentes, com dois dentes molares superiores e dois inferiores em cada lado e caninos inferiores com formato e tamanho semelhantes aos incisivos, que juntos resultam em um formato de copo (STEVENSON; RYLANDS, 1988).

São animais de porte pequeno, com 25 cm em média de comprimento corporal e cauda com 28 cm em média (STEVENSON; RYLANDS, 1988; AURICCHIO, 1995).

Araújo et al. (2000) compararam o peso de animais adultos em cativeiro e vida livre, ambos no Brasil, e não encontraram dimorfismo sexual, porém os animais de vida livre apresentaram peso significativamente menor. Os valores encontrados foram  $347,6 \pm 30,5$  g e  $317,9 \pm 34,1$  g nos machos e  $359,7 \pm 50,4$  g e  $322 \pm 40,4$  g nas fêmeas, em cativeiro e vida livre, respectivamente (ARAÚJO et al., 2000).

Na colônia do Centro de Primatas da Alemanha (*Deutsches Primatenzentrum* – DPZ), Goettingen, Alemanha, Valle et al. (2005b) encontraram 70% dos animais, machos e fêmeas adultos, com peso superior a 400 g.

Esta espécie é arborícola, diurna e considerada exudativa-insetívora, pois sua dieta é baseada em exudato das árvores, principalmente goma, e insetos, embora frutas, folhas, pequenos vertebrados, invertebrados e ovos também sejam ingeridos, porém, em menor quantidade (STEVENSON; RYLANDS, 1988).

O sistema social e reprodutivo da espécie *Callithrix jacchus* não difere muito dos outros Callitriquídeos. Organizam-se em grupos que variam de 3 a 15 indivíduos, e, embora possa ocorrer a reprodução de duas ou mais fêmeas do grupo, usualmente apenas uma fêmea dominante reproduz com um único macho dominante reprodutor, com dominância da fêmea sobre o macho (STEVENSON; RYLANDS, 1988; NIEVERGELT et al., 2002; FAULKES; ARRUDA; MONTEIRO DA CRUZ, 2003).

Nievergelt et al. (2002) observaram em seu estudo que duas fêmeas reprodutoras acasalavam principalmente com apenas um macho dominante e classificaram a espécie *Callithrix jacchus* como poliginimonândrica. Em contraste, Li et al. (2005) relataram em sua revisão que esta espécie é predominantemente monogâmica em vida livre, com apenas um casal dominante reprodutor por grupo social.

A supressão da ovulação das fêmeas subordinadas pela fêmea dominante é comportamental e endocrinológica, já nos machos a supressão é apenas comportamental, o que possibilita que machos subordinados tenham a capacidade de reproduzir com as fêmeas dominantes (STEVENSON; RYLANDS, 1988). As fêmeas subordinadas restabelecem a ovulação rapidamente quando removidas de seus grupos sociais (ABBOTT; HODGES; GEORGE, 1988).

As fêmeas atingem a maturidade sexual em média aos 12-13 meses de idade, quando ocorre a primeira ovulação. Nos machos, este processo ocorre aos

14-15 meses de idade, com o desenvolvimento da habilidade para copular e a ejaculação de espermatozoides móveis (ABBOTT et al., 2003; TARDIF et al., 2003). Porém, nos machos esta maturidade pode ocorrer ligeiramente mais cedo, aproximadamente aos 11-13 meses (TARDIF et al., 2003).

A gestação tem duração de 143 ou 144 dias em média, culminando normalmente no nascimento de gêmeos dizigóticos (FAULKES; ARRUDA; MONTEIRO DA CRUZ, 2003; TARDIF et al., 2003). Em cativeiro é comum o nascimento de 3 filhotes (20 - 25%) oriundos de uma mesma gestação, mas este número pode chegar a 5 (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

Contrariamente ao que ocorre em humanos e primatas do velho mundo, *Callithrix jacchus* apresenta atividade ovariana 10-50 dias após o parto, portanto dentro do período de lactação (o desmame ocorre em média entre os dias 40 e 120 pós-parto), quando a ovulação e concepção podem ocorrer (HEARN et al., 1978).

Nesta espécie, os cuidados com a prole não são responsabilidade apenas da mãe, o macho dominante e os indivíduos mais velhos do grupo ajudam a cuidar dos filhotes carregando, protegendo e oferecendo alimentos sólidos. Este comportamento está associado ao alto nível de prolactina circulante (STEVENSON, RYLANDS, 1988; ABBOTT et al., 2003).

Para *Callithrix jacchus*, ao menos em cativeiro, a reprodução ocorre durante todo o ano, não há estação reprodutiva aparente, assim como variação nos níveis sanguíneos de testosterona em animais adultos em um período de 12 meses (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

As cópulas entre os indivíduos dominantes ocorrem durante todo o ciclo ovariano, principalmente quando a fêmea está em estro (KENDRICK; DIXSON, 1983). A fêmea dominante apresenta ciclo ovariano com 28 dias de duração, dos

quais 20 dias de fase luteal e 8 dias de fase folicular, com a liberação de folículos múltiplos em cada ovulação, o que resulta no nascimento de gêmeos em 30-70% das gestações (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

Padrões comportamentais reprodutivos incluem movimentos rápidos de exposição da língua. Este comportamento está presente na fêmea quando esta solicita a cópula ao macho e durante a cópula, porém, é mais freqüente durante o período periovulatório (KENDRICK; DIXSON, 1983; STEVENSON; RYLANDS, 1988).

Os machos apresentam este comportamento durante a cópula, com aumento da freqüência durante a monta e a ejaculação. Durante a fase periovulatória das parceiras, ocorre diminuição na duração do intervalo pós-ejaculatório com aumento na duração da ereção após a ejaculação (KENDRICK; DIXSON, 1983).

Os machos de *Callithrix jacchus*, quando separados de suas parceiras, ao retornarem, ou quando colocados com fêmeas de outros grupos, costumam copular em alguns minutos (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

Segundo Cui e Matthews (1994), anatomicamente o sistema reprodutor feminino de *Callithrix jacchus* apresenta vagina com um isthmus vaginal (diâmetro menor que 1,5 mm) que a separa em vagina inferior e superior, com  $17 \pm 3$  mm de comprimento cada. Os autores descreveram útero piriforme com  $8,4 \pm 1,8$  mm de comprimento (entre a junção do útero com a vagina e o fundo do útero),  $10 \pm 1,4$  mm de largura (entre os 2 cornos) e  $6,4 \pm 1,3$  mm de espessura (máxima), as tubas de Falopio apresentaram  $10,5 \pm 1,2$  mm de comprimento e  $1,5 \pm 0,1$  mm de largura, e os ovários com formato de ervilha apresentaram tamanho médio de  $5,3 \times 4,3 \times 3,8$  mm. Os valores referentes à vagina, útero, e tubas estão expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão (CUI; MATTHEWS, 1994).



Ainda de acordo com estes autores, embora a velocidade dos espermatozoides de *Callithrix jacchus* (CUI et al., 1991) seja duas vezes maior que a de espermatozoides humanos (MAKLER et al., 1979) e a vagina desta espécie seja proporcionalmente maior que a humana, o sêmen é depositado no istmo vaginal, em contraste com o sêmen humano, cujo depósito é realizado na cervix. A implantação embrionária (blastocistos) ocorre 11-12 dias após a ovulação (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

Mais tarde, durante o desenvolvimento, ocorre a formação do disco placentário dos gêmeos com anastomose vascular entre eles, que resulta em indivíduos adultos, quando de sexos opostos, com linfócitos que apresentam cariótipo XX e XY. Este quimerismo foi reportado em células sanguíneas, da medula óssea, linfonodos e baço, porém não está presente em pulmão e fígado. Ainda não está claro se está ou não presente em células germinativas (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

Existe muito pouca informação a respeito da fisiologia testicular da espécie *Callithrix jacchus* ao nascimento. Nesta fase os testículos ainda estão intra-abdominais, e a descida para o escroto ocorre aos 8 - 11 meses de idade (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

Os testículos de animais desta espécie com 140 dias de gestação até um dia de idade não apresentam espermatogônia. No entanto, com 1 a 2 dias de idade, apresentam cerca de 50000 células germinativas, 69% gonócitos e 31% pré-espermatogônias (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

Estima-se que existam aproximadamente  $25 (18-35) \times 10^6$  células de Sertoli por testículo de primatas *Callithrix jacchus* a partir de 21 meses de idade (LI et al., 2005). Aos 12 meses de idade, as células de Sertoli já se desenvolveram e

assumiram sua morfologia definitiva (DE SOUZA et al., 1988). O número final de células de Sertoli determina o tamanho final dos testículos e a produção diária de espermatozóides (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

De todas as espécies estudadas até o momento, *Callithrix jacchus* é a única espécie que apresenta células de Sertoli com morfologia uniforme em todos os diferentes estágios do epitélio seminífero, diferente do que ocorre nas outras espécies que apresentam variações morfológicas resultantes em uma organização espaço-temporal em ciclos ou ondas considerada responsável pela regulação espermatogênica. Por este motivo torna-se um excelente modelo comparativo para o estudo dos fatores que determinam a organização celular do epitélio seminífero (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

Aos 8 meses de idade aparecem pela primeira vez espermatogônias do tipo adultas e espermatócitos primários (LI; DONALD; GOLUB, 2005). Aos 12 meses de idade, alguns animais já apresentam todos os estágios da espermatogênese e espermiogênese, embora o número de espermatozóides maduros seja menor que em animais mais velhos (DE SOUZA et al., 1988).

Na espécie *Callithrix jacchus*, o ciclo espermatogênico tem duração de aproximadamente 10 dias e a espermatogênese de aproximadamente 37 dias. Devido a importantes similaridades com a espermatogênese humana, esta espécie pode ser considerada viável como modelo experimental para estudos comparativos relevantes sobre a função testicular humana (MILLAR et al., 2000). Porém, devido à particularidades na regulação hormonal do desenvolvimento testicular ou da função testicular observados apenas nesta espécie até o presente momento, ela não é recomendada para estudos com agentes tóxicos que afetem a regulação hormonal (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

Esta espécie apresenta espermatogênese com alta eficiência quando comparada a ratos e humanos (WEINBAUER et al., 2001; LI; DONALD; GOLUB, 2005).

O nível sanguíneo de testosterona varia acentuadamente entre indivíduos desta espécie. Em geral fica em torno de 2,7-5,5 ng/mL com 2 semanas de idade, aumenta para 5-20 ng/mL com 3-6 semanas de idade, diminui para 1,8 ng/mL com 8 semanas de idade, permanece baixo ou indetectável por cerca de 15 a 20 semanas e surge novamente com aproximadamente 8 meses de idade, quando as células de Leydig do tipo adulta atingem seu nível máximo e os níveis de testosterona ficam entre 30-50 ng/mL (normalmente >10 ng/mL) (LI; DONALD; GOLUB, 2005).

O hormônio LH (hormônio luteinizante) é o único hormônio luteinizante gonadotrófico produzido fisiologicamente em quantidades relevantes pelas glândulas pituitária em todas as espécies de mamíferos estudadas até o presente momento, com exceção do cavalo, cobaia (*Cavia porcellus*) e sagüis de tufo branco (*Callithrix jacchus*). No entanto, apesar de não ter LH, *Callithrix jacchus* possui CG (gonadotrofina coriônica) produzido pelas glândulas pituitárias em quantidade suficiente para manter o desenvolvimento e as funções normais do sistema reprodutivo masculino como, por exemplo, a espermatogênese (MULLER et al., 2004; LI; DONALD; GOLUB, 2005).

### 3.3 Colheita de sêmen em primatas não humanos

A colheita de sêmen de animais selvagens pode ser realizada por diversas técnicas, sendo que a eletroejaculação por via retal (EE) é um dos métodos considerados mais seguros e apropriados, devendo-se estabelecer um protocolo para cada espécie, e de acordo com a resposta do animal, para cada indivíduo, sendo a anestesia o principal fator de risco neste procedimento (DURRANT, 1990).

Esta técnica já foi utilizada com sucesso em algumas espécies de primatas neotropicais como mico de cheiro (*Saimiri sciureus*) (LANG, 1967), sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) (CUI et al., 1991), macaco-prego (*Cebus apella*) (BUSH et al., 1975; GUIMARÃES, 1994; BARNABE et al., 2002), bugio preto e dourado (*Alouatta caraya*) (VALLE et al., 2004), e em muitas outras espécies como *Macaca fascicularis* (SANKAI et al., 1994), dentre outras (GOULD; WARNER; MARTIN, 1978; WATSON, 1978; GOULD; MARTIN; WARNER, 1985; THOMSON et al., 1992; SANKAI et al., 1994), porém em algumas delas, ainda não foi possível conseguir a dissolução do coágulo para posterior análise.

O grande obstáculo para a análise e processamento do sêmen da maioria dos primatas é a coagulação, que ocorre durante ou logo após a ejaculação (VALLE, 2002).

Para os primatas do velho mundo existem algumas técnicas e protocolos utilizados para a colheita de sêmen e para dissolução do coágulo (GOULD; WARNER; MARTIN, 1978; GOULD; STYPEREK, 1989; TOLLNER et al., 1990; THOMSON et al., 1992; SANKAI et al., 1994), porém há a necessidade de se estabelecer técnicas de colheita e diluidores ideais para as espécies de primatas

neotropicais.

Para Roth (1993), a baixa qualidade do sêmen se constitui num dos principais problemas para se obter sucesso na formação de um banco de sêmen, o que dificulta, e às vezes, até inviabiliza sua utilização após o descongelamento. Conseqüentemente, esta baixa qualidade diminui a possibilidade de sucesso em programas de reprodução assistida que utilizem outras técnicas como inseminação artificial, fecundação *in vitro* e transferência de embrião em espécies raras.

A qualidade seminal de primatas é afetada pela técnica utilizada para a colheita, como foi demonstrado em estudos realizados em diversas espécies que compararam a colheita por eletroejaculação por via retal (EE) com diferentes técnicas como vagina artificial em *Pan troglodytes* (GOULD; YOUNG, 1996), lavagem vaginal após a cópula em *Callithrix jacchus* (MORREL; KUEDERLING; HODGES, 1996), vibroestimulação peniana (PVS) em *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997b; YEOMAN et al., 1998) e *Callithrix jacchus* (SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004).

Embora a EE seja a técnica mais indicada para algumas espécies, em todos os estudos citados acima foi a que apresentou qualidade espermática mais baixa.

Nesta última espécie, sêmen de boa qualidade pode ser obtido por meio de lavagem vaginal subsequente à cópula natural. Após observação da cópula, a fêmea é contida apenas fisicamente, posicionada com a cabeça para baixo, e 100 µL de meio TEST-gema de ovo modificado é gentilmente colocado na vagina com auxílio de uma pipeta e ponteira plástica descartável com capacidade para 0,5 mL com um tubo flexível com 2 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro externo acoplado na extremidade final. O meio é gentilmente colocado na vagina e retirado 2 ou 3 vezes consecutivas e finalmente transferido para um tubo Eppendorf. A fêmea é

recompensada com larvas de insetos ou alimentos doces (KUEDERLING et al., 1996).

Das técnicas já comparadas com a eletroejaculação por via retal, uma nova técnica vem sendo utilizada com bastante sucesso em algumas espécies de primatas neotropicais de pequeno porte como *Callithrix jacchus* e *Saimiri boliviensis*, é a colheita de sêmen por vibroestimulação peniana (PVS) (YEOMAN et al., 1997b; YEOMAN et al., 1998; KUEDERLING et al., 2000; VALLE; GUIMARÃES; NAYUDU, 2006).

Ainda, o sêmen obtido por PVS apresenta melhor qualidade e menor quantidade de coágulo do que quando colhido por eletroejaculação em *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997b; YEOMAN et al., 1998).

Em *Callithrix jacchus*, a concentração espermática, o número total de espermatozoides por ejaculado e o percentual de espermatozoides vivos obtidos em colheita por PVS é significativamente maior do que quando colhidos por EE, e, a motilidade, é em média três a quatro vezes maior (SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004).

Esta técnica é utilizada para colheita de sêmen humano de indivíduos com injúrias na coluna vertebral (SZASZ; CARPENTER, 1989; SONKSEN; BIERING-SORENSEN; KRISTENSEN, 1994). No caso de primatas neotropicais de pequeno porte, uma das principais vantagens deste método é não necessitar de anestesia para a realização do procedimento (YEOMAN et al., 1997b).

O equipamento, um vibroestimulador Ferticare<sup>®</sup> Clínico (Multicept, Copenhagen, Dinamarca) consiste de uma unidade de força que controla a frequência (70 – 110 Hz) e a amplitude (1 – 3,5 mm) da vibração e uma unidade vibratória. Na unidade vibratória adapta-se um tubo de silicone, e neste acopla-se

um tubo de vidro que funciona como uma vagina artificial (YEOMAN et al., 1997b).

Em estudo com 15 *Saimiri boliviensis*, 80% responderam positivamente à colheita por PVS, destes, 100% apresentaram espermatozóides móveis. Na colheita por EE 100% responderam positivamente, mas com apenas 60% dos ejaculados com espermatozóides móveis. Na PVS, o volume encontrado foi  $436 \pm 90 \mu\text{L}$ , a concentração espermática foi  $77,1 \pm 20,4 \times 10^6 / \text{mL}$  e motilidade  $80,6 \pm 4,3\%$ , e na EE volume de  $205 \pm 25 \mu\text{L}$ , concentração  $2,8 \pm 1,7 \times 10^6 / \text{mL}$  e motilidade  $44,1 \pm 11,4\%$ . A análise bioquímica demonstrou maiores concentrações de frutose ( $2,88 \pm 0,67$  e  $1,22 \pm 0,32 \text{ mg} / \text{ejaculado}$ ) e ácido cítrico ( $0,46 \pm 0,14$  e  $0,14 \pm 0,04 \text{ mg} / \text{ejaculado}$ ) nas colheitas por vibroestimulação peniana (YEOMAN et al., 1998).

O modelo de uso pessoal é menor e de fácil manuseio. Neste modelo, FertiCare<sup>®</sup> Personal Vibrator (Multicept ApS, Rungsted, Dinamarca), as duas unidades são acopladas e a mesma adaptação é executada para que funcione como uma vagina artificial (KUEDERLING et al., 2000).

### **3.4 O Sêmen de *Callithrix jacchus***

Um dos estudos pioneiros com gametas masculinos de *Callithrix jacchus* foi realizado por Moore (1981), que colheu espermatozóides diretamente do epidídimo para avaliar sua capacidade de fertilização em oócitos de hamsters livres da zona pelúcida. O autor constatou que, como ocorre em outras espécies, o espermatozóide adquire sua capacidade para a fertilização durante sua passagem pelo epidídimo, porém não foi possível determinar exatamente qual a região específica em que isto

ocorre.

Davis (1982) colheu sêmen de *C. jacchus* por eletroejaculação com aproximadamente 95% de sucesso nos procedimentos realizados. Após análise em microscopia de luz e eletrônica, verificou que os ejaculados apresentaram espermatozóides viáveis com estrutura intacta. A motilidade encontrada geralmente foi acima de 60% com motilidade progressiva retilínea, exceto os espermatozóides presentes no coágulo.

O estudo morfométrico demonstrou espermatozóides com 50 µm de comprimento total, cabeça achatada bilateral e dorsoventralmente com 5 µm de comprimento e 3 µm de largura. Todas as amostras apresentaram menos de 1% de espermatozóides anormais. As anormalidades incluíram acrossoma invaginado, acrossoma duplo, mal formado e núcleo invaginado. Foram encontrados ainda espermatozóides com gota citoplasmática na peça intermediária, porém sem sinais adicionais de imaturidade espermática (DAVIS, 1982).

Segundo Schneiders (2004), o espermatozóide de *Callithrix jacchus* apresentou 56,93µm de comprimento total, cauda com 51,84 µm de comprimento, cabeça com 5,08 µm de comprimento e 3,34 µm de largura.

Em seu estudo com colheita de sêmen de 16 *C. jacchus* com a técnica de eletroejaculação, Cui et al. (1991) observaram considerável variação inter e intra indivíduos, obtiveram, em média, volume 30 µL (8-85 µL) e espermatozóides totais  $5,1 \times 10^6$  ( $0,1 - 43 \times 10^6$ ). A motilidade progressiva foi 48% (10 – 76%) e 49% (24 – 81%) dos espermatozóides apresentaram morfologia normal. Defeitos de cauda foram mais comuns que anormalidades na cabeça do espermatozóide.

Os autores sugerem que esta técnica pode ser utilizada rotineiramente para a colheita de sêmen desta espécie, porém variações inter e intra indivíduos devem ser



esperadas, e que é importante o exame de diversas amostras seminais de um mesmo animal para a caracterização de seu perfil espermático (CUI et al., 1991).

Um estudo para verificar o efeito do estresse nas características seminais de *Callithrix jacchus* colhido por eletroejaculação demonstrou que animais mantidos com fêmeas e sem exposição a situações de estresse por um período de 2 anos apresentaram pH  $7,51 \pm 0,22$ . O volume ( $40,2 \pm 27,2 \mu\text{L}$ ), a concentração espermática ( $27,3 \pm 14,8 \times 10^4$  espermatozóides/ $\mu\text{L}$ ), a motilidade ( $47,4 \pm 15,9\%$ ), o percentual de espermatozóides com morfologia normal ( $51,8 \pm 13,7\%$ ), o número total de espermatozóides por ejaculado e o percentual de espermatozóides móveis normais por ejaculado por animal foram significativamente maiores do que os animais mantidos sozinhos e submetidos à colheita de sangue semanal no mesmo período (CUI, 1996).

Um estudo sobre fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário na espécie *Callithrix jacchus* foi desenvolvido com sêmen epididimário. Estudos preliminares demonstraram que após colheita por eletroejaculação, poucos espermatozóides puderam ser separados do coágulo formado imediatamente após a ejaculação e todas as tentativas para liquefazer o coágulo não obtiveram sucesso (WILTON et al., 1993).

Segundo estes autores, os espermatozóides livres do coágulo eram extremamente sensíveis à centrifugação, com baixa motilidade e viabilidade, com sobrevivência *in vitro* abaixo de 8 horas. Já os espermatozóides epididimários sobreviveram mais de 48 horas em meio suplementado com soro de *Callithrix jacchus*. Espermatozóides colhidos pelas duas técnicas apresentaram sobrevida menor que 6 horas em meio suplementado com soro fetal bovino (WILTON et al., 1993).

Kuederling, Morrel e Nayudu (1996), após colheita de sêmen de *Callithrix jacchus* por lavagem vaginal imediatamente após a cópula, analisaram apenas a fração líquida do volume recuperado, que apresentou concentração com valor médio  $6,07 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$  ( $\pm 1,3$  SEM), motilidade média 68,5% ( $\pm 3,4$  SEM), espermatozóides com membrana plasmática íntegra ou vivos 84,1% ( $\pm 1,7$  SEM).

Quando a técnica utilizada foi a PVS, os valores médios encontrados foram 31,9  $\mu\text{L}$  para volume, número total de espermatozóides  $34,2 \times 10^6$  por ejaculado, concentração  $1154,2 \times 10^6$  espermatozóides / mL, 74,6 % de espermatozóides com membrana plasmática íntegra ou vivos e 59,6 % de espermatozóides móveis. Neste estudo, a concentração e o número total de espermatozóides por ejaculado foi maior em machos alojados individualmente do que em machos alojados com fêmeas (KUEDERLING et al., 2000).

Resultados semelhantes foram encontrados por Grupen, Scott e Gilchrist (2004), que observaram número total de espermatozóides ( $10,1 \pm 2,2 \times 10^6$  versus  $3,9 \pm 1,4 \times 10^6$ ;  $P < 0,05$ ) e motilidade ( $85 \pm 13$  % v.  $35 \pm 9$  %;  $P < 0,01$ ) maiores em ejaculados de machos alojados com outros machos do que de machos alojados com fêmeas.

Em outro estudo, Schneiders (2004) reportou que o sêmen colhido por vibro estimulação apresentou as seguintes características (Média  $\pm$  Desvio Padrão): volume  $21,8 \pm 9,9 \mu\text{L}$ , concentração  $655 \pm 641,9 \times 10^6$  espermatozóides / mL,  $73,6 \pm 17,2$  % com membrana plasmática íntegra, motilidade  $56,9 \pm 22,2$  % e  $33,8 \pm 20,5$  % de espermatozóides com morfologia anormal.

Um teste de toxicidade em espermatozóides de *Callithrix jacchus* para dois gradientes de sílica coloidal utilizados para remoção de bactérias, detritos celulares, espermatozóides imóveis e plasma seminal, Percoll e PureSperm<sup>®</sup>, demonstrou que

ambos podem ser utilizados na centrifugação do sêmen desta espécie em gradientes com diferentes densidades (HERNANDEZ-LOPEZ et al., 2005).

### 3.5 Criopreservação de sêmen de *Callithrix jacchus*

A criopreservação de sêmen da espécie *Callithrix jacchus* e seus efeitos no espermatozóide carecem de estudos e necessita ser otimizada para utilização em programas de reprodução assistida.

Davis (1982) utilizou dois diluidores rotineiramente usados para espécies domésticas, um a base de leite de cabra e o outro a base de lactose e leite desnatado para criopreservar o sêmen de *C. jacchus*. A autora verificou que ambos diluidores apresentaram severa redução na motilidade e mais de 85% de espermatozoides com membrana plasmática, acrossoma e mitocôndrias danificados.

O sêmen desta espécie obtido diretamente do epidídimo foi criopreservado após diluição em meio à base de Test-gema de ovo com 5% de glicerol, com auxílio de um congelador celular programável. A curva utilizada neste estudo foi resfriamento de 15°C para 5 °C em 20 minutos, com posterior congelamento a -80°C em 2 minutos. Testes de fertilização *in vitro* demonstraram que 31% dos oócitos foram fertilizados (comparados a 82% com sêmen a fresco) e desenvolveram até o estágio de 8 células. Filhotes foram obtidos após a transferência de 3 embriões para receptoras (HOLT et al., 1994).

Morrel e Hodges (1998) obtiveram gestações e nascimentos de trigêmeos após inseminação artificial em seis fêmeas de *Callithrix jacchus* com sêmen de

origem epididimária descongelado.

O sêmen ejaculado de *C. jacchus* criopreservado após diluição em meio a base de Test-gema de ovo com 5% de glicerol e curva com resfriamento de 5°C para -25°C em 5 minutos e em seguida para -100°C em 5 minutos resultou em maior motilidade pós descongelamento quando comparado com a curva sugerida por Holt et al., 1994 para sêmen epididimário (MORREL, 1997).

Neste estudo, não houve diferença na motilidade após o descongelamento entre a criopreservação em vapor de nitrogênio líquido e em gelo seco, porém houve diferença significativa entre machos. Após inseminação artificial, 3 fêmeas de um total de 6 foram fertilizadas, o que resultou no nascimento de 4 filhotes provenientes de 2 fêmeas e na reabsorção de gêmeos da terceira fêmea (MORREL, 1997).

### **3.6 Avaliação do sêmen**

A avaliação espermática é de extrema importância, uma vez que a qualidade do espermatozóide é essencial para a ocorrência da fertilização, seja ela natural ou artificial.

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), esta avaliação pode ser dividida em características físicas, que compreendem volume, aspecto, movimento de massa, motilidade, vigor e concentração, e morfológicas, com a diferenciação de espermatozoides normais e anormais.

De acordo com Blom (1973), os espermatozoides anormais podem ser classificados em defeitos maiores e menores.

Podem-se incluir as seguintes avaliações: pH seminal, integridade do acrossoma (percentual de espermatozóides com acrossoma íntegro) e vitalidade espermática (percentual de espermatozóides vivos); e a motilidade pode ser classificada em espermatozóides móveis e espermatozóides com motilidade progressiva rápida e retilínea (HAFEZ, 1995; WHO, 1999; JANINI, PEREIRA, 2001).

A avaliação da integridade da membrana plasmática fornece importante informação com relação à permeabilidade da membrana e consequente viabilidade da célula (GRAHAM, 2001). Membranas plasmáticas íntegras impedem a entrada de moléculas grandes como corantes na célula, e, por este motivo, diversas técnicas podem ser utilizadas para esta avaliação (GRAHAM, 2001).

Nestas técnicas, espermatozóides com membrana plasmática íntegra, não são corados e são considerados vivos, e espermatozóides corados, portanto com membrana danificada são considerados mortos (GRAHAM, 2001; BJÖRNDAHL; SÖDERLUND; KVIST, 2003).

A viabilidade do espermatozóide de diversas espécies pode ser avaliada com a utilização de muitas técnicas de coloração espermática. Algumas têm sido largamente utilizadas, como a coloração com eosina Y (KUEDERLING et al., 2000; VALLE et al., 2004), trypan-blue (DIDION et al., 1989; KOVÁCS; FOOTE, 1992) e eosina 1% e nigrosina 10%, ambas em solução aquosa (HAFEZ, 1995; WHO, 1999; JANINI, PEREIRA, 2001; BJÖRNDAHL; SÖDERLUND; KVIST, 2003).

Para a avaliação da integridade do acrossoma existem diversas técnicas de coloração não fluorescente e fluorescente. A coloração simples para acrossoma de espermatozóide de felinos descrita por Pope, Zhang e Dresser (1991), e uma técnica de coloração pelo kit comercial SPERMAC<sup>®</sup> (Stain Enterprises, África do Sul), uma coloração modificada da coloração Papanicolau (BARAN et al., 2004; CHAN et al.,

1996; OETTLE, 1986) são exemplos de colorações não fluorescentes para avaliação da integridade acrossomal. A coloração dupla por trypan-blue e giemsa pode ser utilizada para avaliação da vitalidade e integridade acrossomal em algumas espécies animais (DIDION et al., 1989; KOVÁCS; FOOTE, 1992), porém o corante giemsa não apresenta resultados satisfatórios para integridade acrossomal de espermatozóides humanos (CROSS; MEIZEL, 1989).

As colorações com sondas fluorescentes têm sido utilizadas para visualização da integridade acrossomal de espermatozóide do homem e de diversas espécies animais, inclusive primatas não humanos (CROSS et al., 1986; CROSS et al., 1989; CROSS; MEIZEL, 1989; ROTH et al., 1998), porém só foi relatada para *Callithrix jacchus* por Pudritz (2000), com algumas modificações.

As lectinas se ligam aos glicoconjugados presentes na membrana acrossomal externa ou na matriz acrossomal (CROSS et al., 1986) e têm sido comumente utilizadas neste tipo de avaliação.

A FITC (*Fluorescein isothiocyanite*) -PNA (*Peannut Agglutinin*) conjugada é uma lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*) utilizada para visualização da integridade acrossomal em espermatozóides humanos (MORTIMER; CURTIS; MILLER, 1987).

A FITC (*Fluorescein isothiocyanite*) -PSA (*Pisum sativum agglutinin*) conjugada pode ser utilizada para visualização da integridade acrossomal de espermatozóides humanos (CROSS et al., 1986), de primatas não humanos como macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (CROSS et al., 1989) e saguis de tufo brancos (*Callithrix jacchus*) (PUDRITZ, 2000).

Nestas duas colorações os espermatozóides com acrossoma íntegro apresentam fluorescência verde intensa.

A motilidade do espermatozóide é uma das principais características analisadas para a avaliação da qualidade espermática, porém alguns autores sugerem que não há correlação altamente significativa entre o percentual de espermatozoides móveis e a fertilidade (GRAHAM; SCHMEHL; NELSON, 1980; GRAHAM, 2001), embora com o advento de sistemas computadorizados para análise seminal a acurácia na aferição deste parâmetro tenha melhorado significativamente (GRAHAM, 2001).

A motilidade está diretamente relacionada à atividade mitocondrial (Amann, 1989). O movimento flagelar da cauda do espermatozóide é um dos principais fatores responsáveis pela sua motilidade e este fenômeno consome altas quantidades da energia gerada principalmente pela desfosforilação da adenosina trifosfato (ATP) (SALYSBURY; LODGE; VAN DEMARK, 1978) proporcionada pelas mitocôndrias (O'CONNELL; MCCLURE; LEWIS, 2002). Portanto, a redução do potencial da membrana mitocondrial com conseqüente diminuição da produção energética pode levar à perda da motilidade.

A análise da atividade citoquímica mitocondrial avalia a respiração celular e o metabolismo energético da célula por meio da citocromo c oxidase (HRUDKA, 1987).

A citocromo c oxidase é uma enzima altamente correlacionada com o citocromo c, que é um produto da cadeia respiratória (HRUDKA, 1987). A oxidação da 3,3'diaminobenzidina (DAB) pelo complexo citocromo c, incluindo a citocromo c oxidase, é uma reação em cadeia que resulta na polimerização do reagente comconsequente deposição nos locais da reação (membrana mitocondrial interna) (HRUDKA, 1987). Esta deposição pode ser identificada pela visualização de uma cor castanha na região da peça intermediária do espermatozóide.

Hrudka (1987) sugere uma classificação com quatro categorias:

- Classe I: quase todas as mitocôndrias estão ativas, ou seja, apresentam-se com coloração castanha dando à bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente.
- Classe II: a bainha mitocondrial aparece fragmentada, com segmentos ativos (corados) e inativos (não corados), porém com predominância de segmentos corados.
- Classe III: apresentam menos da metade da bainha mitocondrial ativa e corada com poucos segmentos corados e dispersos.
- Classe IV: apresentam bainha mitocondrial completamente inativa, totalmente não corada.

A taxa de fragmentação de DNA dos espermatozóides é um dos fatores determinantes nas taxas de fertilidade, onde espermatozóides com taxas mais altas de fragmentação de DNA resultam em taxas mais baixas de fertilidade (DURAN et al., 2002; BENCHAIB et al., 2003; LARSSON-COOK et al., 2003).

Existem diversos testes para detecção da taxa de fragmentação do DNA em espermatozóides (DURAN; MORSHELDI; TAYLOR, 2002; BENCHAIB et al., 2003; LARSSON-COOK et al., 2003). O ensaio Cometa alcalino é o teste mais sensível para avaliar estágios iniciais de fragmentação de DNA, pois é uma técnica que consiste na realização da eletroforese de célula única em gel de agarose para avaliação da fragmentação em fita total do DNA dos espermatozóides, onde fragmentos menores ou mais freqüentes são deslocados distâncias maiores nos géis (SINGH et al., 1988; DONNELLY et al., 2000).

Nesta técnica as células apresentam morfologia semelhante à de um cometa. A cabeça representa o arcabouço de DNA intacto e a cauda representa os



fragmentos originados pela quebra da fita de DNA que migraram durante a eletroforese (KLAUDE et al., 1996; DONNELLY et al., 2000).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos o material e a metodologia utilizados nos experimentos.

### 4.1 Animais

A colônia de *Callithrix jacchus* (Figura 1) do Centro de Primatas da Alemanha – DPZ (Deutsches Primatenzentrum – DPZ) (Figura 2), que consiste exclusivamente de animais nascidos em cativeiro na Europa há várias gerações, está localizada na periferia da cidade de Goettingen, Alemanha e é, atualmente, a maior colônia de *Callithrix jacchus* da Europa, com cerca de 500 indivíduos.

Neste estudo foram utilizados 08 primatas neotropicais da espécie *Callithrix jacchus*, machos adultos, escolhidos aleatoriamente e retirados do grupo de reprodução. Destes, 6 animais nascidos na colônia do DPZ (Figura 3), 1 animal havia sido transferido da colônia da Universidade de Cambridge, Londres, Inglaterra e 1 animal do Zoológico de Bochum, Bochum, Alemanha, mantidos no DPZ. Isto indica que os resultados podem ser considerados como representativos da colônia. Os animais transferidos tiveram período de adaptação às novas condições por um período não inferior a 1 ano.



Figura 1 - *Callithrix jacchus* do Centro Nacional de Primatas – CENP, Ananindeua, Brasil



Figura 2 - Sede do *Deutsches Primatenzentrum* - DPZ, Göttingen, Alemanha



Figura 3 - Colônia de *Callithrix jacchus* do Deutsches Primatenzentrum – DPZ, Göttingen, Alemanha

Os animais estavam mantidos em galpões de alvenaria sob condições controladas de luz, com sistema 12 horas claro e 12 horas escuro, umidade ( $55 \pm 10\%$ ) e temperatura ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Receberam alimentação variada baseada em frutas e vegetais frescos e cozidos, ração seca peletizada para primatas e suplementação vitamínica.

O peso dos animais utilizados variou entre 311 gramas e 500 gramas.

Anteriormente ao início dos estudos, por período não inferior a 3 meses, cada animal foi pareado com uma fêmea ovariectomizada e mantido em gaiola de aço inoxidável até o final dos experimentos.

O Centro Nacional de Primatas – CENP (Figura 4), órgão da Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS, do Ministério da Saúde – MS está localizado em uma área de aproximadamente 25 hectares, composta por vegetação típica da floresta amazônica, no município de Ananindeua, Estado do Pará, Brasil, latitude  $-1^\circ38'26''$  e longitude  $-48^\circ38'22''$ . Os prédios e instalações (Figura 5) foram construídos nesta área para atender todas as necessidades exigidas na criação e manutenção de primatas neotropicais em cativeiro. Os animais da espécie *Callithrix jacchus* são de origem variada.

A colônia do CENP era pequena e, dos 5 animais utilizados, 3 animais nasceram no CENP e 2 animais tiveram origem desconhecida com um animal sem registro de origem ou data de entrada no CENP e outro originado de outra colônia no Brasil, mas também sem registro de origem anterior ou data de nascimento. Como todos os animais eram os principais reprodutores da colônia no momento do estudo, podem ser considerados representativos da colônia do CENP.



Figura 4 - Sede do Centro Nacional de Primatas - CENP, Ananindeua, Brasil



Figura 5 – Laboratórios e galpões de reprodução do Centro Nacional de Primatas - CENP, Ananindeua, Brasil

Os machos utilizados nos experimentos de colheita de sêmen apresentaram peso entre 225 gramas e 375 gramas.

Os animais estavam alojados em gaiolas de aço inoxidável que ficavam dentro de galpões de alvenaria. Todos os animais tiveram acesso à luz e ar naturais. Receberam alimentação baseada em ração seca peletizada para cães (28% de proteínas) e água filtrada *ad libitum*, vários tipos de frutas e vegetais frescos, e receberam vitaminas e leite em pó diluídos em água filtrada em dias alternados.

#### **4.2 Colheita de Sêmen**

A colheita era realizada pela técnica de vibroestimulação peniana, com o vibrador peniano pessoal para uso humano Ferti Care<sup>®</sup> (Multicept ApS, Rungsted, Denmark) com frequência que variou de 70 a 110 Hz, e amplitude de 1 a 3.5 mm.

O aparelho de vibroestimulação foi adaptado de forma que funcionasse como uma vagina artificial (KUEDERLING et al., 2000). Neste estudo foi utilizado um tubo de vidro cilíndrico, com bordas arredondadas e tamanho 32mm de comprimento, 7 mm de diâmetro e paredes com 1 mm de espessura (Figura 6).

A técnica foi modificada e otimizada a partir do protocolo padronizado para utilização no DPZ descrito por Kuederling et al. (2000). Este método foi escolhido por não ser invasivo, não causar dor e não necessitar de anestesia ou sedação dos animais.

O animal era contido fisicamente por um assistente para a realização do procedimento que é descrito a seguir:

- ① Inicialmente era realizada a limpeza de toda a região genital e, quando possível sua exposição, do pênis com água bidestilada com o intuito de reduzir a contaminação da amostra por bactérias.
- ② O animal era posicionado em uma mesa para colheita, de maneira que a região genital ficasse exposta abaixo e a cabeça acima da mesa. Isto impedia que o animal enxergasse o que ocorria sob a mesa. As pernas do animal eram posicionadas dobradas, como durante a cópula natural (Figura 7).
- ③ Sobre a mesa eram colocados alimentos atrativos como frutas e insetos para entretenimento e recompensa do animal.
- ④ O tubo de vidro era gentilmente aproximado do pênis de forma que o mesmo ficasse dentro do tubo. O pênis era mantido dentro do tubo durante a fase de estimulação (Figura 8).
- ⑤ O protocolo de estimulação é demonstrado no quadro 1. Os ciclos eram realizados até que ocorresse a ejaculação, ou até um tempo máximo de 15 minutos de estimulação, quando o procedimento era interrompido.
- ⑥ Foi respeitado um intervalo mínimo de 7 dias entre as colheitas de um mesmo animal. O número total de colheitas foi determinado de acordo com os resultados do experimento. Caso não houvesse ejaculação, o procedimento era repetido após o intervalo estipulado.



Figura 6 - Aparelho para vibroestimulação peniana adaptado para colheita de sêmen de *Callithrix jacchus*. A seta indica o tubo de vidro utilizado para a colheita de sêmen.



Figura 7 – Realização de colheita de sêmen em *Callithrix jacchus* por vibro estimulação peniana



Figura 8 – Pênis de *Callithrix jacchus* dentro do tubo de vidro para colheita de sêmen



<b>ESTIMULAÇÃO</b>	<b>DURAÇÃO (Segundos)</b>	<b>FREQUÊNCIA (Hz)</b>	<b>AMPLITUDE (mm)</b>
Estímulo	60	70 Hz	1,0
Estímulo	60	80 Hz	1,0
Pausa	30	-----	-----
Estímulo	60	80 Hz	1,0
Estímulo	60	80 Hz	1,0
Pausa	30	-----	-----
Estímulo	60	80 Hz	1,0
Estímulo	60	70 Hz	1,5
Pausa	30	-----	-----
Estímulo	60	70 Hz	1,5
Estímulo	60	80 Hz	1,5
Pausa	30	-----	-----
Estímulo	60	80 Hz	1,5
Estímulo	60	90 Hz	1,0
Pausa	30	-----	-----
Estímulo	60	90 Hz	1,0
Estímulo	60	90 Hz	1,5

Quadro 1. Protocolo para colheita de sêmen em *Callithrix jacchus* por vibro estimulação peniana.

### 4.3 Processamento e avaliação do Sêmen no local de colheita

Todos os dados referentes ao ejaculado foram registrados em fichas específicas individuais (Apêndice A), onde constavam dados de identificação do animal, data e método de colheita de sêmen, características seminais de cada ejaculado, processamento realizado e resultados de todas as análises realizadas com o ejaculado até seu uso final.

Após a ejaculação, adicionava-se imediatamente um volume fixo (200  $\mu$ L) de meio diluidor TALP-HEPES (Apêndice B) ou TEST-GEMA (Apêndice C), no mesmo tubo de colheita, devido ao pequeno volume da fração líquida do ejaculado e para aumentar o número de espermatozóides nesta fração. Os tubos eram mantidos em banho Maria à 37°C para evitar a ocorrência de choque térmico.

As amostras eram imediatamente avaliadas em microscopia de contraste de fase em campo escuro para determinação do percentual de espermatozóides móveis e espermatozóides móveis com movimentos retilíneos progressivos. Para esta análise foram avaliados 100 ou 200 espermatozóides por ejaculado, de acordo com a concentração encontrada.

Em seguida eram preparados 2 esfregaços em lâminas de vidro para microscopia com espermatozóides corados por Eosina/Nigrosina para determinação do percentual de espermatozóides vivos e mortos, 2 esfregaços em lâminas de vidro para microscopia com espermatozóides corados por coloração simples para acrossoma para determinação do percentual de espermatozóides com acrossoma íntegro e não íntegro ou danificado e 2 lâminas de vidro para microscopia com

esfregaço seminal para posterior coloração dos espermatozóides para avaliação da morfologia.

Os protocolos de coloração estão descritos no item “**4.5 Protocolos de coloração espermática**”.

O sêmen era transportado para o laboratório no tubo de colheita vedado com filme para laboratório do tipo Parafilm, dentro de um tubo tipo Eppendorf com capacidade para 2 mL tampado. O tubo tipo Eppendorf ficava preso a um suporte flutuante dentro de uma vasilha com água a 37°C, fechada que era transportada dentro de uma bolsa térmica para manutenção da temperatura até o material chegar ao laboratório. O tempo entre a colheita do sêmen e a chegada ao laboratório era de 30 - 60 minutos.

#### **4.4 Processamento e avaliação do Sêmen no laboratório**

O sêmen foi processado de maneira diferente para os experimentos realizados no DPZ e no CENP.

##### ***DPZ***

Imediatamente após a chegada do sêmen diluído com TALP-HEPES ao laboratório de andrologia, o sêmen era novamente avaliado para as mesmas variáveis e com a mesma metodologia descrita para o local de colheita.

Adicionalmente, 5 µL de sêmen com meio diluidor era retirado de cada amostra e colocado em um tubo tipo Eppendorf 2 mL com 45 µL de solução de formol a 10% em solução fisiológica (diluição de 1:10) para contagem dos

espermatozóides em câmara de “Neubauer improved” e cálculo da concentração.

O volume da amostra era medido com pipeta tipo aspiração positiva e o volume era completado com meio diluidor para totalizar 400 µL.

As amostras de sêmen eram processadas segundo Nayudu (2005), com centrifugação em diferentes concentrações (40% e 80%) de gradiente de sílica Pure Sperm™ (NidaCon, Suécia), produto comercial utilizado em sêmen humano, diluído em meio TALP-HEPES com protocolo adaptado para o sagui-de-tufo-branco (Informação verbal)<sup>1</sup>. Este procedimento é realizado no intuito de remover o coágulo, plasma seminal, espermatozóides mortos, bactérias e vírus.

Para este procedimento, um tubo tipo Eppendorf 1,5 mL era preparado com 200 µL de gradiente 40% na camada superior e 200 µL 80% na camada inferior. Por último, eram adicionados 200 µL de sêmen diluído em TALP-HEPES (Figura 9) .

A centrifugação era realizada em centrífuga refrigerada modelo Universal 32 R® (Andréas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemanha) com controle de aceleração e desaceleração. O procedimento era realizado em temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos a 1500 rpm (500g), com o programa de aceleração número 1, mais lento, e programa de desaceleração número 8, mais rápido, para formação do pellet (Figura 10).

Imediatamente após o término da centrifugação, retirava-se cuidadosamente o sobrenadante com os dois gradientes de sílica de forma que não ocorresse mistura com o pellet. O pellet era retirado com auxílio de uma pipeta tipo aspiração positiva e ponteira estéril e media-se o volume da amostra, que era transferida para um tubo tipo Eppendorf 1,5 mL estéril.

Era adicionado ao pellet o mesmo volume de diluidor TEST-GEMA (diluição

---

<sup>1</sup> Informação fornecida por Doutora Penelope Nayudu em Göttingen, Alemanha em 2005.



Figura 9 – Tubo Eppendorf preparado com amostra de sêmen (1), gradiente 40% (2) e gradiente 80% (3) para centrifugação



Figura 10 – Pellet de espermatozoides após a centrifugação (seta)

1:2). A concentração era calculada novamente da mesma maneira que descrito anteriormente.

### **CENP**

Após a chegada do sêmen com diluidor TALP-HEPES no laboratório, era realizado o cálculo da concentração como descrito anteriormente. As amostras foram utilizadas nos experimentos para validação da técnica de coloração com eosina-nigrosina para comparação entre os diluidores TALP-HEPES e TEST-GEMA.

O sêmen com diluidor TEST-GEMA foi processado para cálculo da concentração e utilizado nos experimentos de congelação e para comparação dos diluidores TALP-HEPES e TEST-GEMA.

## **4.5 Capacitação espermática**

A capacitação espermática foi realizada segundo protocolo utilizado no DPZ para a realização de fertilização *in vitro*.

Basicamente, segue descrição do protocolo:

Antes da colheita de sêmen eram colocados 100µL de meio TALP sem Cálcio (Apêndice B) em um tubo de vidro que era colocado em estufa a 37°C, 5,5% CO<sub>2</sub> para incubar por 1 hora e estabilizar o pH. O sêmen era colhido e processado conforme descrito anteriormente.

Após a centrifugação, o pellet de espermatozóides era transferido para o fundo do tubo com meio TALP, lentamente, sem misturar e com o tubo inclinado a 45°. O tubo com o pellet e o meio TALP era colocado em um frasco tipo Becker de

forma que permanecesse na posição inclinada em 45°. Uma tampa era colocada no tubo de maneira que permitisse a troca gasosa e o tubo era mantido na estufa por 90 minutos sob as mesmas condições descritas acima.

#### **4.6 Indução da reação acrossômica**

Após a capacitação, o sêmen era avaliado e tratado para que ocorresse a reação acrossômica. O tratamento utilizado foi padronizado para utilização no DPZ.

Segue breve descrição do protocolo de indução da reação acrossômica com Cálcio ionophor A23187 (Sigma, Alemanha).

A solução estoque de Cálcio foi preparada da seguinte maneira:

Após a diluição do Cálcio ionophor A23187 em DMSO até uma concentração final de 2 mM, adicionou-se 2 µL desta solução à 78 µL de meio TALP com Cálcio na concentração 2mM para uma concentração final de 50µM.

Para a indução da reação acrossômica era adicionado 5 µL da solução estoque de Cálcio ionophor A23187 à 45 µL do sêmen com TALP sem cálcio após a capacitação. O sêmen era mantido nas mesmas condições da capacitação por 10 minutos.

## 4.7 Protocolos de coloração espermática

A seguir estão descritos os protocolos de coloração utilizados nos experimentos realizados.

### 4.7.1 Coloração para avaliação da viabilidade da membrana plasmática- Eosina-nigrosina

Para esta coloração em sêmen de *Callithrix jacchus*, utilizou-se a coloração convencional por eosina-nigrosina com protocolo padronizado no DPZ e descrito abaixo.

Eram colocados 5 µL da amostra (sêmen + diluidor) em um tubo tipo Eppendorf estéril, adicionava-se 5 µL de eosina 1%, que era misturada gentilmente por meio de 2 ou 3 aspirações subsequentes com o auxílio de uma micropipeta. Após incubação por 30 segundos, adicionava-se 5 µL de nigrosina 1% e realizava-se nova mistura. Imediatamente após a adição de nigrosina, eram colocados 5µL da amostra corada em uma lâmina de vidro para microscopia e realizado o esfregaço.

As lâminas foram secas em temperatura ambiente (25°C) e analisadas no mesmo dia. Para preparação de uma amostra permanente, após deixar secar, era colocada uma gota de meio para montagem Eukitt® (Fluka, Steinheim, Alemanha) e uma lamínula de vidro era sobreposta. Após secagem a lâmina era analisada.



Com isto, a lâmina podia ser avaliada posteriormente. Foram contados 200 espermatozóides por amostra em microscopia de luz e aumento de 400 vezes, no intuito de diferenciar espermatozóides não corados com membrana plasmática íntegra (vivos) e espermatozóides com coloração rósea com membrana plasmática danificada (mortos).

#### 4.7.2 Coloração simples para avaliação da integridade do acrossomo

Para esta coloração utilizou-se a coloração descrita por Pope et al. (1991) para coloração acrossomal de espermatozóides de gatos. Segue descrição sucinta do protocolo utilizado.

Eram colocados 5  $\mu$ L da amostra (sêmen + diluidor) em um tubo tipo Eppendorf estéril envolvido com papel laminado de alumínio, adicionado 5  $\mu$ L do corante e incubado no escuro por 90 – 120 segundos a 37°C ou em temperatura ambiente controlada e mantida a 25°C.

Após este tempo, eram colocados 5 $\mu$ L da amostra corada em uma lâmina de vidro para microscopia e realizado o esfregaço. Após secagem, era colocada uma gota de meio para montagem Eukitt<sup>®</sup> e sobreposta por uma lamínula de vidro. A secagem era feita em temperatura ambiente e a lâmina analisada em microscopia de luz, aumento de 1000 vezes sob imersão com auxílio de uma gota de óleo para microscopia.

Espermatozóides com acrossoma íntegro são caracterizados por uma coloração mais escura na região acrossomal, e em espermatozóides com

acrossoma não íntegros ou danificados a coloração desta região não é diferenciada do restante da célula. Foram analisados 200 espermatozóides por amostra.

#### 4.7.3 Coloração dupla Trypan-Blue e Giemsa para avaliação da integridade acrossomal

A coloração dupla trypan-blue e giemsa foi realizada segundo protocolo descrito por Kovács e Foote (1992). Segue descrição sucinta do protocolo.

Volumes iguais de sêmen e do corante trypan-blue (5 $\mu$ L de cada) eram misturados em um tubo tipo Eppendorf com capacidade para 0,5 mL em temperatura ambiente. Imediatamente após a mistura, 5  $\mu$ L do sêmen com corante eram colocados em uma lâmina de vidro para microscopia e era preparado o esfregaço. As lâminas foram preparadas em duplicata.

Após secagem dos esfregaços com as lâminas em posição vertical sobre papel absorvente em temperatura ambiente, o material era fixado em solução de formaldeído com corante vermelho neutro por 2-5 minutos. As lâminas eram lavadas em água destilada e recobertas com giemsa 2,5% mantidas a 40°C por 12 horas.

As lâminas eram lavadas em água destilada corrente e mergulhadas em água destilada por 2 minutos e lavadas novamente com água destilada. Após deixar secar, era colocada uma gota de meio para montagem Eukitt® e uma lamínula de vidro era sobreposta. Após secagem a lâmina era analisada em microscopia de luz em aumento de 1000 vezes sob imersão em óleo para microscopia. Foram analisados 200 espermatozóides por amostra.

#### 4.7.4 Coloração por fluorescência para avaliação da integridade do acrossomo - FITC-PSA

Para a coloração com FITC-PSA foi utilizada a coloração descrita por Pudritz (2000) para coloração acrossomal de espermatozoides de *Callithrix jacchus*. Segue descrição sucinta do protocolo utilizado.

Eram realizados esfregaços de uma gota das amostras de sêmen com TALP-HEPES em lâminas de vidro para microscopia. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas eram colocadas na posição vertical em um suporte e mergulhadas em uma cuba de vidro com metanol, onde eram mantidas por 20 minutos. Após este período, as lâminas eram colocadas nesta mesma posição em outra cuba com água limpa. Eram feitas a introdução e retirada das lâminas nesta cuba por 3 vezes subseqüentes.

O suporte com as lâminas era transferido para uma nova cuba com água limpa para realização da lavagem em água corrente sem contato direto do jato de água com as lâminas, apenas com a renovação da água na cuba, por 10 minutos.

As lâminas eram retiradas da cuba e apoiadas sobre papel absorvente para retirada do excesso de água por aproximadamente 1 minuto, a seguir eram colocadas na posição horizontal em uma caixa acrílica vedada para impedir a entrada de luz. Colocava-se 300 µL do corante FITC-PSA sobre os esfregaços, em ambiente escuro. Após incubação por 30 minutos, era colocado meio de montagem Citifluor<sup>®</sup> AF2 (Plano, Cappel) específico para coloração por fluorescência e as lâminas eram sobrepostas com uma lamínula.

A análise de 200 espermatozóides era feita em microscópio AXIOPHOT (ZEISS) com módulo de epifluorescência com filtro UV Número 9 (filtro de excitação 450-490nm e barreira de 520nm), em aumento de 630 vezes sob imersão em óleo para microscopia. Espermatozóides com acrossoma não íntegro não foram corados e com acrossoma íntegro apresentaram fluorescência verde.

#### 4.7.5 Coloração para avaliação da morfologia espermática - SpermOscan<sup>®</sup>

Foi utilizada a coloração com kit comercial SpermOscan<sup>®</sup> (NidaCon, Suécia). Este kit é utilizado em sêmen humano e tem como base o corante Giemsa.

O protocolo consiste da preparação de um esfregaço da amostra de sêmen com diluidor em lâmina de vidro para microscopia e, após secagem em temperatura ambiente, deve-se mergulhar a lâmina por 5 segundos 10 vezes consecutivas no corante 1, retirar o excesso com papel absorvente sem haver contato direto do papel com os espermatozóides e repetir o procedimento com os corantes 2 e 3.

Deixar secar em temperatura ambiente e montar com meio Eukitt<sup>®</sup> e lamínula como descrito para as outras colorações, deixar secar e analisar em microscopia de luz e aumento de 400 vezes. Foram contados 200 espermatozóides com diferenciação daqueles com morfologia normal dos que apresentaram anormalidades, com caracterização do tipo morfológico encontrado.

Os espermatozóides foram classificados em três diferentes categorias, espermatozóides normais, espermatozóides com defeitos maiores e espermatozóides com defeitos menores, como proposto por Blom (1973).

#### 4.7.6 Coloração para avaliação da integridade do acrossomo e morfologia espermática -Spermac<sup>®</sup>

Foi utilizada a coloração com kit comercial Spermac<sup>®</sup> (Stain Enterprises Inc., África do Sul). Este kit é utilizado em sêmen humano, canino e felino (OETTLE, 1986; CHAN et al., 1996; BARAN et al., 2004).

O protocolo consiste na preparação de um esfregaço da amostra de sêmen com diluidor em lâmina de vidro para microscopia e, após secagem em temperatura ambiente por 5 minutos, deve-se mergulhar a lâmina na solução fixadora por 10 minutos, retirar o excesso com papel absorvente sem haver contato direto do papel com os espermatozóides, mergulhar em água limpa e retirar em seguida por 3 vezes consecutivas, retirar o excesso como descrito acima e mergulhar no corante 1 por 90 segundos.

Repetir o procedimento para retirada do excesso e a lavagem em água limpa após o procedimento com cada solução. Deixar por 1 minuto no corante 2 e 60-80 segundos no corante 3.

Deixar secar em temperatura ambiente e analisar em microscopia de luz e aumento de 1000 vezes sob imersão em óleo para microscopia.

Foram avaliados 200 espermatozóides por amostra com diferenciação daqueles com morfologia normal com os que apresentaram anormalidades, com caracterização do tipo morfológico encontrado e classificação como descrito no item anterior.

Os espermatozóides com acrossoma íntegro apresentam-se corados com a região acrossomal em verde escuro e pós acrossomal em vermelho, e

espermatozóides com acrossoma não íntegro ou danificado corados com a região acrossomal em verde claro ou levemente avermelhada e a região pós acrossomal em vermelho.

#### 4.7.7 Coloração para avaliação da atividade citoquímica mitocondrial - DAB

A atividade mitocondrial foi determinada pelo método descrito por Hrudka, (1987).

Para a realização deste método, uma alíquota de 10 $\mu$ L de sêmen descongelado era transferido para um tubo tipo Eppendorf de coloração âmbar envolvido em papel laminado e tampado, juntamente com o mesmo volume (diluição de 1:2) de uma solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em PBS na concentração de 1mg de DAB para 1 mL de PBS.

A solução com DAB era mantida em banho-maria a 37°C com ausência ou diminuição de luz até o momento da mistura com o sêmen, mesmas condições em que a mistura era mantida por 1 hora.

Após a incubação por 1 hora, eram realizados 2 esfregaços por amostra, que depois de secos em temperatura ambiente, foram fixados em formaldeído 10% por 10 minutos.

Todos os procedimentos e o armazenamento das lâminas até o momento da análise foram realizados em ambiente com diminuição de luz.

Para a avaliação da atividade mitocondrial, utilizou-se microscópio Olympus BX51 em microscopia de luz com campo claro em aumento de 1000 vezes sob

imersão em óleo para microscopia. Foram classificados 200 espermatozóides por amostra segundo a classificação proposta por Hrudka (1987) que está descrita a seguir:

- Classe I: quase todas as mitocôndrias estão ativas, ou seja, apresentam-se com coloração castanha dando à bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente.
- Classe II: a bainha mitocondrial aparece fragmentada, com segmentos ativos (corados) e inativos (não corados), porém com predominância de segmentos corados.
- Classe III: apresentam menos da metade da bainha mitocondrial ativa e corada com poucos segmentos corados e dispersos.
- Classe IV: apresentam bainha mitocondrial completamente inativa, totalmente não corada.

Para controle negativo, uma alíquota foi previamente inativada a 70°C por 5 minutos. Após a incubação foram feitos esfregaços das amostras, e os esfregaços foram fixados em formaldeído 10% por 10 minutos.

#### 4.7.8 Coloração para avaliação da taxa de fragmentação de DNA - Ensaio Cometa alcalino

Para determinar a taxa de fragmentação de DNA foi utilizado o ensaio Cometa alcalino em amostras seminais descongeladas segundo Donnelly et al. (2000) com algumas modificações (BERTOLLA, 2006) como descrito a seguir.

Lâminas de vidro para microscopia foram pré-tratadas com 1mL de agarose de ponto de fusão normal (NMPA) (GE Healthcare, Amersham Place, Inglaterra) 1% (p:v) em TBE (8,9mM Tris base, 8,9mM borato e 2mM Na<sub>2</sub>-EDTA) (GE Healthcare, Amersham Place, Inglaterra) no dia anterior ao estudo.

O sêmen descongelado foi diluído em agarose de ponto de fusão baixo (LMPA) (GE Healthcare, Amersham Place, Inglaterra) 0,75% (p:v) em TBE para ajuste de concentração para  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e 100 $\mu$ L desta diluição foram adicionados a uma lâmina pré-tratada e sobreposta com uma lamínula de vidro de 24x50mm e deixadas em geladeira a 4°C por 10 minutos para solidificação do gel. Em seguida, as lamínulas foram removidas e foram adicionados 300 $\mu$ L de LMPA 0,75% em TBE. As lâminas foram novamente cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por mais 10 minutos. As lamínulas foram em seguida retiradas e as lâminas foram mantidas imersas em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 10mM Tris, pH=11,0, 2% Triton X-100, 4mM DTT) a 4°C por no mínimo 2 horas.

Após a lise, as lâminas foram lavadas por 2 vezes com água Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA) por 5 minutos para remover o excesso de sais, e colocadas em uma cuba de eletroforese (Hoeffer 33, GE Healthcare, Amersham Place, Inglaterra), recobertas com uma solução alcalina para separação das fitas de DNA (300mM NaOH, 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH>13,0, T=4°C) por 20 minutos.

Ao final deste período foi realizada a eletroforese nesta mesma solução alcalina em uma tensão de 1,5V/cm entre os eletrodos e uma intensidade de corrente menor que 270mA por 20 minutos.

Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas 2 vezes por 5 minutos com TBE e 1 vez por 5 minutos com água Milli-Q, e fixadas 3 vezes por 2 minutos cada com etanol (1x70%, 1x90% e 1x100%).



Em seguida, as lâminas foram coradas com uma solução de 20 $\mu$ g de brometo de etídeo (Invitrogen, Carlsbad, EUA) por mL de TBE durante 15 minutos e lavadas com TBE (3 vezes de 5 minutos) para remover coloração inespecífica.

A avaliação foi realizada em um microscópio óptico Olympus BX51 equipado com módulo de epifluorescência, e um filtro de excitação de 490nm e barreira de 590nm. As imagens foram registradas com câmara Olympus DP71 com resolução de 12,6 megapixels e ccd refrigerado.

Foram avaliados 200 espermatozóides por amostra com aumento de 400x, e classificadas em Classe I (sem fragmentação de DNA), II (pouca fragmentação de DNA), III (fragmentação moderada de DNA) ou IV (DNA altamente fragmentado).

#### **4.8 Protocolos de congelação**

Foram realizados 3 protocolos de congelação. A preparação das palhetas foi comum aos 3 protocolos.

Foram utilizadas palhetas do tipo francesa com capacidade para 0,25 mL (250 $\mu$ L). As palhetas foram cortadas para atingir uma capacidade final de 100 $\mu$ L e marcadas (Figura 11) para facilitar o preenchimento com o volume desejado da amostra. Após identificação das palhetas, estas eram preenchidas até a primeira marca com diluidor, depois novamente até a mesma marca com ar e, em seguida, até a segunda marca com a amostra (100  $\mu$ L). O restante era preenchido com ar e as palhetas eram vedadas com esferas plásticas.



Figura 11 – Palheta cortada e marcada para criopreservação de sêmen

Segue a descrição dos protocolos de congelação.

#### 4.8.1 Centro de Primatas da Alemanha - DPZ

No DPZ foi realizado o protocolo 1. Para a realização deste protocolo, 50  $\mu\text{L}$  de diluidor sem glicerol foram lentamente adicionados ao *pellet* de espermatozóides.

Foi realizado o cálculo da concentração espermática para definição do volume de diluidor que seria adicionado. Quando possível, foi utilizada concentração fixa de  $50 \times 10^6$  espermatozóides/mL por palheta. Caso o número de espermatozóides não fosse suficiente para esta concentração, foi preparada apenas uma palheta.

##### 4.8.1.1 Congelação com fase de equilíbrio (Protocolo 1)

Neste protocolo, depois de adicionado lentamente o volume necessário de diluidor sem glicerol, era adicionado o volume de diluidor com glicerol 8% necessário

para atingir uma concentração final 4% de glicerol com a concentração espermática pré-definida. A adição do diluidor com glicerol foi realizada lentamente, 10  $\mu$ L a cada 30 segundos.

O sêmen era avaliado e envazado nas palhetas, que eram transferidas para uma caixa acrílica com 150 mL de água a 25°C. As palhetas ficavam em um suporte na posição horizontal (Figura 12). Esta caixa era fechada com tampa de acrílico e levada ao refrigerador por 2 horas.

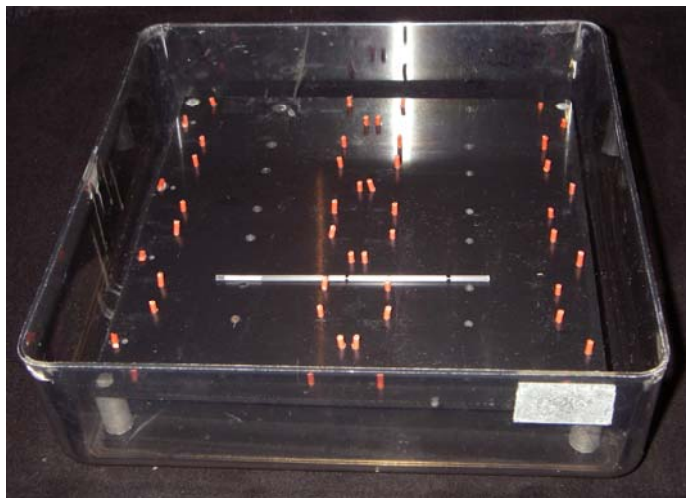


Figura 12 – Suporte com palheta para a fase de equilíbrio

Este procedimento foi definido para que após este período de equilíbrio a temperatura dentro da palheta atingisse 4°C. Isto permitia uma curva de resfriamento de 0,25°C em média por minuto. Após o tempo de equilíbrio, as palhetas eram transferidas para o vapor de nitrogênio em um balde térmico sobre um suporte de metal por 10 minutos e finalmente para o nitrogênio líquido.

O balde térmico (Figura 13a) foi equipado com uma armação de ferro (Figura 13b) para que permitisse que a palheta ficasse no vapor de nitrogênio, a 5 cm do nitrogênio líquido. O suporte era móvel (Figura 13c) para facilitar a transferência da palheta para o nitrogênio líquido.

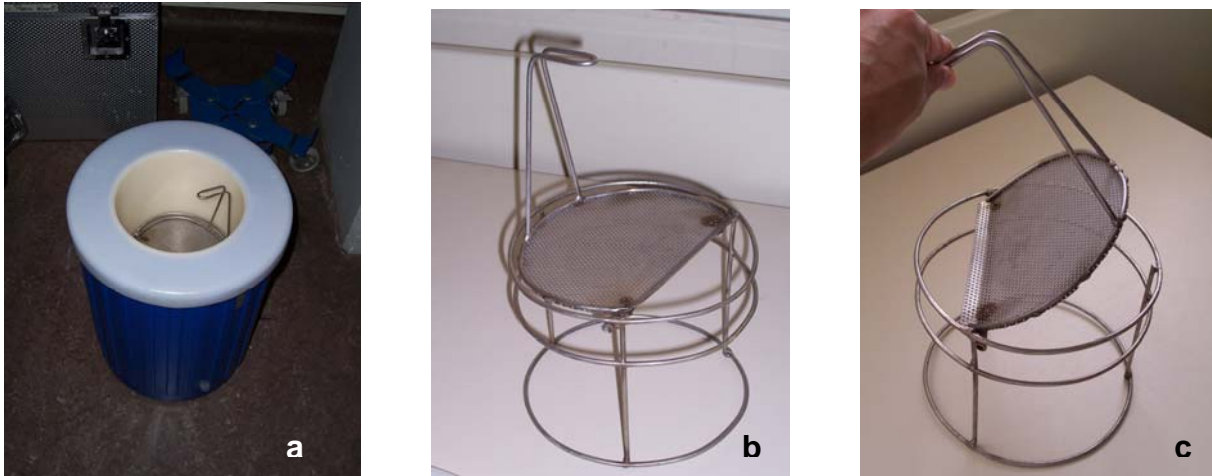


Figura 13 – a) Balde térmico com armação de ferro; b) Armação de ferro para balde térmico; c) Parte móvel da armação de ferro

#### 4.8.2 Centro Nacional de Primatas - CENP

Para todos os protocolos foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de TEST-GEMA sem glicerol imediatamente após a colheita. As diluições subseqüentes foram realizadas no laboratório após o cálculo da concentração de acordo com os protocolos de congelação.

Quando possível, foi utilizada concentração fixa de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL por palheta. Caso o número de espermatozoides não fosse suficiente para esta concentração, foram preparadas no mínimo uma palheta para cada protocolo.

O Protocolo 1 foi realizado como descrito para o DPZ. Os protocolos 2 e 3 realizados no CENP estão descritos a seguir.

#### *4.8.2.1 Congelação sem fase de equilíbrio (Protocolo 2)*

Neste protocolo, a amostra foi preparada e congelada como no Protocolo 1, porém as palhetas foram transferidas diretamente para o vapor de nitrogênio, sem a fase de equilíbrio no refrigerador.

#### *4.8.2.2 Congelação sem fase de equilíbrio e de vapor (Protocolo 3)*

O sêmen e o preparo das palhetas foi realizado como nos protocolos 1 e 2. As palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido imediatamente após o preparo. As palhetas não foram mantidas no refrigerador para a fase de equilíbrio e não permaneceram no vapor de nitrogênio.

### **4.9 Descongelção das palhetas**

As amostras do DPZ foram descongeladas no DPZ e as amostras do CENP na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As palhetas foram descongeladas com imersão em água a 37°C por 5-10 segundos. Após secagem com papel absorvente, as palhetas eram cortadas com tesoura e o sêmen era transferido para um tubo tipo Eppendorf mantido a 37°C.

Era realizada a avaliação da motilidade, motilidade progressiva linear, integridade da membrana plasmática (Eosina-Nigrosina), morfologia (SpermOscan<sup>®</sup> no DPZ e Spermac<sup>®</sup> na USP) e integridade acrossomal (Coloração simples no DPZ e Spermac<sup>®</sup> na USP).

Adicionalmente, nas amostras provenientes do CENP foram realizadas as avaliações da atividade citoquímica mitocondrial (DAB) e da taxa de fragmentação de DNA (ensaio Cometa).

#### **4.10 Experimentos:**

A metodologia utilizada para a colheita de sêmen em todos os experimentos foi a vibro estimulação peniana segundo protocolo descrito anteriormente.

##### **4.10.1 Experimento 1: Avaliação do uso de 3 diferentes colorações para integridade do acrossoma – Coloração simples, FITC-PSA e Trypan-blue giemsa**

Um pré-experimento foi realizado para verificar o efeito da temperatura entre incubação a 25°C e a 37°C na técnica de coloração simples. As mesmas amostras foram coradas com incubação nas duas temperaturas. Todos os protocolos realizados posteriormente com esta coloração respeitaram a temperatura da amostra com a temperatura de incubação igual a temperatura da amostra.

No experimento para avaliação das colorações para integridade acrossomal, inicialmente foram utilizados 11 ejaculados de *Callithrix jacchus* mantidos no DPZ. O sêmen foi colhido, diluído com TALP-HEPES e transportado ao laboratório. Após o processamento descrito para o material colhido no DPZ, foram realizadas 3 colorações para integridade acrossomal, a coloração simples, a coloração fluorescente FITC-PSA e a coloração dupla trypan-blue e giemsa.

Posteriormente, foram utilizados 4 ejaculados. Após processamento padrão do DPZ, foram realizadas as 3 colorações citadas acima. O sêmen foi tratado para capacitação e indução da reação acrossômica conforme protocolos descritos anteriormente. As mesmas colorações foram novamente realizadas.

Amostras de sêmen (n=15) foram descongeladas e coradas para verificação do efeito da coloração simples para acrossomo em espermatozóides após a descongelação.

#### 4.10.2 Experimento 2: Validação da coloração para avaliação da integridade da membrana plasmática – Eosina-nigrosina

Para a validação da coloração para avaliação da integridade da membrana plasmática pela técnica eosina-nigrosina, foram utilizados 4 ejaculados de *Callithrix jacchus* mantidos no CENP.

Após diluição com 100µL de meio TALP-HEPES, as amostras foram divididas em 2 partes de igual volume. As duas partes de cada amostra foram coradas separadamente como descrito anteriormente.

Uma parte foi mantida em banho maria a 37°C e a outra foi colocada em nitrogênio líquido por 5 minutos e descongelada em banho maria a 40°C por 5 minutos no intuito de danificar a membrana plasmática dos espermatozóides. As duas partes foram novamente coradas.

Após esta fase, 50% do volume da parte da amostra que estava a 37°C foi transferida para outro tubo tipo Eppendorf e foram adicionados 50% do volume da parte da amostra que sofreu o congelamento totalizando 3 amostras. As 3 amostras foram coradas.

Depois de secas, todas as lâminas foram montadas com meio de montagem Eukitt<sup>®</sup> e lamínula. As análises foram realizadas na mesma seqüência em que as lâminas foram preparadas.

#### 4.10.3 Experimento 3: Avaliação do efeito de 2 diluidores nas características seminais de *Callithrix jacchus*

Neste experimento foi utilizado sêmen de *Callithrix jacchus* proveniente de 19 ejaculados.

Os diluidores utilizados imediatamente após a ejaculação foram TALP-HEPES e TEST-GEMA. O diluidor TEST-GEMA foi utilizado em 14 ejaculados e o diluidor TALP-HEPES em 5 ejaculados provenientes de animais mantidos no CENP. Os mesmos animais contribuíram para os dois grupos de diluidor.

As características avaliadas foram volume, motilidade, motilidade progressiva, percentual de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (vivos),



integridade do acrossoma por coloração simples para acrossoma, concentração e pH seminal.

#### 4.10.4 Experimento 4: Avaliação das características seminais em duas colônias de *Callithrix jacchus*, no DPZ, Alemanha e no CENP, Brasil

Para este experimento foram realizadas 22 colheitas de sêmen no DPZ e 19 no CENP. Foram avaliadas as características seminais físicas e morfológicas imediatamente após a ejaculação.

As características avaliadas foram volume, motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal por coloração simples para acrossoma, concentração, pH seminal, percentual de defeitos maiores, percentual de defeitos menores e total de espermatozóides normais. A morfologia espermáticas foi realizada em sêmen corado com SpermOscan<sup>®</sup>.

Os defeitos específicos avaliados foram espermatozóides com cabeça subdesenvolvida, formas duplas, piriforme, estreitamento de base, cauda enrolada, cabeça solta, cabeça com peca intermediária sem cauda, grânulo no acrossoma, vacúolo no acrossoma, cauda fortemente dobrada, cauda fortemente enrolada, gota citoplasmática distal, gota citoplasmática proximal, cauda enrolada ou dobrada com gota, cabeça gigante e cabeça delgada.

#### 4.10.5 Experimento 5: Avaliação do efeito da adição do glicerol nas características seminais

O sêmen foi diluído com TEST-GEMA imediatamente após a ejaculação. Foram utilizados 14 ejaculados de *Callithrix jacchus* mantidos no CENP.

Foram realizados os procedimentos descritos para o processamento do sêmen e do protocolo de congelação 1 do CENP até a fase de adição do glicerol. As análises foram realizadas antes e depois da adição do glicerol.

Foram avaliadas a motilidade, motilidade progressiva, integridades da membrana plasmática, integridade do acrossoma por coloração simples, defeitos maiores, defeitos menores e espermatozóides normais. As mesmas patologias espermáticas específicas avaliadas no experimento 4 foram avaliadas neste experimento em sêmen corado com SpermOscan®.

#### 4.10.6 Experimento 6: Avaliação do efeito de 3 protocolos de congelação de sêmen de *Callithrix jacchus* nas características seminais

Neste experimento foram utilizados 14 ejaculados de *Callithrix jacchus* mantidos na colônia do CENP.

O sêmen foi processado como descrito anteriormente para os animais do CENP e foram aplicados 3 protocolos de congelação em todas as amostras. Os protocolos foram descritos em suas respectivas seções.

A descongelação foi realizada como descrito anteriormente e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente (25°C).

As características seminais foram avaliadas na fase pré-congelação, imediatamente após a descongelação, e em intervalos de 1 hora até um total de 4 horas após a descongelação.

Na fase pré-congelação e imediatamente após a descongelação, as amostras foram avaliadas para as mesmas variáveis do Experimento 5. Nas fases 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelação as amostras foram avaliadas para motilidade, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática.

A avaliação da integridade acrossomal e das patologias espermáticas na fase pré-congelação foram realizadas em preparados de sêmen corados com coloração simples para acrossoma e SpermOscan<sup>®</sup> respectivamente. Após as descongelações, ambas avaliações foram realizadas em sêmen corado com Spermac<sup>®</sup>.

#### 4.10.7 Experimento 7: Avaliação da atividade citoquímica mitocondrial após a descongelação

De um total de 42 palhetas descongeladas, 32 palhetas dos 3 protocolos aplicados foram utilizadas nas avaliações da atividade citoquímica mitocondrial. Foi realizada a coloração pela técnica descrita na respectiva seção nos momentos 1 hora e 2 horas após a descongelação.

Imediatamente após a descongelação da palheta, uma alíquota da amostra de sêmen era incubada a 37°C com a solução de DAB por 1 hora e após este período as lâminas eram preparadas. Neste mesmo momento, outra alíquota da mesma amostra que estava mantida em temperatura ambiente era colocada para incubar com uma nova solução de DAB por mais 1 hora e novas lâminas eram preparadas.

Para obtenção de um controle, uma mistura de uma alíquota de sêmen com solução de formol salino 10% foi incubada com a solução de DAB. No mesmo momento uma outra alíquota da mesma amostra de sêmen, porém sem formol salino 10% também foi incubada com solução de DAB e foram preparadas as lâminas. Todas as lâminas foram identificadas por códigos para impedir que o examinador soubesse qual era a lâmina examinada.

As lâminas foram armazenadas em locais com pouca ou nenhuma luminosidade até o momento das análises.

#### 4.10.8 Experimento 8: Avaliação da taxa da fragmentação de DNA do espermatozóide após a descongelação

Para este experimento foram utilizadas palhetas das mesmas amostras utilizadas nos experimentos 5 e 6. As palhetas eram provenientes de 7 ejaculados em que foi possível a preparação de mais de uma palheta dos 3 protocolos.

O Protocolo 3, no qual o sêmen é colocado diretamente no nitrogênio líquido foi utilizado como controle.

#### 4.11 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformados (logaritmo na base 10 -  $\text{Log}_{10}X$ ; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado -  $X^2$ ) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregados as médias, os erros padrões das médias e os coeficientes de variação (média  $\pm$  erro padrão da média (coeficiente de variação)) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar  $H_0$  (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta.

As variáveis resposta foram analisadas através da correlação de Pearson (PROC CORR), e os resultados foram expressos através do coeficiente de correlação de Pearson (r) e seu nível de significância (p).

#### 4.11.1 Experimento 1: Avaliação do uso de 3 diferentes colorações para integridade do acrossomo – coloração simples, FITC-PSA e trypan-blue giemsa

No experimento para avaliação do efeito da temperatura de incubação na coloração simples para integridade acrossomal, a variável classificatória utilizada foi temperatura de incubação (25 e 37°C). A variável resposta foi percentual de espermatozoides com acrossomo íntegro. A mesma obedeceu às premissas e não foi necessária qualquer transformação.

Neste experimento, inicialmente a variável classificatória utilizada foi a coloração (Coloração simples ou FITC-PSA). A variável resposta foi o percentual de espermatozoides com acrossomo íntegro. A mesma obedeceu às premissas e não foi necessária qualquer transformação. Foi realizada a análise de correlação entre as colorações.

Para a comparação entre a coloração simples e FITC-PSA antes e depois da indução da reação acrossômica as variáveis classificatórias utilizada foram o tempo (Antes e Depois da indução) e coloração do acrossomo (Coloração simples e FITC-PSA). A variável resposta foi percentual de espermatozoides com acrossomo íntegro. A mesma obedeceu às premissas e não foi necessária qualquer transformação.

#### 4.11.2 Experimento 2: Validação da coloração para avaliação da integridade da membrana plasmática – Eosina-nigrosina

Neste experimento foi utilizada uma análise de regressão. A diluição da amostra espermática era a variável independente e o percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra era a variável dependente. Não foi necessária nenhuma transformação para que os dados obedecessem às premissas estatísticas.

#### 4.11.3 Experimento 3: Avaliação do efeito de 2 diluidores nas características seminais de *Callithrix jacchus*

Neste experimento a variável classificatória utilizada foi o diluidor (Hepes-TALP e TRIS Gema). As variáveis resposta foram: volume seminal, motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, concentração e pH seminal. Todas as variáveis obedeceram às premissas e não foi necessária qualquer transformação, com exceção da concentração espermática, que foi transformada para logaritmo na base 10.

#### 4.11.4 Experimento 4: Avaliação das características seminais em duas colônias de *Callithrix jacchus*, no DPZ, Alemanha e no CENP, Brasil

Neste experimento a variável classificatória utilizada foi o local (CENP ou DPZ). As variáveis resposta foram: volume seminal, motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, concentração e pH seminal. Todas as variáveis obedeceram às premissas e não foi necessária qualquer transformação, com exceção da concentração espermática, que foi transformada para logaritmo na base 10. Neste experimento também foram avaliados os defeitos espermáticos, tanto separadamente como agrupados em defeitos maiores, defeitos menores e percentual de espermatozoides normais. As variáveis percentual de defeitos menores, percentual de defeitos maiores e percentual de células normais obedeceram às premissas e não foi necessária qualquer transformação, com exceção do percentual de defeitos maiores, que foi transformado para logaritmo na base 10. Todos os defeitos espermáticos, quando analisados separadamente, não obedeceram às premissas e não foi possível transformá-los. Estas variáveis foram analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Nestes casos utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon para dois tratamentos.



#### 4.11.5 Experimento 5: Avaliação do efeito da adição do glicerol nas características seminais

Neste experimento a variável classificatória utilizada foi o tempo (Antes e Depois da adição do glicerol). As variáveis resposta foram as mesmas do Experimento 4, com exceção da concentração, volume e pH seminal, analisadas apenas imediatamente após a colheita. As variáveis motilidade, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, defeitos menores, defeitos maiores e percentual de espermatozóides normais obedeceram às premissas e não foi necessária qualquer transformação, com exceção da motilidade e da integridade da membrana plasmática, que foram transformadas para seus valores ao quadrado. Todos os defeitos espermáticos, quando analisados separadamente, assim como a variável motilidade progressiva, não obedeceram às premissas e não foi possível transformá-los. Estas variáveis foram analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Nestes casos utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon para dois tratamentos.

#### 4.11.6 Experimento 6: Avaliação do efeito de 3 protocolos de congelação de sêmen de *Callithrix jacchus* nas características seminais

Neste experimento as variáveis classificatórias utilizada foram o tempo (Pré

congelamento e Pós congelamento) e protocolo de congelamento (1, 2 e 3). Neste caso foi avaliada a interação entre tempo e tratamento. Quando não houve interação o efeito de cada tratamento foi analisado separadamente. Quando houve a interação os tratamentos foram analisados conjuntamente. As variáveis resposta foram as mesmas do experimento anterior. As variáveis motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, defeitos menores, defeitos maiores e percentual de espermatozóides normais obedeceram às premissas e não foi necessária qualquer transformação, com exceção do percentual de defeitos menores e de espermatozóides normais, que foram transformadas para raiz quadrada e logaritmo na base 10, respectivamente. Todos os defeitos espermáticos, quando analisados separadamente, não obedeceram às premissas e não foi possível transformá-los. Estas variáveis foram analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Nestes casos utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon para dois tratamentos.

#### *4.11.6.1 Efeito do tempo após a descongelação e dos protocolos de congelamento*

Neste experimento as variáveis classificatórias utilizadas foram o tempo após a descongelação (1, 2, 3 e 4 horas) e o protocolo de congelamento (1, 2 e 3). Neste caso foi avaliada a interação entre tempo e tratamento. Quando não houve interação o efeito de cada tratamento foi analisado separadamente. Quando houve a interação os tratamentos foram analisados conjuntamente. As variáveis resposta utilizadas

foram motilidade, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática. Todas as variáveis obedeceram às premissas e não foi necessária qualquer transformação.

#### 4.11.7 Experimento 7: Avaliação da atividade citoquímica mitocondrial após a descongelação

Neste experimento as variáveis classificatórias utilizadas foram o tempo após a descongelação (1 e 2 horas) e protocolo de congelamento (1, 2 e 3). Neste caso foi avaliada a interação entre tempo e tratamento. Quando não houve interação o efeito de cada tratamento foi analisado separadamente. Quando houve a interação os tratamentos foram analisados conjuntamente. As variáveis resposta utilizadas foram % de células Classe I, % de células Classe II, % de células Classe III e % de células Classe IV. Para a análise de correlação foram também utilizadas as mesmas variáveis do experimento anterior (nos mesmos tempos e utilizando as mesmas partidas). A variável percentual de células Classe II obedeceu às premissas e não foi necessária qualquer transformação. As variáveis percentual de células Classe I e III obedeceram às premissas após a transformação para raiz quadrada e logaritmo na base 10, respectivamente. A variável percentual de células Classe IV não obedeceu às premissas, e não foi possível transformá-la. Esta variável foi analisada através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Neste caso utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon para dois tratamentos.

#### 4.11.8 Experimento 8: Avaliação da taxa da fragmentação de DNA do espermatozóide após a descongelação

Neste experimento a variável classificatória utilizada foi o protocolo de congelamento (1, 2 e 3). As variáveis resposta utilizadas foram % de células Classe I, % de células Classe II, % de células Classe III e % de células Classe IV. Para a análise de correlação foram também utilizadas as mesmas variáveis do Experimento 6 (no mesmo tempo e utilizando as mesmas partidas). As variáveis percentuais de células Classe I e de Classe III obedeceram às premissas e não foi necessária qualquer transformação. As variáveis percentuais de células Classe II e de Classe VI obedeceram às premissas após a transformação logaritmo na base 10.

## 5 RESULTADOS

O protocolo de estimulação utilizado apresentou resultados positivos, ou seja, ejaculação (Figura 14), em 83,33% dos procedimentos realizados em animais que nunca haviam sido utilizados em procedimentos para colheita de sêmen por qualquer técnica artificial.

Os demais resultados estão apresentados separadamente para cada experimento.

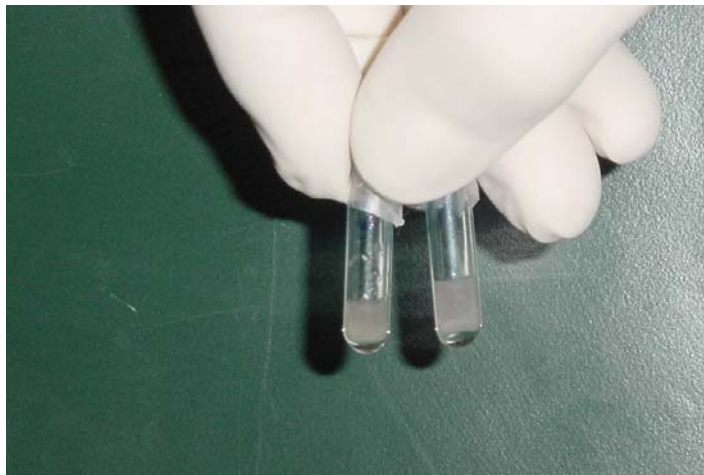


Figura 14 – Imagem de amostras de sêmen de *Callithrix jacchus* colhidas por vibro estimulação peniana

### 5.1 Experimento 1: Avaliação do uso de 3 diferentes colorações para integridade do acrossoma – coloração simples, FITC-PSA e trypan-blue giemsa

A análise das lâminas com esfregaço de sêmen corado pela técnica trypan-blue giemsa demonstrou não ser possível a avaliação da integridade acrossomal.

Todos os espermatozoides ficaram corados da mesma cor com a cabeça corada inteiramente na cor roxa, não houve diferenciação da região acrossomal em nenhum espermatozoide (Figura 15).

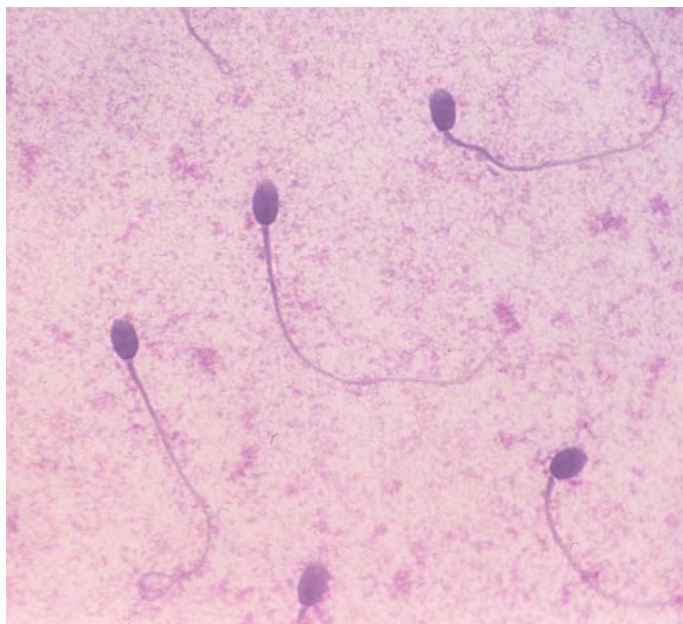


Figura 15 – Fotomicrografia de espermatozoides de *Callithrix jacchus* corados por Trypan-blue Giemsa, em microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo, aumento digital 4,6x

No pré-experimento realizado previamente para verificar o efeito da temperatura na técnica de coloração simples para acrossoma foi demonstrado não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre incubação a 25°C e a 37°C. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Percentual de espermatozoides de *Callithrix jacchus* com acrossomo íntegro corados pela técnica de coloração simples com diferentes temperaturas de incubação

<b>TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO</b>			
<b>Característica</b>	<b>25°C</b>	<b>37°C</b>	
	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>p</b>
Acrossomo íntegro	77,17 ± 4,42	79,00 ± 3,60	0,7640

Todos os protocolos realizados posteriormente com coloração simples para acrossoma utilizaram a temperatura de incubação igual a temperatura da amostra.

Na coloração simples para acrossoma e na coloração com FITC-PSA, a integridade acrossomal pôde ser avaliada, houve diferenciação da região acrossomal que pôde ser claramente evidenciada. Nas figuras 16a e 16b verificamos espermatozóides de *Callithrix jacchus* com acrossoma não íntegro e íntegro corados corados por fluorescência com FITC-PSA e nas figuras 17a e 17b pela técnica de coloração simples para acrossomo.

A avaliação da coloração simples para acrossoma e por fluorescência (FITC-PSA) para acrossoma em 11 ejaculados de *Callithrix jacchus* antes de tratamento demonstrou consistência nos resultados em ambas as técnicas e foi encontrada correlação entre as técnicas ( $r=0,9672$ ,  $p<0,0001$ ). Os resultados estão apresentados na tabela 2 e no gráfico 1.

Tabela 2 - Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com acrossomo íntegro corados pela técnica de coloração simples e por FITC-PSA

<b>COLORAÇÃO</b>				
<b>Característica</b>	<b>Coloração simples Média ± EPM (CV)</b>	<b>FITC-PSA Média ± EPM (CV)</b>	<b>Correlação de Pearson</b>	<b>p</b>
Acrossomo íntegro	78,59 ± 3,86 (164,34)	77,50 ± 4,08 (183,15)	r=0,9672	<0,0001

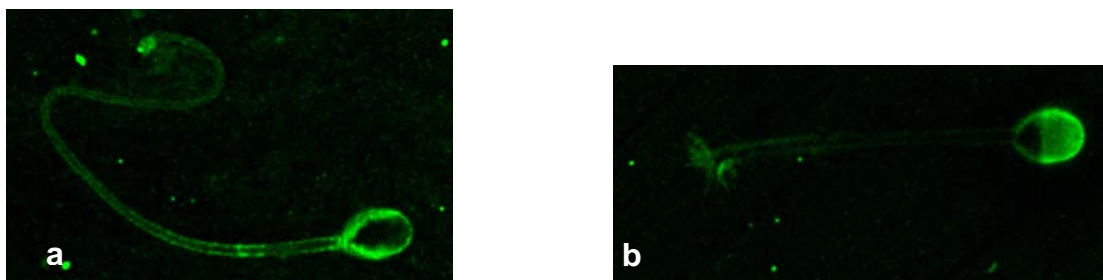


Figura 16 – Fotomicrografia de espermatozóide de *Callithrix jacchus* corados por FITC-PSA com (a) acrossomo não íntegro e (b) acrossomo íntegro, em microscopia a laser sistema LSM 5 Pascal, objetiva 100x sob imersão em óleo

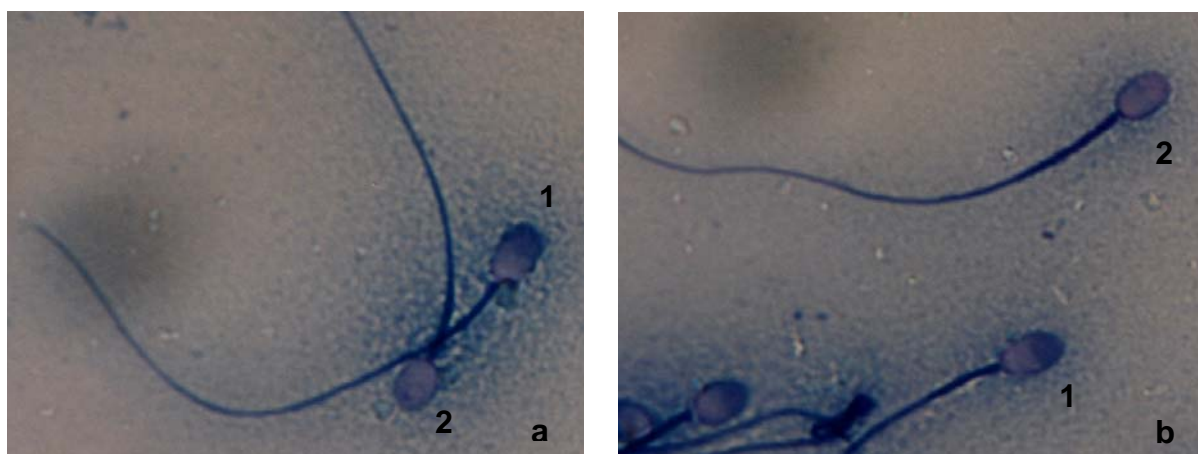


Figura 17 – Fotomicrografia de espermatozóides de *Callithrix jacchus* (a) e (b) corados pela técnica de coloração simples para acrossomo com (1) acrossomo íntegro e (2) acrossomo não íntegro, em microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo

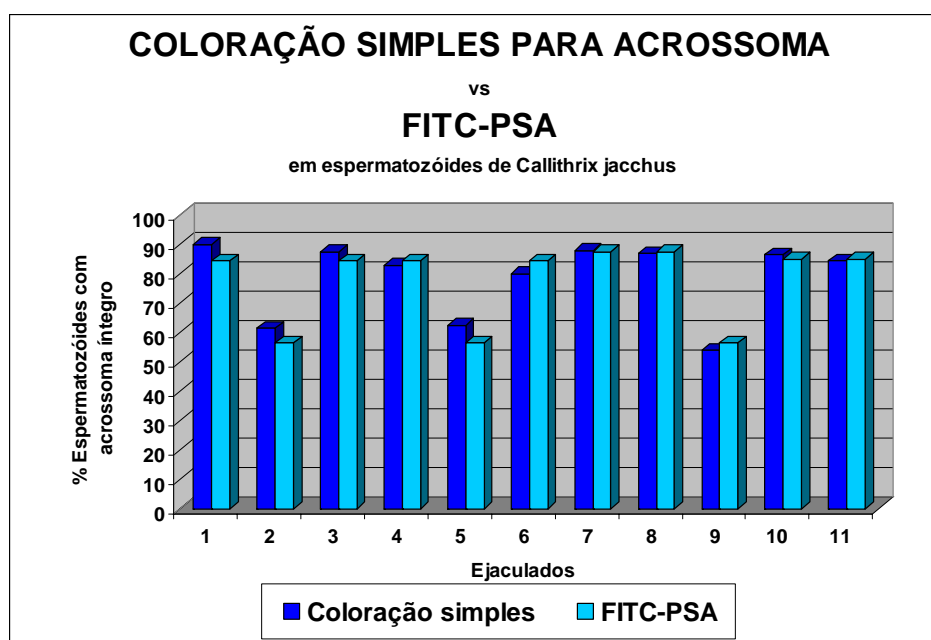


Gráfico 1 - Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com acrossoma íntegro corados por coloração simples para acrossoma e por coloração fluorescente - FITC-PSA



Os resultados das colorações simples para acrossoma e por fluorescência em 4 animais nas seguintes fases: ① após colheita, antes de tratamento; ② após tratamento com capacitação e ativação com Cálcio Ionophor A23187 demonstraram haver diferença significativa antes e após o tratamento em cada uma das colorações ( $p < 0,05$ ), e não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as colorações antes e após o tratamento.

Os resultados estão apresentados na tabela 3 e nos gráficos 2 e 3.

Os espermatozóides descongelados e corados pela coloração simples para acrossoma não apresentaram diferenciação da região acrossomal e pós-acrossomal e não foi possível evidenciar o acrossomo íntegro nestas condições em nenhum dos espermatozóides avaliados. Nesta fase, as cabeças dos espermatozóides apresentaram coloração azulada por toda sua extensão.

Tabela 3 – Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com acrossomo íntegro antes e após indução da reação acrossômica corados pela técnica de coloração simples e por FITC-PSA

	COLORAÇÃO		
	Coloração simples Média $\pm$ EPM (CV)	FITC-PSA Média $\pm$ EPM (CV)	p
<b>Acrossoma íntegro antes de tratamento</b>	87,12 $\pm$ 7,75 (164,34)	78,37 $\pm$ 7,32 (183,15)	0,4432
<b>Acrossoma íntegro após tratamento</b>	10,00 $\pm$ 1,96	8,62 $\pm$ 1,97	0,6384
<b>p</b>	< 0,0001	< 0,0001	

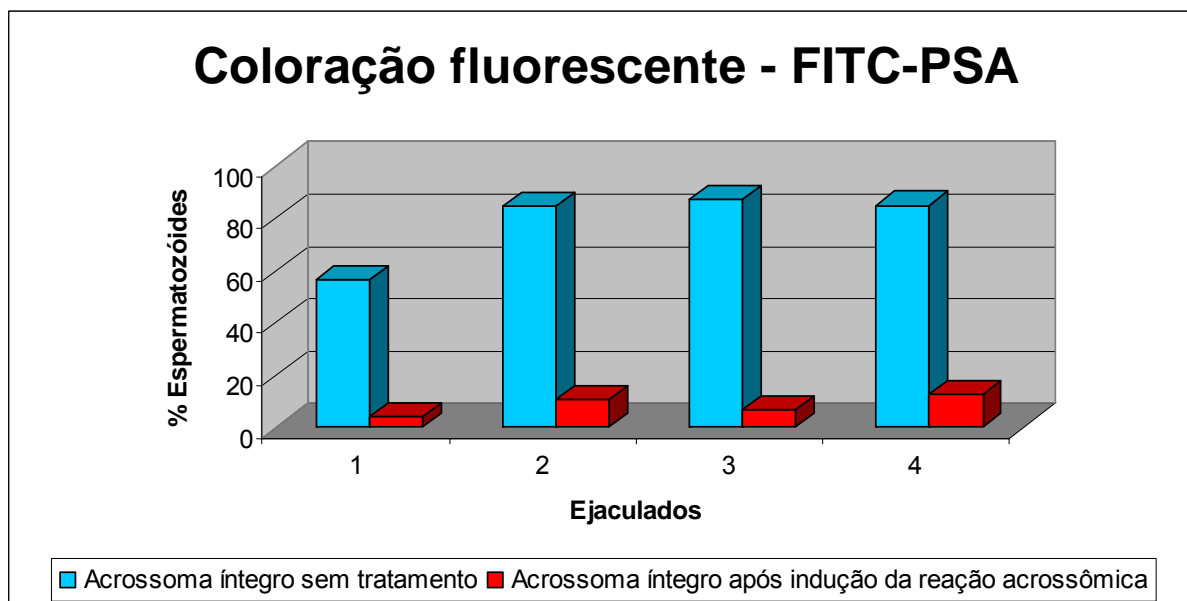


Gráfico 2 - Percentual de espermatozoides de *Callithrix jacchus* com acrossoma íntegro, antes do tratamento e após indução da reação acrossômica, corados pela técnica de coloração fluorescente com FITC-PSA

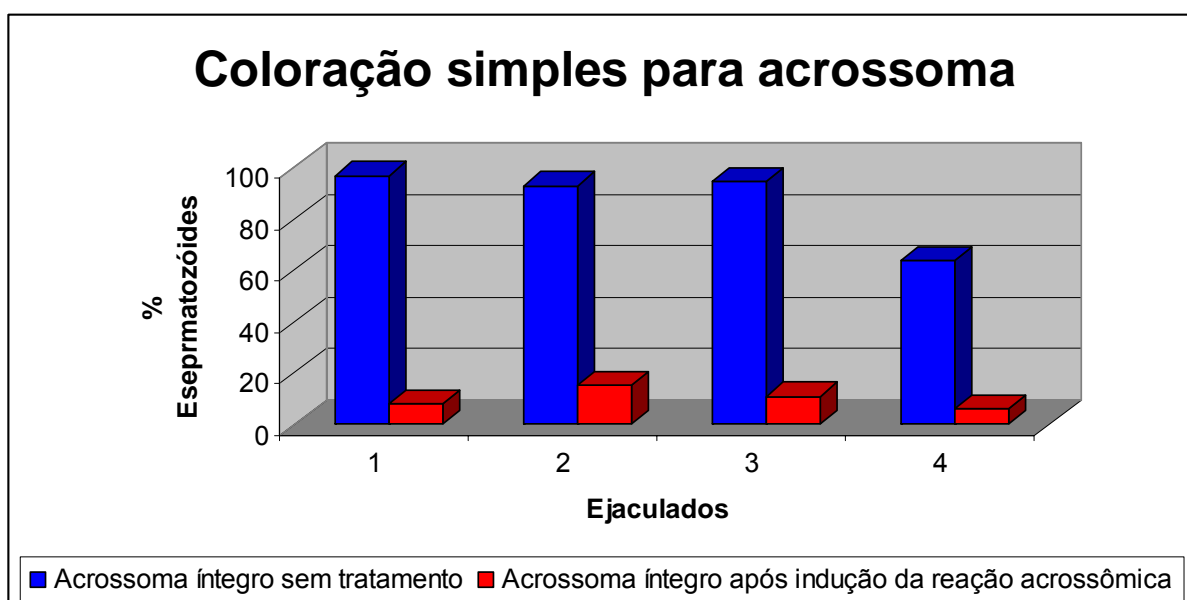


Gráfico 3 - Percentual de espermatozoides de *Callithrix jacchus* com acrossoma íntegro, antes do tratamento e após indução da reação acrossômica, corados pela técnica de coloração simples para acrossoma

## 5.2 Experimento 2: Validação da coloração para avaliação da integridade da membrana plasmática – Eosina-nigrosina

A coloração foi eficiente e os espermatozóides corados e não corados podem ser vistos na figura 18.

A análise de regressão dos resultados obtidos nas diferentes diluições demonstrou que a técnica avaliada pôde ser validada ( $R^2=0,9811$ ,  $p<0,0001$ ). Os resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* com membrana plasmática íntegra de amostras de sêmen submetidas a congelação em nitrogênio líquido diluídas em amostras mantidas a 37°C

Diluição	DILUIÇÃO			$R^2$ , $p$
	0 % Média $\pm$ EPM	50 % Média $\pm$ EPM	100 % Média $\pm$ EPM	
Membrana íntegra	0	36,75 $\pm$ 2,47	73,75 $\pm$ 3,13	$R^2 = 0,9811$ , $p < 0,0001$



Figura 18 – Fotomicrografia de espermatozóides de *Callithrix jacchus* corados com Eosina-nigrosina, em microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo. Espermatozóides com membrana plasmática íntegra não corados e com membrana plasmática não íntegra corados em rosa

### 5.3 Experimento 3: Avaliação do efeito de 2 diluidores nas características seminais de *Callithrix jacchus*

Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas características seminais avaliadas (volume, motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal), nas diluições com o meio diluidor TEST-GEMA e com o diluidor TALP-HEPES. A variável pH seminal avaliada antes da diluição, e a concentração são características que não dependem do diluidor e também não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Os resultados estão demonstrados no gráfico 4 e na tabela 5.

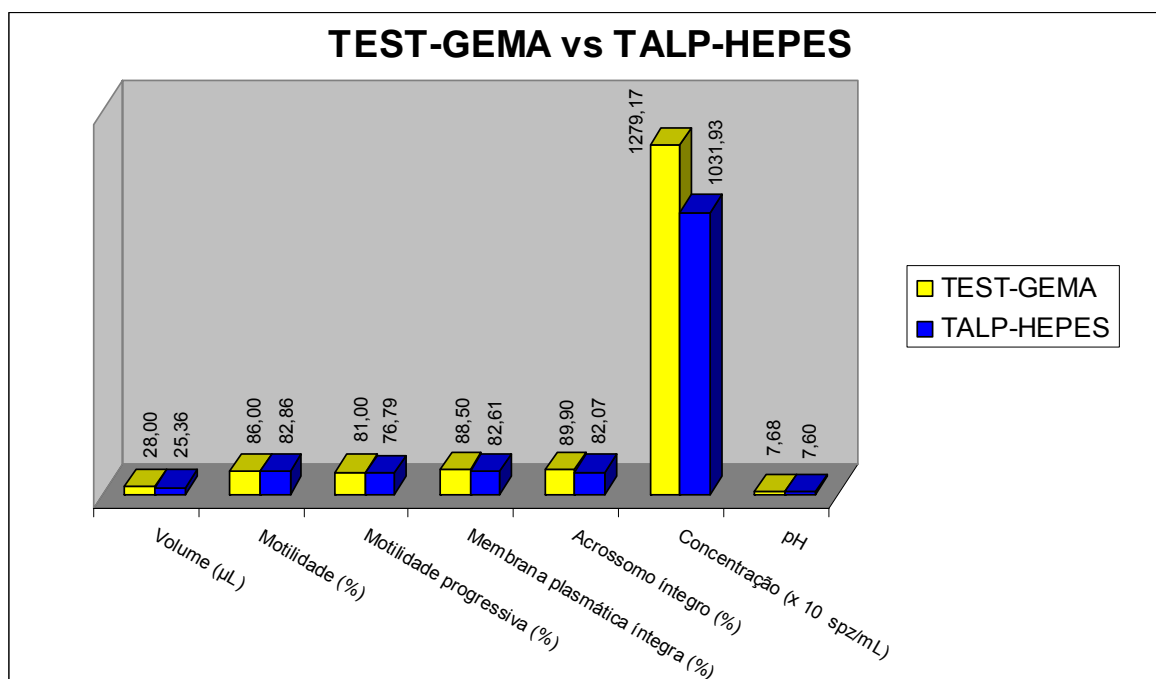


Gráfico 4 – Características seminais de *Callithrix jacchus* nos diluidores TALP-HEPES e TEST-GEMA clarificado

Tabela 5 – Características seminais de *Callithrix jacchus* após diluição em TEST GEMA clarificado ou TALP-HEPES

Característica	Diluidor		p
	TEST-GEMA Média ± EPM (CV)	TALP-HEPES Média ± EPM (CV)	
Volume (µL)	28,00 ± 4,06 (54,39)	25,36 ± 3,69 (32,44)	0,6977
Motilidade (%)	86,00 ± 2,91 (12,68)	82,86 ± 2,81 (7,58)	0,5430
Motilidade progressiva (%)	81,00 ± 2,91 (14,81)	76,79 ± 3,04 (8,05)	0,4488
Membrana plasmática íntegra (%)	88,50 ± 3,09 (11,46)	82,61 ± 2,53 (7,80)	0,2223
Acrossomo íntegro (%)	89,90 ± 1,08 (11,33)	82,07 ± 2,48 (2,68)	0,0850
Concentração (x10 <sup>6</sup> spz/mL)	1279,17 ± 678,20 (94,48)	1031,93 ± 260,57 (118,55)	0,6787
pH	7,68 ± 0,10 (2,31)	7,60 ± 0,05 (2,96)	0,4280

#### 5.4 Experimento 4: Avaliação das características seminais em duas colônias de *Callithrix jacchus*, no DPZ, Alemanha e no CENP, Brasil

A comparação das características seminais das colônias de *Callithrix jacchus* do CENP e do DPZ demonstrou não haver diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) entre as duas colônias para as variáveis volume, motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, concentração, pH seminal, percentual de espermatozóides com defeitos maiores e menores e

percentual de espermatozoides normais. Os resultados podem ser verificados no gráfico 5 e na tabela 6.

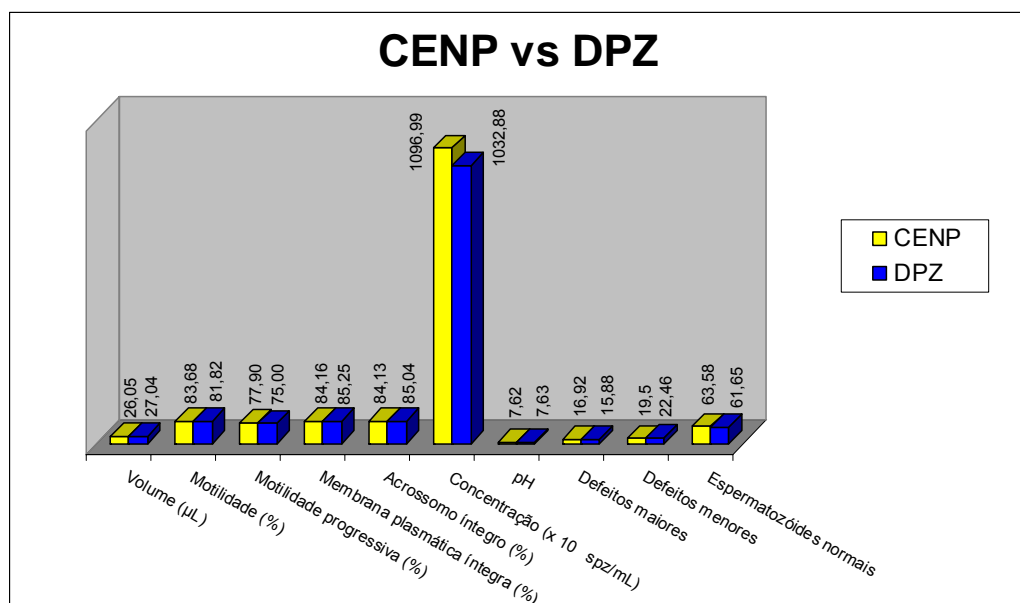


Gráfico 5 – Características seminais de *Callithrix jacchus* das colônias do CENP, Brasil e do DPZ, Alemanha

Tabela 6 - Características seminais de *Callithrix jacchus* das colônias do CENP, Brasil e do DPZ, Alemanha

Característica	COLÔNIA		p
	CENP Média ± EPM (CV)	DPZ Média ± EPM (CV)	
Volume (µL)	26,05 ± 2,88 (48,12)	27,04 ± 2,45 (42,56)	0,7930
Motilidade (%)	83,68 ± 2,19 (11,41)	81,82 ± 3,20 (18,34)	0,6436
Motilidade progressiva (%)	77,90 ± 2,37 (13,24)	75,00 ± 3,27 (20,47)	0,4902
Membrana plasmática íntegra (%)	84,16 ± 2,08 (10,79)	85,25 ± 3,42 (18,84)	0,7946
Acrossomo íntegro (%)	84,13 ± 2,00 (10,38)	85,04 ± 3,93 (21,69)	0,8445
Concentração (x10 <sup>6</sup> spz/mL)	1096,99 ± 252,37 (100,28)	1032,88 ± 205,56 (93,35)	0,8434
pH	7,62 ± 0,04 (2,46)	7,63 ± 0,05 (2,73)	0,8887
Defeitos maiores	16,92 ± 2,05 (52,87)	15,88 ± 1,72 (38,98)	0,7201
Defeitos menores	19,50 ± 2,05 (45,74)	22,46 ± 3,10 (64,18)	0,5861
Espermatozoides normais	63,58 ± 3,41 (23,41)	61,65 ± 4,74 (27,71)	0,7374

A análise da morfologia espermática demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas para as variáveis cauda enrolada, grânulo no acrossoma, cauda fortemente dobrada, gota citoplasmática proximal, e cauda dobrada ou enrolada com gota. Os resultados estão apresentados na tabela 7. Exemplos de espermatozóides corados com SpermOscan<sup>®</sup> podem ser verificados nas figuras 19a e 19b.

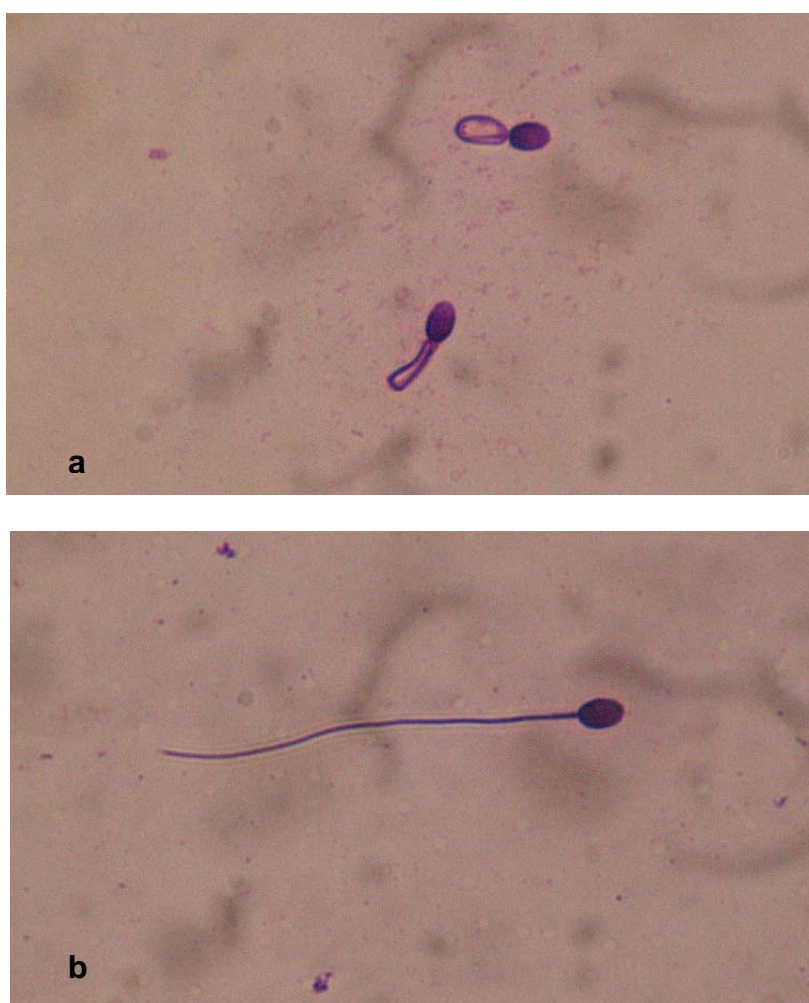


Figura 19 – Fotomicrografia de espermatozóide de *Callithrix jacchus* (a) com cauda fortemente enrolada e (b) com morfologia normal, corados com SpermOscan<sup>®</sup>, em microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo

Tabela 7 – Características espermáticas morfológicas de *Callithrix jacchus* das colônias do CENP, Brasil e do DPZ, Alemanha

Característica (%)	Colônia		p
	CENP Média ± EPM (CV)	DPZ Média ± EPM (CV)	
Cabeça subdesenvolvida	0,55 ± 0,15 (120,24)	0,19 ± 0,11 (199,67)	0,0624
Cabeça dupla	0,03 ± 0,03 (435,89)	0,04 ± 0,04 (360,55)	0,4103
Piriforme	0,21 ± 0,10 (214,13)	0,08 ± 0,05 (244,10)	0,2980
Estreitamento de base	0,08 ± 0,06 (317,59)	0	0,1309
Cauda dupla	0,29 ± 0,12 (184,92)	0,08 ± 0,05 (244,10)	0,1317
Cauda enrolada	3,42 ± 0,91 (115,93)	6,65 ± 1,18 (63,79)	<b>0,0085</b>
Cabeça solta	8,32 ± 1,77 (92,70)	10,31 ± 4,41 (154,36)	0,3445
Cabeça + peça intermediária	0,18 ± 0,09 (225,47)	0,31 ± 0,19 (225,35)	0,2995
Grânulo no acrossoma	0,82 ± 0,28 (149,028)	0,04 ± 0,04 (360,55)	<b>0,0111</b>
Vacúolo no acrossoma	2,55 ± 0,48 (81,52)	3,04 ± 0,78 (93,20)	0,3788
Cauda fortemente dobrada	8,16 ± 1,42 (75,87)	11,58 ± 0,99 (30,97)	<b>0,0166</b>
Cauda fortemente enrolada	5,03 ± 0,94 (81,32)	3,85 ± 0,98 (91,52)	0,2071
Gota citoplasmática distal	4,47 ± 1,53 (148,71)	1,96 ± 0,54 (100,06)	0,2002
Gota citoplasmática proximal	0,58 ± 0,29 (215,93)	0	<b>0,0189</b>
Cauda dobrada ou enrolada com gota	1,24 ± 0,57 (202,74)	0	<b>0,0116</b>
Cabeça gigante	0,21 ± 0,12 (241,63)	0,19 ± 0,09 (169,11)	0,2559
Cabeça delgada	0,29 ± 0,13 (202,05)	0,04 ± 0,04 (360,55)	0,0929

A análise para verificação da existência ou não de correlação entre as variáveis e qual o tipo de correlação existente pelo método estatístico Coeficiente de



Correlação de Pearson demonstrou haver correlação positiva e negativa entre algumas variáveis avaliadas.

As principais correlações encontradas estão descritas a seguir, com os respectivos valores para **r** e para **p**.

A motilidade apresentou correlação positiva com as variáveis motilidade progressiva ( $r=0,9445$ ,  $p<0,0001$ ), integridade da membrana plasmática ( $r=0,8811$ ,  $p<0,0001$ ), percentual de espermatozoides normais ( $r=0,5816$ ,  $p=0,0005$ ) e integridade acrossomal ( $r=0,5430$ ,  $p=0,0002$ ), e correlação negativa com cabeça solta ( $r=-0,7361$ ,  $p<0,0001$ ) e defeitos menores ( $r=-0,6838$ ,  $p<0,0001$ ).

A motilidade progressiva, além da motilidade anteriormente citada apresentou correlação positiva com integridade da membrana plasmática ( $r=0,8376$ ,  $p<0,0001$ ), percentual de espermatozoides normais ( $r=0,5908$ ,  $p=0,0004$ ), integridade acrossomal ( $r=0,4824$ ,  $p=0,0014$ ) e concentração ( $r=0,3193$ ,  $p=0,0418$ ), e correlação negativa com cabeça solta ( $r=-0,7047$ ,  $p<0,0001$ ), defeitos menores ( $r=-0,6542$ ,  $p<0,0001$ ).

A variável integridade da membrana plasmática, adicionalmente às correlações citadas anteriormente apresentou correlação positiva com integridade acrossomal ( $r=0,5206$ ,  $p=0,0005$ ) e percentual de espermatozoides normais ( $r=0,4709$ ,  $p=0,0065$ ) e correlação negativa com cabeça solta ( $r=-0,6722$ ,  $p<0,0001$ ) e defeitos menores ( $r=-0,5881$ ,  $p=0,0004$ ).

Para a integridade acrossomal, as correlações positivas encontradas foram com percentual de espermatozoides normais ( $r=0,5660$ ,  $p=0,0007$ ) e cauda enrolada ( $r=0,3768$ ,  $p=0,0335$ ), e as negativas foram com cabeça solta ( $r=-0,8234$ ,  $p<0,0001$ ) e defeitos menores ( $r=-0,6777$ ,  $p<0,0001$ ), além das variáveis já citadas.

A concentração apresentou apenas correlação positiva com o pH seminal ( $r=0,5962$ ,  $p<0,0001$ ) e gota citoplasmática distal ( $r=0,5204$ ,  $p=0,0023$ ), além da motilidade progressiva citada anteriormente.

Além da concentração, o pH seminal apresentou correlação positiva com gota citoplasmática distal ( $r=0,4215$ ,  $p=0,0203$ ) e correlação negativa com cauda fortemente dobrada ( $r=-0,4283$ ,  $p=0,0182$ ) e defeitos maiores ( $r=-0,3730$ ,  $p=0,0423$ ).

A variável cabeça solta apresentou correlação positiva com defeitos menores ( $r=0,8486$ ,  $p<0,0001$ ), cauda fortemente enrolada ( $r=0,4155$ ,  $p=0,0180$ ) e cabeça com peca intermediária sem cauda ( $r=0,4112$ ,  $p=0,0194$ ) e correlação negativa com percentual de espermatozóides normais ( $r=-0,7862$ ,  $p<0,0001$ ). As outras correlações encontradas para esta variável foram citadas anteriormente.

A correlação positiva encontrada para a variável cauda fortemente dobrada foi com defeitos maiores ( $r=0,7226$ ,  $p<0,001$ ) e foram encontradas correlações negativas com percentual de espermatozóides normais ( $r=-0,4423$ ,  $p=0,0113$ ) e com pH seminal, esta última já citada.

A variável cauda fortemente enrolada apresentou correlação positiva com cabeça solta, já citada, com defeitos maiores ( $r=0,6650$ ,  $p<0,0001$ ) e com cabeça com peca intermediária sem cauda ( $r=0,5347$ ,  $p=0,0016$ ), e correlação negativa com percentual de espermatozóides normais ( $r=-0,5455$ ,  $p=0,0012$ ).

Foram encontradas apenas correlações positivas entre a variável cabeça gigante e cabeça delgada ( $r=0,6705$ ,  $p<0,0001$ ) e com cabeça subdesenvolvida ( $r=0,3900$ ,  $p=0,0273$ ).

Além da correlação positiva com cabeça gigante, a variável cabeça delgada apresentou correlação positiva com cabeça subdesenvolvida ( $r=0,5024$ ,  $p=0,0034$ ).

O percentual de espermatozoides normais, adicionalmente às correlações já citadas apresentou correlação negativa com defeitos maiores ( $r=-0,7173$ ,  $p<0,0001$ ) e com defeitos menores ( $r=-0,8763$ ,  $p<0,0001$ ).

### **5.5 Experimento 5: Avaliação do efeito da adição do glicerol nas características seminais**

A análise do efeito da adição do glicerol nas variáveis motilidade, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática demonstrou haver diferença significativa ( $p<0,05$ ) para as 3 variáveis no sêmen diluído em TEST-GEMA sem glicerol e após a adição do diluidor com glicerol.

A integridade acrossomal, percentual de espermatozoides com defeitos maiores e menores e percentual de espermatozoides normais não demonstraram diferença significativa ( $p<0,05$ ). Os resultados podem ser verificados no gráfico 6 e na tabela 8.

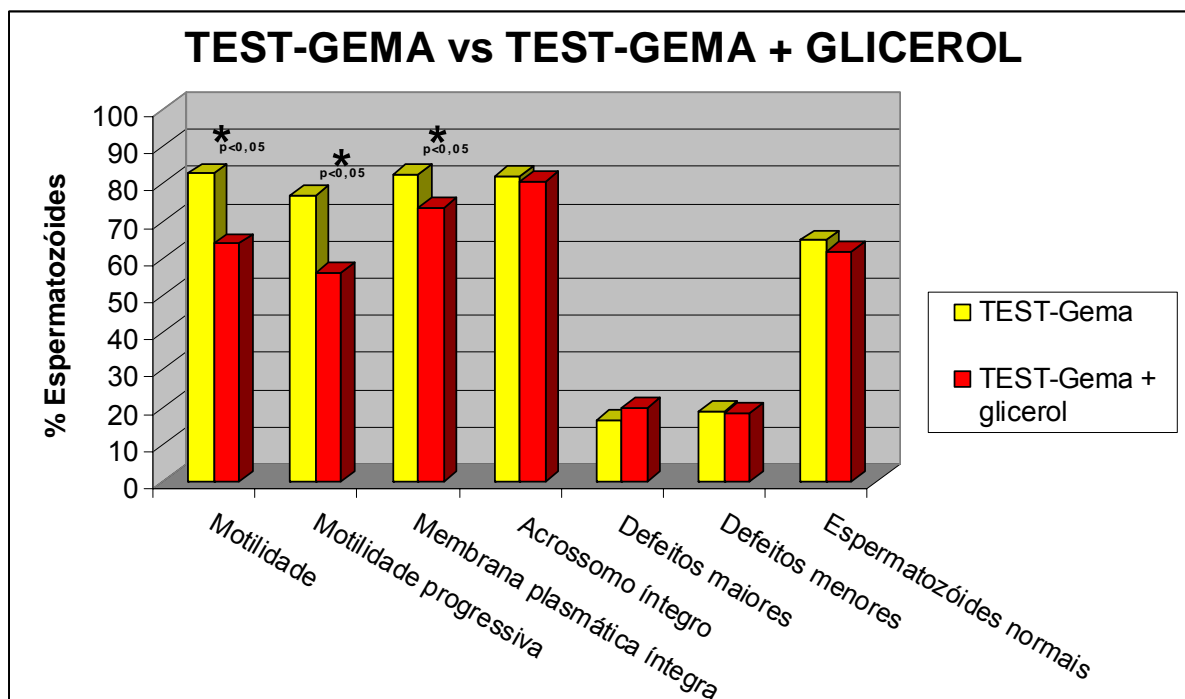


Gráfico 6 – Características seminais de *Callithrix jacchus* antes e após a adição de glicerol

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Tabela 8 – Características seminais de *Callithrix jacchus* diluído em TEST-GEMA clarificado antes e após a adição de glicerol

Característica (%)	Diluidor		p
	TEST-Gema Média ± EPM (CV)	TEST-Gema + glicerol Média ± EPM (CV)	
Motilidade	82,86 ± 1,58 (12,37)	63,93 ± 4,06 (41,15)	<0,0001
Motilidade progressiva	76,79 ± 1,71 (14,44)	56,07 ± 4,02 (46,42)	<0,0001
Membrana plasmática íntegra	82,61 ± 1,42 (11,17)	73,54 ± 2,08 (18,35)	0,0006
Acrossomo íntegro	82,07 ± 1,40 (11,05)	80,61 ± 1,58 (12,74)	0,4905
Defeitos maiores	16,5 ± 1,4 (55,28)	19,82 ± 1,67 (54,61)	0,1557
Defeitos menores	18,71 ± 1,2 (41,51)	18,25 ± 1,48 (52,75)	0,8084
Espermatozoides normais	64,79 ± 2,09 (20,87)	61,93 ± 3,03 (31,67)	0,4392

A análise da morfologia espermática demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas para as variáveis cauda dupla, cabeça com peça intermediária sem cauda, gota citoplasmática proximal. Os resultados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Características espermáticas morfológicas de *Callithrix jacchus* diluído em TEST-GEMA clarificado antes e após a adição do glicerol

<b>Diluidor</b>			
<b>Característica (%)</b>	<b>TEST-Gema Média ± EPM (CV)</b>	<b>TEST-Gema + glicerol Média ± EPM (CV)</b>	<b>p</b>
Cabeça subdesenvolvida	0,61 ± 0,11 (114,37)	0,5 ± 0,09 (114,76)	0,3037
Cabeça dupla	0	0	0,5
Piriforme	0,32 ± 0,08 (152,96)	0,18 ± 0,06 (203,43)	0,0736
Estreitamento de base	0	0	0,5
Cauda dupla	0,36 ± 0,09 (164,45)	0,11 ± 0,03 (193,81)	<b>0,0324</b>
Cauda enrolada	1,79 ± 0,23 (84,15)	2,93 ± 0,44 (97,94)	0,1669
Cabeça solta	9,18 ± 0,98 (69,45)	10,46 ± 1,13 (69,71)	0,3605
Cabeça + peça intermediária	0,21 ± 0,07 (213,37)	0	<b>0,0012</b>
Grânulo no acrossoma	0,54 ± 0,16 (200,28)	0,54 ± 0,14 (165,42)	0,4276
Vacúolo no acrossoma	2,71 ± 0,35 (84,18)	2,96 ± 0,31 (68,43)	0,2
Cauda fortemente dobrada	8,89 ± 1,05 (76,53)	9,75 ± 0,71 (47,28)	0,1497
Cauda fortemente enrolada	5,29 ± 0,67 (81,78)	8,07 ± 1,05 (84,74)	0,0874
Gota citoplasmática distal	4,21 ± 0,52 (80,52)	1,39 ± 0,33 (152,41)	<b>&lt;0,0001</b>
Gota citoplasmática proximal	0,14 ± 0,05 (208,65)	0,18 ± 0,06 (229,91)	0,4801
Cauda dobrada ou enrolada com gota	0,29 ± 0,1 (219,13)	0,32 ± 0,09 (174,58)	0,2826
Cabeça gigante	0,36 ± 0,09 (164,45)	0,43 ± 0,08 (125,10)	0,1020
Cabeça delgada	0,32 ± 0,1 (202,74)	0,25 ± 0,07 (183,46)	0,3779

## 5.6 Experimento 6: Avaliação do efeito de 3 protocolos de congelação de sêmen de *Callithrix jacchus* nas características seminais

As análises dos resultados obtidos nas avaliações da motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, percentual de espermatozóides com defeitos maiores e menores e percentual de espermatozóides normais demonstraram haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre estas variáveis antes da congelação e após a descongelação no sêmen congelado pelo Protocolo 1. Os resultados podem ser verificados no gráfico 7 e na tabela 10.

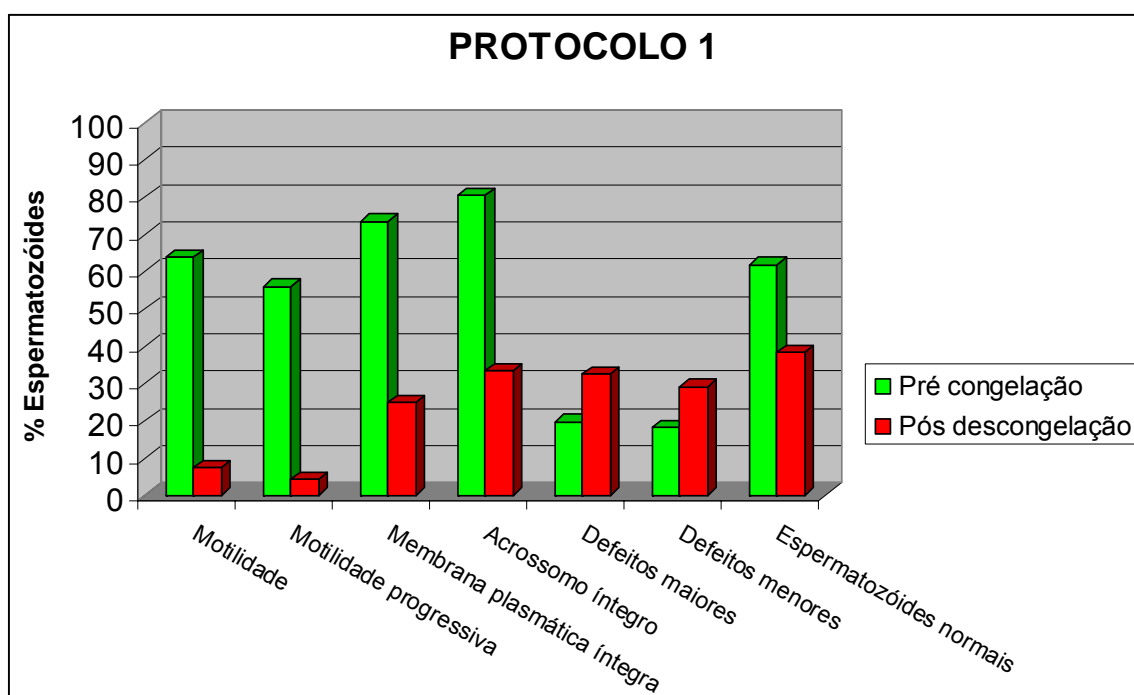


Gráfico 7 – Características seminais de *Callithrix jacchus* congelados pelo Protocolo 1 antes da congelação e após a descongelação

Tabela 10 – Características seminais de *Callithrix jacchus* antes da congelação pelo Protocolo 1 e após a descongelação

<b>PROCOLO 1</b>			
<b>Característica (%)</b>	<b>Pré congelação Média ± EPM (CV)</b>	<b>Pós descongelação Média ± EPM (CV)</b>	<b>p</b>
Motilidade	63,93 ± 7,21 (42,19)	7,38 ± 2,14 (104,68 )	<b>&lt;0,0001</b>
Motilidade progressiva	56,07 ± 7,13 (47,60)	4,23 ± 1,45 (123,25 )	<b>&lt;0,0001</b>
Membrana plasmática íntegra	73,54 ± 3,70 (18,82)	24,96 ± 2,75 (39,66 )	<b>&lt;0,0001</b>
Acrossomo íntegro	80,61 ± 2,81 (13,06)	33,38 ± 4,19 (45,30 )	<b>&lt;0,0001</b>
Defeitos maiores	19,82 ± 2,97 (55,99)	32,61 ± 4,01 (44,36 )	<b>0,0158</b>
Defeitos menores	18,25 ± 2,64 (54,08)	29,11 ± 4,22 (52,30)	<b>0,0167</b>
Espermatozóides normais	61,93 ± 5,37 (32,47)	38,31 ± 5,40 (50,78 )	<b>0,0048</b>

A análise da morfologia espermática para o Protocolo 1 demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as variáveis cauda enrolada, grânulo no acrossoma, vacúolo no acrossoma, cauda fortemente dobrada, cauda fortemente enrolada, gota citoplasmática distal e cauda dobrada ou enrolada com gota. Os resultados estão apresentados na tabela 11. Nas figuras 20a e 20b podem ser verificados exemplos de espermatozóides corados com Spermac<sup>®</sup>, espermatozóide com região acrossomal verde escuro representam acrossomo íntegro e verde claro acrossomo não íntegro.

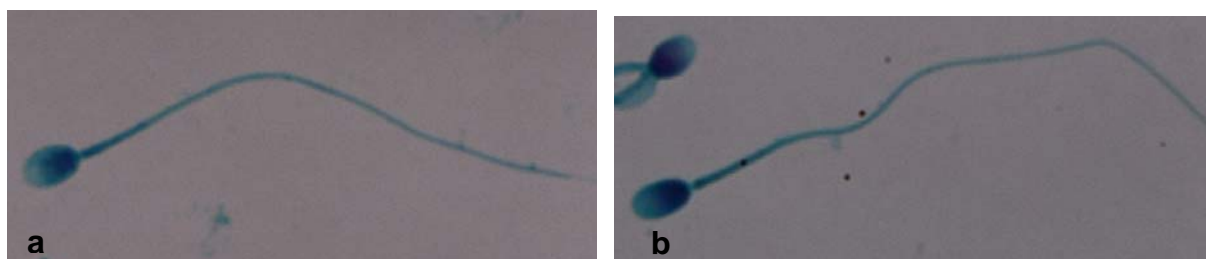


Figura 20 – Fotomicrografia de espermatozóides corados com Spermac<sup>®</sup>, (a) espermatozóide com acrossomo não íntegro e (b) com acrossomo íntegro, em microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo

Tabela 11 – Características espermáticas morfológicas de *Callithrix jacchus* antes da congelação pelo Protocolo 1 e após a descongelação

<b>Protocolo 1</b>			
<b>Característica (%)</b>	<b>Pré congelação Média ± EPM (CV)</b>	<b>Pós descongelação Média ± EPM (CV)</b>	<b>p</b>
Cabeça subdesenvolvida	0,5 ± 0,16 (117,67)	0,42 ± 0,16 (135,15)	0,3447
Cabeça dupla	0	0	0,5
Piriforme	0,18 ± 0,10 (208,58)	0	0,0515
Estreitamento de base	0	0	0,5
Cauda dupla	0,11 ± 0,06 (198,71)	0	0,0512
Cauda enrolada	2,93 ± 0,79 (100,42)	14,88 ± 2,72 (66,01)	<b>0,0005</b>
Cabeça solta	10,46 ± 2,00 (71,47)	12,88 ± 2,88 (80,64)	0,3593
Cabeça + peça intermediária	0	0	0,5
Grânulo no acrossoma	0,54 ± 0,24 (169,60)	0	<b>0,0151</b>
Vacúolo no acrossoma	2,96 ± 0,56 (70,16)	0,85 ± 0,29 (123,91)	<b>0,0024</b>
Cauda fortemente dobrada	9,75 ± 1,26 (48,47)	17,61 ± 2,41 (49,31)	<b>0,0085</b>
Cauda fortemente enrolada	8,07 ± 1,87 (86,89)	14,54 ± 2,93 (72,61)	<b>0,0346</b>
Gota citoplasmática distal	1,39 ± 0,58 (156,27)	0,08 ± 0,05 (244,10)	<b>0,0234</b>
Gota citoplasmática proximal	0,18 ± 0,11 (235,73)	0,08 ± 0,09 (360,55)	0,1874
Cauda dobrada ou enrolada com gota	0,32 ± 0,15 (179,00)	0	<b>0,0279</b>
Cabeça gigante	0,43 ± 0,15 (128,27)	0,15 ± 0,09 (204,89)	0,0772
Cabeça delgada	0,25 ± 0,13 (188,11)	0,23 ± 0,12 (190,03)	0,4256

A análise dos resultados obtidos para as variáveis motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, percentual de espermatozóides com defeitos maiores e menores e percentual de espermatozóides normais demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) antes da congelação e após a descongelação no sêmen congelado pelo Protocolo 2. Os resultados podem ser verificados no gráfico 8 e na tabela 12.



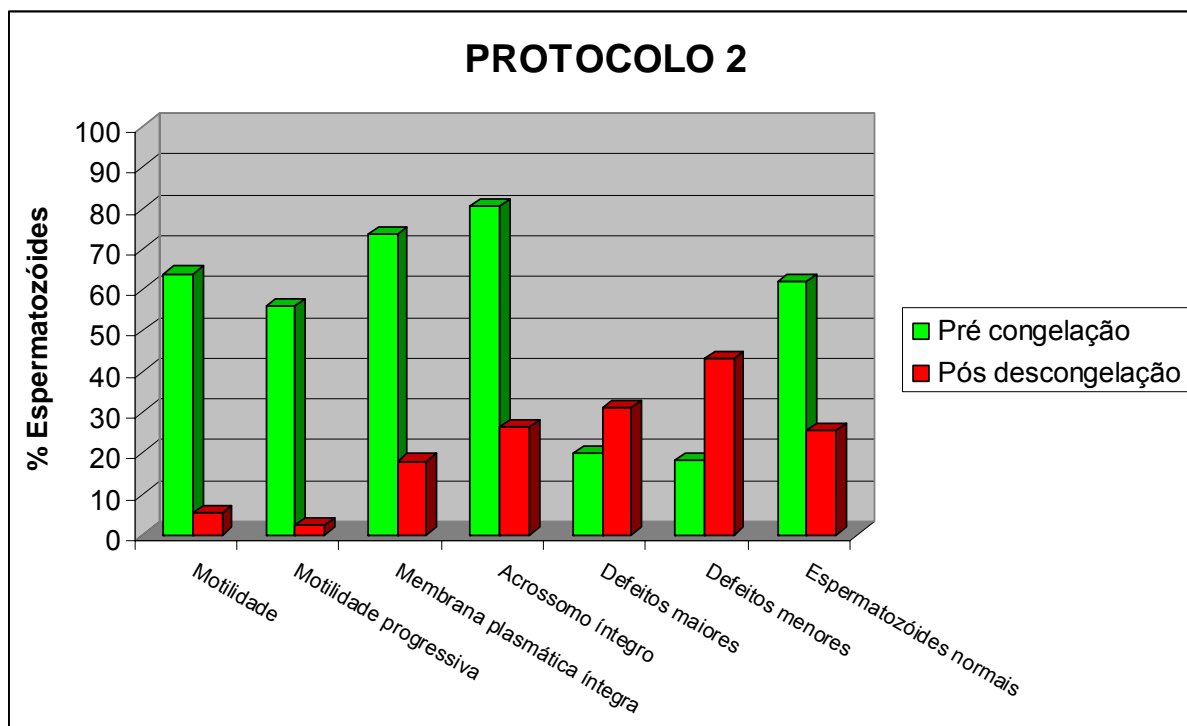


Gráfico 8 – Características seminais de *Callithrix jacchus* congelados pelo Protocolo 2 antes da congelação e após a descongelação

Tabela 12 - Características seminais de *Callithrix jacchus* antes da congelação pelo Protocolo 2 e após a descongelação

**PROTOCOLO 2**

Característica (%)	Pré congelação Média ± EPM (CV)	Pós descongelação Média ± EPM (CV)	p
Motilidade	63,93 ± 7,21 (42,19)	5,38 ± 1,70 (114,11)	<0,0001
Motilidade progressiva	56,07 ± 7,13 (47,60)	2,46 ± 0,84 (123,68)	<0,0001
Membrana plasmática íntegra	73,54 ± 3,70 (18,82)	18,00 ± 3,26 (65,33)	<0,0001
Acrossomo íntegro	80,61 ± 2,81 (13,06)	26,38 ± 3,44 (46,99)	<0,0001
Defeitos maiores	19,82 ± 2,97 (55,99)	31,19 ± 2,69 (31,10)	0,0092
Defeitos menores	18,25 ± 2,64 (54,08)	43,27 ± 3,40 (28,37)	0,0089
Espermatozóides normais	61,93 ± 5,37 (32,47)	25,58 ± 2,11 (29,78)	<0,0001

A análise da morfologia espermática para o Protocolo 2 demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as variáveis cauda enrolada, cabeça com peça

intermediária sem cauda, grânulo no acrossoma, vacúolo no acrossoma, cauda fortemente dobrada, cauda fortemente enrolada, gota citoplasmática distal, cauda dobrada ou enrolada com gota e cabeça gigante. Os resultados estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Características espermáticas morfológicas de *Callithrix jacchus* antes da congelação pelo Protocolo 2 e após a descongelação

<b>PROTOCOLO 2</b>			
<b>Característica (%)</b>	<b>Pré congelação Média ± EPM (CV)</b>	<b>Pós descongelação Média ± EPM (CV)</b>	<b>p</b>
Cabeça subdesenvolvida	0,5 ± 0,16 (117,67)	0,31 ± 0,16 (193,85 )	0,1603
Cabeça dupla	0	0,04 ± 0,04 (360,55 )	0,1721
Piriforme	0,18 ± 0,10 (208,58)	0,11 ± 0,08 (259,63 )	0,3482
Estreitamento de base	0	0	0,5
Cauda dupla	0,11 ± 0,06 (198,71)	0	0,0512
Cauda enrolada	2,93 ± 0,79 (100,42)	26,11 ± 4,01 (55,35 )	<b>0,0002</b>
Cabeça solta	10,46 ± 2,00 (71,47)	15,50 ± 2,24 (52,15 )	0,0691
Cabeça + peça intermediária	0	0,31 ± 0,16 (193,85 )	<b>0,0399</b>
Grânulo no acrossoma	0,54 ± 0,24 (169,60)	0,04 ± 0,04 (360,55 )	<b>0,0417</b>
Vacúolo no acrossoma	2,96 ± 0,56 (70,16)	1,00 ± 0,25 (88,97)	<b>0,0054</b>
Cauda fortemente dobrada	9,75 ± 1,26 (48,47)	14,81 ± 2,16 (52,59)	<b>0,0399</b>
Cauda fortemente enrolada	8,07 ± 1,87 (86,89)	15,58 ± 2,07 (47,88 )	<b>0,0131</b>
Gota citoplasmática distal	1,39 ± 0,58 (156,27)	0,04 ± 0,04 (360,55)	<b>0,0110</b>
Gota citoplasmática proximal	0,18 ± 0,11 (235,73)	0,19 ± 0,11 (199,67)	0,4605
Cauda dobrada ou enrolada com gota	0,32 ± 0,15 (179,00)	0	<b>0,0279</b>
Cabeça gigante	0,43 ± 0,15 (128,27)	0,11 ± 0,08 (259,63 )	<b>0,0393</b>
Cabeça delgada	0,25 ± 0,13 (188,11)	0,31 ± 0,17 (204,89 )	0,4627

Para o Protocolo 3, os resultados obtidos para as variáveis motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade

acrossomal, percentual de espermatozoides com defeitos maiores e menores e percentual de espermatozoides normais demonstraram haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) antes da congelação e após a descongelação no sêmen congelado. Os resultados podem ser verificados no gráfico 9 e na tabela 14.

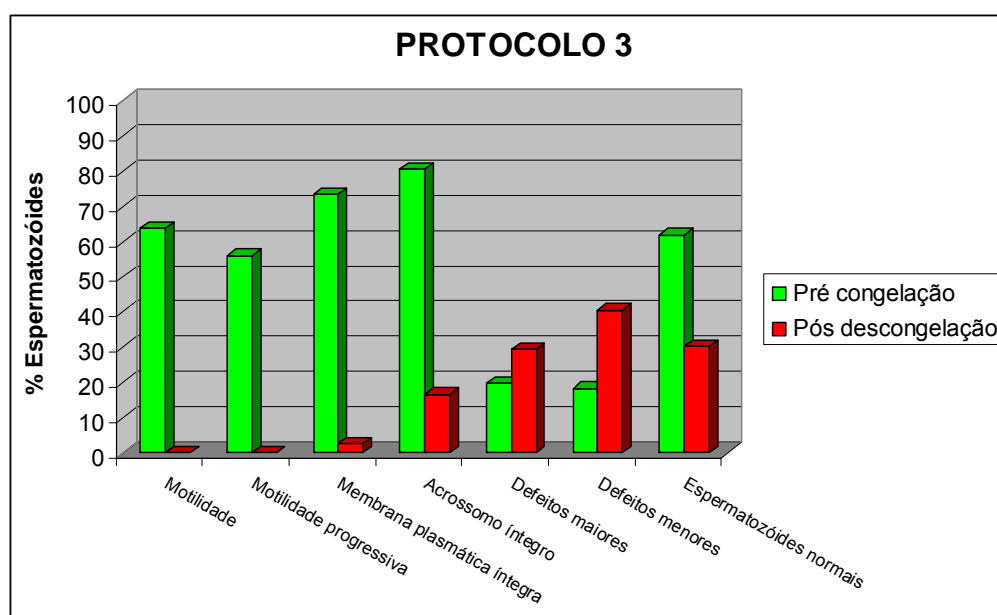


Gráfico 9 – Características seminais de *Callithrix jacchus* congelados pelo Protocolo 3 antes da congelação e após a descongelação

Tabela 14 - Características seminais de *Callithrix jacchus* antes da congelação pelo Protocolo 3 e após a descongelação

PROTOCOLO 3			
Característica (%)	Pré congelação Média ± EPM (CV)	Pós descongelação Média ± EPM (CV)	p
Motilidade	63,93 ± 7,21 (42,19)	0	<0,0001
Motilidade progressiva	56,07 ± 7,13 (47,60)	0	<0,0001
Membrana plasmática íntegra	73,54 ± 3,70 (18,82)	2,50 ± 2,15 (297,63)	<0,0001
Acrossomo íntegro	80,61 ± 2,81 (13,06)	16,58 ± 2,73 (57,13)	<0,0001
Defeitos maiores	19,82 ± 2,97 (55,99)	29,29 ± 3,19 (37,77)	0,0399
Defeitos menores	18,25 ± 2,64 (54,08)	40,58 ± 4,06 (34,66)	0,0337
Espermatozoides normais	61,93 ± 5,37 (32,47)	30,17 ± 2,90 (33,30)	<0,0001

A análise das patologias específicas para o Protocolo 3 demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as variáveis cauda enrolada, vacúolo no acrossoma, cauda fortemente dobrada, gota citoplasmática distal, cauda dobrada ou enrolada com gota e cabeça gigante. Os resultados estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15 - Características espermáticas morfológicas de *Callithrix jacchus* antes da congelação pelo Protocolo 3 e após a descongelação

<b>PROTOCOLO 3</b>			
<b>Característica (%)</b>	<b>Pré congelação Média ± EPM (CV)</b>	<b>Pós descongelação Média ± EPM (CV)</b>	<b>p</b>
Cabeça subdesenvolvida	0,5 ± 0,16 (117,67)	0,21 ± 0,10 (160,45)	0,1190
Cabeça dupla	0	0,08 ± 0,08 (346,41)	0,1627
Piriforme	0,18 ± 0,10 (208,58)	0	0,0586
Estreitamento de base	0	0	0,5000
Cauda dupla	0,11 ± 0,06 (198,71)	0,08 ± 0,08 (346,41)	0,2336
Cauda enrolada	2,93 ± 0,79 (100,42)	23,92 ± 4,22 (61,11)	<b>0,0002</b>
Cabeça solta	10,46 ± 2,00 (71,47)	15,58 ± 2,65 (58,91)	0,0965
Cabeça + peça intermediária	0	0	0,5000
Grânulo no acrossoma	0,54 ± 0,24 (169,60)	0,17 ± 0,17 (346,41)	0,0779
Vacúolo no acrossoma	2,96 ± 0,56 (70,16)	0,87 ± 0,34 (133,73)	<b>0,0035</b>
Cauda fortemente dobrada	9,75 ± 1,26 (48,47)	17,37 ± 1,46 (29,12)	<b>0,0019</b>
Cauda fortemente enrolada	8,07 ± 1,87 (86,89)	11,50 ± 2,18 (65,55)	0,1238
Gota citoplasmática distal	1,39 ± 0,58 (156,27)	0	<b>0,0057</b>
Gota citoplasmática proximal	0,18 ± 0,11 (235,73)	0	0,0586
Cauda dobrada ou enrolada com gota	0,32 ± 0,15 (179,00)	0	<b>0,0328</b>
Cabeça gigante	0,43 ± 0,15 (128,27)	0	<b>0,0056</b>
Cabeça delgada	0,25 ± 0,13 (188,11)	0,08 ± 0,08 (346,41)	0,1213

A avaliação do efeito da congelação na média de todos os protocolos demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) antes da congelação e após a

descongelamento do sêmen para as variáveis motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, percentual de espermatozoides com defeitos maiores e menores e percentual de espermatozoides normais. Os resultados podem ser verificados no gráfico 10 e na tabela 16.

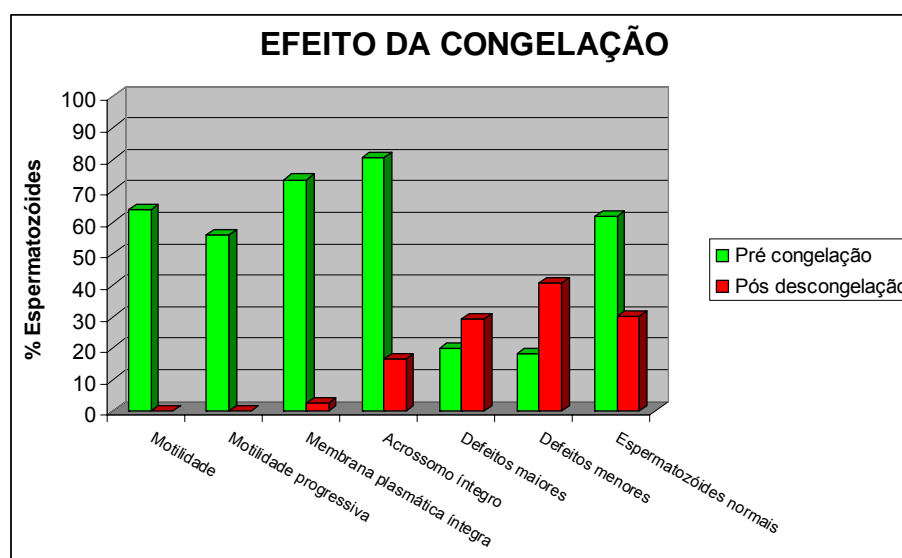


Gráfico 10 – Características seminais de *Callithrix jacchus* antes da congelamento e após a descongelamento com a média dos protocolos 1, 2 e 3

Tabela 16 - Características seminais de *Callithrix jacchus* antes da congelamento e das médias dos protocolos 1, 2 e 3 após a descongelamento

MÉDIA DOS PROTOCOLOS			
Característica (%)	Pré congelamento Média ± EPM (CV)	Pós descongelamento Média ± EPM (CV)	p
Motilidade	63,93 ± 7,21 (42,19)	0	<0,0001
Motilidade progressiva	56,07 ± 7,13 (47,60)	0	<0,0001
Membrana plasmática íntegra	73,54 ± 3,70 (18,82)	2,50 ± 2,15 (297,63)	<0,0001
Acrossomo íntegro	80,61 ± 2,81 (13,06)	16,58 ± 2,73 (57,13)	<0,0001
Defeitos maiores	19,82 ± 2,97 (55,99)	29,29 ± 3,19 (37,77)	0,0399
Defeitos menores	18,25 ± 2,64 (54,08)	40,58 ± 4,06 (34,66)	0,0337
Espermatozoides normais	61,93 ± 5,37 (32,47)	30,17 ± 2,90 (33,30)	<0,0001

Gráfico 10 corrigido:

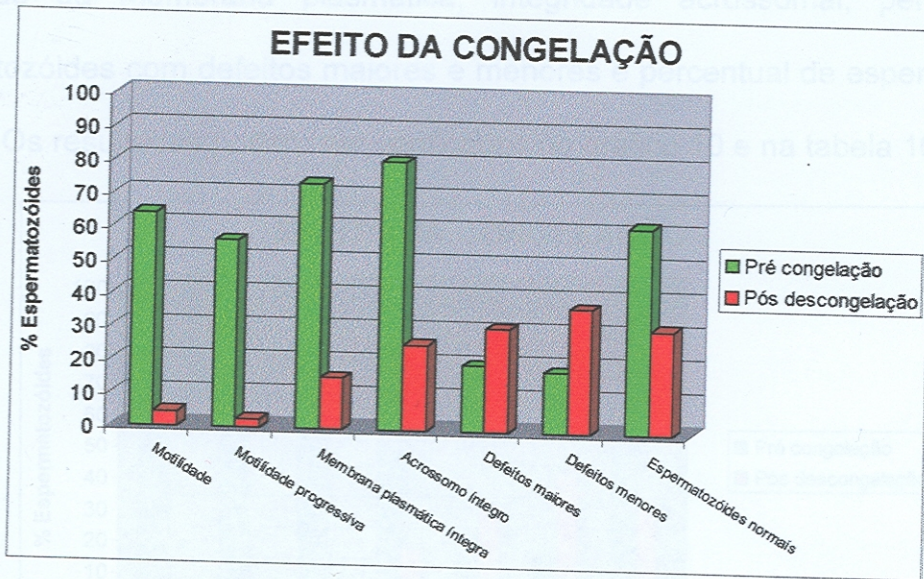


Gráfico 10 – Características seminais de *Callithrix jacchus* antes da congelção e após a descongelção com a média dos protocolos 1, 2 e 3

Tabela 16 corrigida:

Tabela 16 - Características seminais de *Callithrix jacchus* antes da congelção e das médias dos protocolos 1, 2 e 3 após a descongelção

### MÉDIA DOS PROTOCOLOS

Característica (%)	Pré congelção Média ± EPM (CV)	Pós descongelção Média ± EPM (CV)	p
Motilidade	63,93 ± 7,21 (42,19)	4,37 ± 1,04 (147,24)	<0,0001
Motilidade progressiva	56,07 ± 7,13 (47,60)	2,29 ± 0,62 (168,37)	<0,0001
Membrana plasmática íntegra	73,54 ± 3,70 (18,82)	15,49 ± 2,19 (87,01)	<0,0001
Acrossomo íntegro	80,61 ± 2,81 (13,06)	25,68 ± 2,28 (54,87)	<0,0001
Defeitos maiores	19,82 ± 2,97 (55,99)	31,08 ± 1,90 (37,62)	<0,0001
Defeitos menores	18,25 ± 2,64 (54,08)	37,58 ± 2,42 (39,68)	<0,0001
Espermatozoides normais	61,93 ± 5,37 (32,47)	31,38 ± 2,30 (45,15)	<0,0001

A análise da morfologia espermática para o efeito da congelação demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as variáveis cauda enrolada, vacúolo no acrossoma, cauda fortemente dobrada, gota citoplasmática distal, cauda dobrada ou enrolada com gota e cabeça gigante. Os resultados estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 - Características espermáticas morfológicas de *Callithrix jacchus* antes da congelação e das médias dos protocolos 1, 2 e 3 após a descongelação

<b>MÉDIA DOS PROTOCOLOS</b>			
<b>Característica (%)</b>	<b>Pré congelação Média ± EPM (CV)</b>	<b>Pós descongelação Média ± EPM (CV)</b>	<b>p</b>
Cabeça subdesenvolvida	0,5 ± 0,16 (117,67)	0,21 ± 0,10 (160,45)	0,1190
Cabeça dupla	0	0,08 ± 0,08 (346,41)	0,1627
Piriforme	0,18 ± 0,10 (208,58)	0	0,0586
Cauda dupla	0,11 ± 0,06 (198,71)	0,08 ± 0,08 (346,41)	0,2336
Cauda enrolada	2,93 ± 0,79 (100,42)	23,92 ± 4,22 (61,11)	<b>0,0002</b>
Cabeça solta	10,46 ± 2,00 (71,47)	15,58 ± 2,65 (58,91)	0,0965
Cabeça + peça intermediária	0	0	0,5000
Grânulo no acrossoma	0,54 ± 0,24 (169,60)	0,17 ± 0,17 (346,41)	0,0779
Vacúolo no acrossoma	2,96 ± 0,56 (70,16)	0,87 ± 0,34 (133,73)	<b>0,0035</b>
Cauda fortemente dobrada	9,75 ± 1,26 (48,47)	17,37 ± 1,46 (29,12)	<b>0,0019</b>
Cauda fortemente enrolada	8,07 ± 1,87 (86,89)	11,50 ± 2,18 (65,55)	0,1238
Gota citoplasmática distal	1,39 ± 0,58 (156,27)	0	<b>0,0057</b>
Gota citoplasmática proximal	0,18 ± 0,11 (235,73)	0	0,0586
Cauda dobrada ou enrolada com gota	0,32 ± 0,15 (179,00)	0	<b>0,0328</b>
Cabeça gigante	0,43 ± 0,15 (128,27)	0	<b>0,0056</b>
Cabeça delgada	0,25 ± 0,13 (188,11)	0,08 ± 0,08 (346,41)	0,1213

Tabela 17 corrigida:

Tabela 17 - Características espermáticas morfológicas de *Callithrix jacchus* antes da congelação e das médias dos protocolos 1, 2 e 3 após a descongelação

## MÉDIA DOS PROTOCOLOS

Característica (%)	Pré congelação Média ± EPM (CV)	Pós descongelação Média ± EPM (CV)	P
Cabeça subdesenvolvida	0,5 ± 0,16 (117,67)	0,32 ± 0,08 (162,23)	0,0612
Cabeça dupla	0	0,04 ± 0,03 (454,47)	0,0716
Piriforme	0,18 ± 0,10 (208,58)	0,04 ± 0,03 (454,47)	0,0197
Cauda dupla	0,11 ± 0,06 (198,71)	0,03 ± 0,03 (616,44)	0,0085
Cauda enrolada	2,93 ± 0,79 (100,42)	21,58 ± 2,22 (63,43)	<0,0001
Cabeça solta	10,46 ± 2,00 (71,47)	14,63 ± 1,48 (62,22)	0,0293
Cabeça + peça intermediária	0	0,10 ± 0,06 (351,97)	0,0355
Grânulo no acrossoma	0,54 ± 0,24 (169,60)	0,07 ± 0,05 (505,09)	0,0008
Vacúolo no acrossoma	2,96 ± 0,56 (70,16)	0,91 ± 0,16 (111,52)	<0,0001
Cauda fortemente dobrada	9,75 ± 1,26 (48,47)	16,58 ± 1,19 (44,09)	<0,0001
Cauda fortemente enrolada	8,07 ± 1,87 (86,89)	13,93 ± 1,40 (61,76)	0,0009
Gota citoplasmática distal	1,39 ± 0,58 (156,27)	0,04 ± 0,02 (346,15)	<0,0001
Gota citoplasmática proximal	0,18 ± 0,11 (235,73)	0,09 ± 0,05 (305,40)	0,1069
Cauda dobrada ou enrolada com gota	0,32 ± 0,15 (179,00)	0	0,0003
Cabeça gigante	0,43 ± 0,15 (128,27)	0,09 ± 0,04 (278,10)	0,0004
Cabeça delgada	0,25 ± 0,13 (188,11)	0,21 ± 0,08 (225,19)	0,1997



A avaliação do efeito do protocolo na congelação demonstrou haver diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) entre os protocolos após a descongelação do sêmen. Os valores da média, erro padrão da média e coeficiente de variação de cada protocolo para as variáveis motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, percentual de espermatozóides com defeitos maiores e menores e percentual de espermatozóides normais, e as diferenças encontradas podem ser verificados no gráfico 11 e na tabela 18.

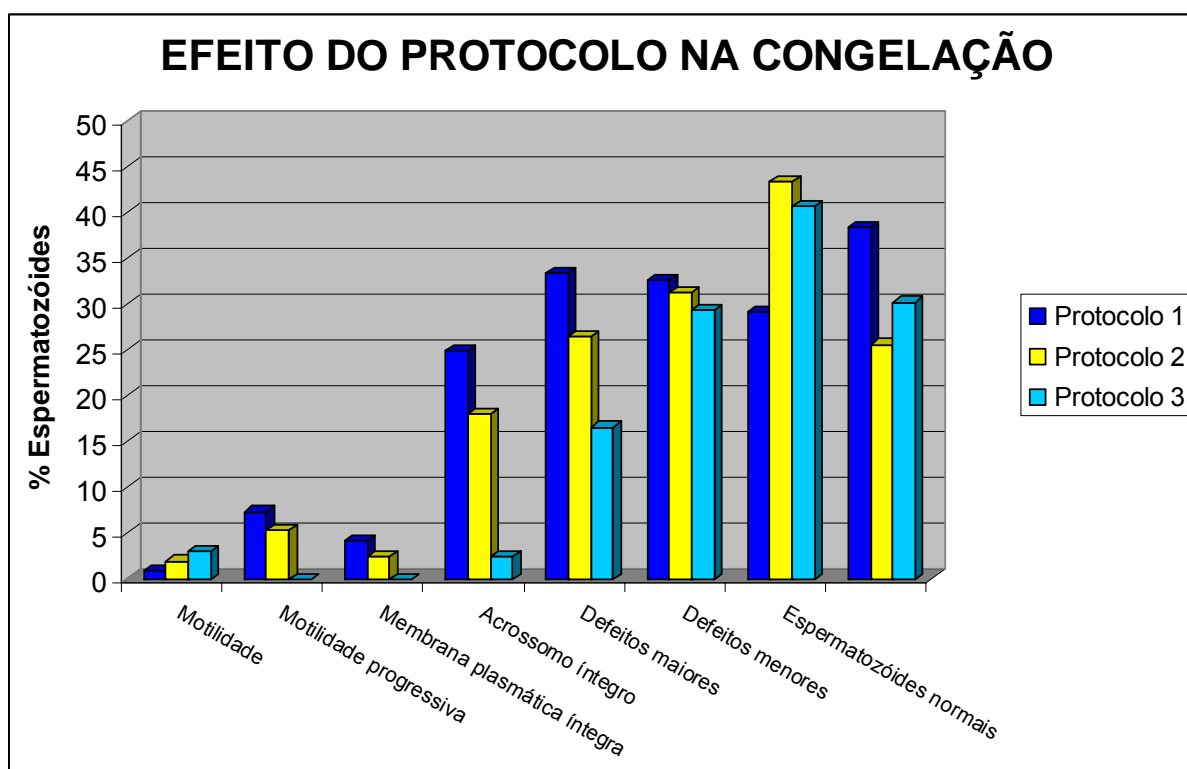


Gráfico 11 – Características seminais de *Callithrix jacchus* após a descongelação de sêmen congelado pelos protocolos 1, 2 e 3

Gráfico 11 corrigido:

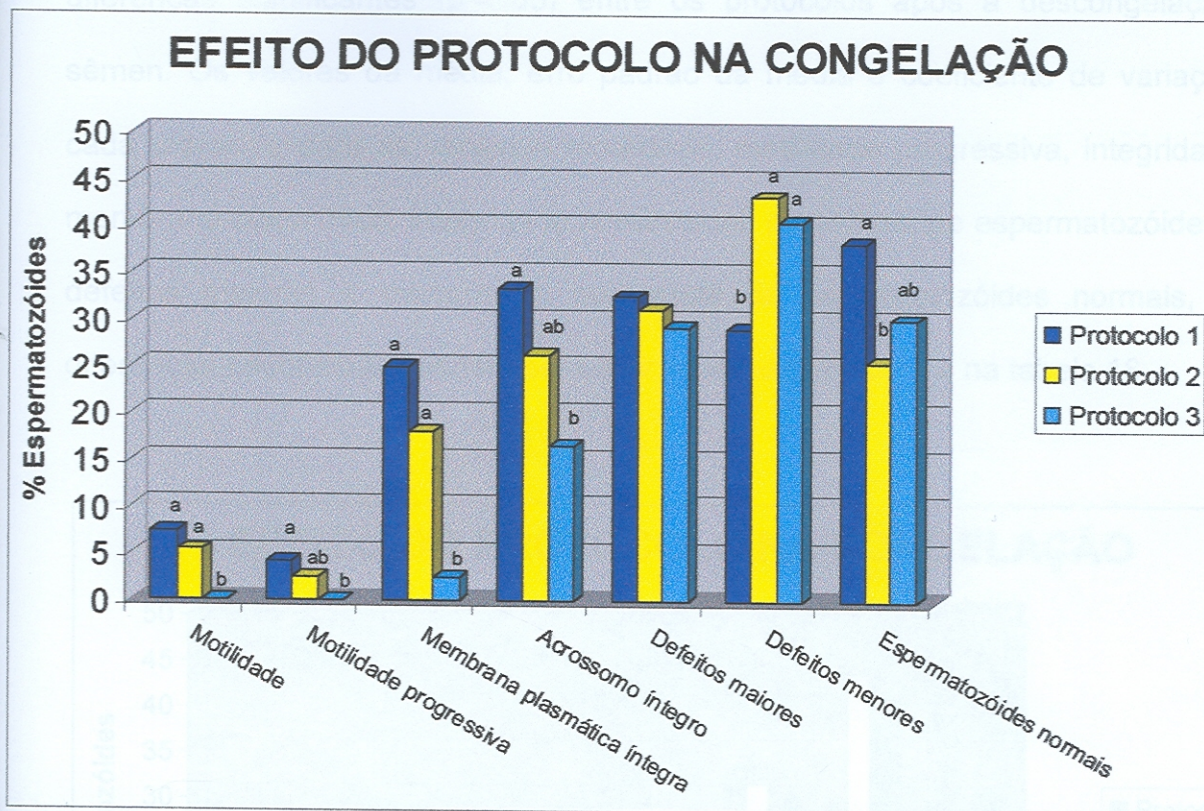


Gráfico 11 – Características seminais de *Callithrix jacchus* após a descongelação de sêmen congelado pelos protocolos 1, 2 e 3

<sup>ab</sup> Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) entre os protocolos em cada variável

Gráfico 11 – Características seminais de *Callithrix jacchus* após a descongelação de sêmen congelado pelos protocolos 1, 2 e 3

Tabela 18 – Características seminais de *Callithrix jacchus* após a descongelação de sêmen congelado pelos protocolos 1, 2 e 3

Característica (%)	PROTOCOLO		
	1 Média ± EPM (CV)	2 Média ± EPM (CV)	3 Média ± EPM (CV)
Motilidade	7,38 ± 2,14 (104,68) <sup>a</sup>	5,38 ± 1,70 (114,11) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Motilidade progressiva	4,23 ± 1,45 (123,25) <sup>a</sup>	2,46 ± 0,84 (123,68) <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>
Membrana plasmática íntegra	24,96 ± 2,75 (39,66) <sup>a</sup>	18,00 ± 3,26 (65,33) <sup>a</sup>	2,50 ± 2,15 (297,63) <sup>b</sup>
Acrossomo íntegro	33,38 ± 4,19 (45,30) <sup>a</sup>	26,38 ± 3,44 (46,99) <sup>ab</sup>	16,58 ± 2,73 (57,13) <sup>b</sup>
Defeitos maiores	32,61 ± 4,01 (44,36)	31,19 ± 2,69 (31,10)	29,29 ± 3,19 (37,77)
Defeitos menores	29,11 ± 4,22 (52,30) <sup>b</sup>	43,27 ± 3,40 (28,37) <sup>a</sup>	40,58 ± 4,06 (34,66) <sup>a</sup>
Espermatozóides normais	38,31 ± 5,40 (50,78) <sup>a</sup>	25,58 ± 2,11 (29,78) <sup>b</sup>	30,17 ± 2,90 (33,30) <sup>ab</sup>

<sup>ab</sup> Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) na mesma linha.

A análise da morfologia espermática para o efeito do protocolo utilizado na congelação demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os protocolos para as variáveis cauda enrolada e cabeça com peça intermediária sem cauda. Os resultados estão apresentados na tabela 19.

Tabela 19 - Características espermáticas morfológicas de *Callithrix jacchus* após a descongelação de sêmen congelado pelos protocolos 1, 2 e 3

Característica (%)	PROTOCOLO		
	1 Média ± EPM (CV)	2 Média ± EPM (CV)	3 Média ± EPM (CV)
Cabeça subdesenvolvida	0,42 ± 0,16 (135,15)	0,31 ± 0,16 (193,85)	0,21 ± 0,10 (160,45)
Cabeça dupla	0	0,04 ± 0,04 (360,55)	0,08 ± 0,08 (346,41)
Piriforme	0	0,11 ± 0,08 (259,63)	0
Cauda dupla	0	0	0,08 ± 0,08 (346,41)
Cauda enrolada	14,88 ± 2,72 (66,01) <sup>b</sup>	26,11 ± 4,01 (55,35) <sup>a</sup>	23,92 ± 4,22 (61,11) <sup>ab</sup>
Cabeça solta	12,88 ± 2,88 (80,64)	15,50 ± 2,24 (52,15)	15,58 ± 2,65 (58,91)
Cabeça + peça intermediária	0 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,16 (193,85) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Grânulo no acrossoma	0	0,04 ± 0,04 (360,55)	0,17 ± 0,17 (346,41)
Vacúolo no acrossoma	0,85 ± 0,29 (123,91)	1,00 ± 0,25 (88,97)	0,87 ± 0,34 (133,73)
Cauda fortemente dobrada	17,61 ± 2,41 (49,31)	14,81 ± 2,16 (52,59)	17,37 ± 1,46 (29,12)
Cauda fortemente enrolada	14,54 ± 2,93 (72,61)	15,58 ± 2,07 (47,88)	11,50 ± 2,18 (65,55)
Gota citoplasmática distal	0,08 ± 0,05 (244,10)	0,04 ± 0,04 (360,55)	0
Gota citoplasmática proximal	0,08 ± 0,09 (360,55)	0,19 ± 0,11 (199,67)	0
Cauda dobrada ou enrolada com gota	0	0	0
Cabeça gigante	0,15 ± 0,09 (204,89)	0,11 ± 0,08 (259,63)	0
Cabeça delgada	0,23 ± 0,12 (190,03)	0,31 ± 0,17 (204,89)	0,08 ± 0,08 (346,41)

Os valores da média, erro padrão da média e coeficiente de variação de cada protocolo em cada tempo pós-descongelação para a variável motilidade e as diferenças encontradas entre os protocolos podem ser verificados na tabela 20.

Tabela 20 – Percentual de espermatozoides móveis no sêmen de *Callithrix jacchus* congelado pelos protocolos 1, 2 e 3, nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelação

		PROTOCOLO		
Característica (%)	Tempo após descongelação	1 Média ± EPM (CV)	2 Média ± EPM (CV)	3 Média ± EPM (CV)
<b>Motilidade</b>	1 hora	7,69 ± 2,44 (114,61) <sup>aA</sup>	6,77 ± 2,57 (137,02) <sup>aA</sup>	0 <sup>b</sup>
	2 horas	4,00 ± 1,28 (115,47) <sup>aAB</sup>	3,61 ± 1,61 (161,10) <sup>aAB</sup>	0 <sup>b</sup>
	3 horas	2,31 ± 0,88 (137,47) <sup>aB</sup>	1,77 ± 0,81 (165,04) <sup>abB</sup>	0 <sup>b</sup>
	4 horas	1,92 ± 0,86 (160,92) <sup>aB</sup>	1,08 ± 0,51 (171,48) <sup>abB</sup>	0 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) na mesma linha.

<sup>AB</sup> Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) na mesma coluna.

Os valores da média, erro padrão da média e coeficiente de variação de cada protocolo em cada tempo pós-descongelação para a variável motilidade progressiva e as diferenças encontradas entre os protocolos podem ser verificados na tabela 21.

Tabela 21 - Percentual de espermatozoides com motilidade progressiva no sêmen de *Callithrix jacchus* congelado pelos protocolos 1, 2 e 3, nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelação

		PROTOCOLO		
Característica (%)	Tempo após descongelação	1 Média ± EPM (CV)	2 Média ± EPM (CV)	3 Média ± EPM (CV)
<b>Motilidade progressiva</b>	1 hora	5,38 ± 1,96 (131,22) <sup>aA</sup>	4,54 ± 1,73 (137,49) <sup>aA</sup>	0 <sup>b</sup>
	2 horas	2,46 ± 0,94 (137,38) <sup>AB</sup>	2,54 ± 1,25 (177,36) <sup>AB</sup>	0
	3 horas	1,38 ± 0,52 (136,84) <sup>aB</sup>	1,15 ± 0,52 (161,54) <sup>abB</sup>	0 <sup>b</sup>
	4 horas	1,08 ± 0,54 (179,66) <sup>aB</sup>	0,61 ± 0,29 (169,63) <sup>abB</sup>	0 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) na mesma linha.

<sup>AB</sup> Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) na mesma coluna.

Os valores da média, erro padrão da média e coeficiente de variação de cada protocolo em cada tempo pós-descongelamento para a variável integridade da membrana plasmática e as diferenças encontradas entre os protocolos podem ser verificados na tabela 22.

Tabela 22 - Percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra no sêmen de *Callithrix jacchus* congelado pelos protocolos 1, 2 e 3, nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelamento

		<b>PROTOCOLO</b>		
<b>Característica (%)</b>	<b>Tempo após descongelamento</b>	<b>1</b> Média ± EPM (CV)	<b>2</b> Média ± EPM (CV)	<b>3</b> Média ± EPM (CV)
<b>Membrana plasmática íntegra</b>	1 hora	12,85 ± 2,41 (67,55) <sup>aA</sup>	9,23 ± 2,48 (97,01) <sup>aA</sup>	0,15 ± 0,15 (360,55) <sup>b</sup>
	2 horas	9,00 ± 2,02 (81,02) <sup>aAB</sup>	5,08 ± 1,94 (137,52) <sup>aAB</sup>	0 <sup>b</sup>
	3 horas	5,46 ± 1,45 (95,91) <sup>aB</sup>	2,92 ± 1,18 (146,13) <sup>abB</sup>	0 <sup>b</sup>
	4 horas	3,61 ± 1,66 (165,39) <sup>aB</sup>	2,46 ± 1,02 (149,83) <sup>abB</sup>	0 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) na mesma linha.

<sup>AB</sup> Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) na mesma coluna.

A avaliação do efeito do tempo após a descongelamento na média de todos os protocolos demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos para as variáveis motilidade, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática. Os valores da média, erro padrão da média e coeficiente de variação de cada tempo pós-descongelamento para as variáveis citadas acima e as diferenças encontradas entre os tempos podem ser verificados na tabela 23.

Tabela 23 – Características seminais de *Callithrix jacchus* das médias dos protocolos 1, 2 e 3 nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelação

<b>TEMPO APÓS A DESCONGELAÇÃO</b>				
<b>Características (%)</b>	<b>1 hora</b>	<b>2 horas</b>	<b>3 horas</b>	<b>4 horas</b>
	Média ± EPM (CV)	Média ± EPM (CV)	Média ± EPM (CV)	Média ± EPM (CV)
<b>Motilidade</b>	4,82 ± 1,28 (114,61) <sup>a</sup>	2,54 ± 0,73 (114,61) <sup>b</sup>	1,36 ± 0,42 (137,02) <sup>b</sup>	1,00 ± 0,35 (137,02) <sup>b</sup>
<b>Motilidade progressiva</b>	3,31 ± 0,93 (115,47) <sup>a</sup>	1,67 ± 0,54 (115,47) <sup>b</sup>	0,85 ± 0,26 (161,10) <sup>b</sup>	0,56 ± 0,21 (161,10) <sup>b</sup>
<b>Membrana plasmática íntegra</b>	7,41 ± 1,41 (160,92) <sup>a</sup>	4,69 ± 1,09 (160,92) <sup>ab</sup>	2,79 ± 0,71 (171,48) <sup>b</sup>	2,03 ± 0,68 (171,48) <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) na mesma linha.

A avaliação do efeito do protocolo na média de todos os tempos após a descongelação demonstrou que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os protocolos para as variáveis motilidade, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática. Os valores da média, erro padrão da média e coeficiente de variação de cada protocolo para as variáveis citadas acima e as diferenças encontradas entre os protocolos podem ser verificados na tabela 24.

Tabela 24 – Características seminais de *Callithrix jacchus* dos protocolos 1, 2 e 3 nas médias dos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a descongelação

<b>PROTOCOLO</b>			
<b>Características (%)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
	Média ± EPM (CV)	Média ± EPM (CV)	Média ± EPM (CV)
<b>Motilidade</b>	3,98 ± 0,80 (114,82) <sup>a</sup>	3,31 ± 0,83 (181,35) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>Motilidade progressiva</b>	2,58 ± 0,61 (169,65) <sup>a</sup>	2,21 ± 0,58 (188,33) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>Membrana plasmática íntegra</b>	7,73 ± 1,05 (98,35) <sup>a</sup>	4,92 ± 0,93 (136,46) <sup>b</sup>	0,04 ± 0,04 (721,11) <sup>c</sup>

<sup>abc</sup> Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) na mesma linha.

## 5.7 Experimento 7: Avaliação da atividade citoquímica mitocondrial após a descongelação

Nas figuras 21a (Classe 1), 21b (Classe 2), 21c (Classe 3) e 21d (Classe 4) podem ser verificados espermatozóides corados pelo DAB.

Não foi observada diferença entre os tempos no efeito do protocolo na atividade citoquímica mitocondrial nos dois tempos avaliados. A avaliação do efeito do tempo em cada protocolo demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas na Classe III entre o Protocolo 3 e os protocolos 1 e 2. Os valores da média, erro padrão da média e coeficiente de variação para cada categoria e cada protocolo nos dois tempos avaliados estão demonstrados na tabela 25.

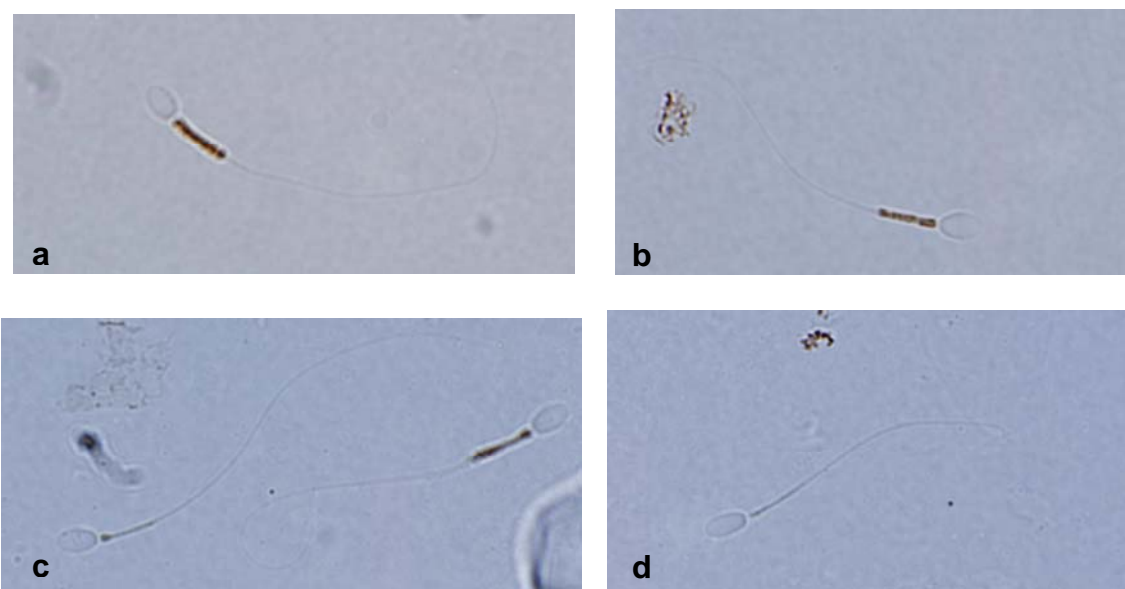


Figura 21 – Fotomicrografia de espermatozóides de *Callithrix jacchus* corados por DAB. (a) Classe I, (b) Classe II, (c) Classe III e (d) Classe IV, em microscopia de luz com campo claro, objetiva 100x sob imersão em óleo



Tabela 25 – Percentual de espermatozoides de *Callithrix jacchus* congelados pelos protocolos 1, 2 e 3, nas classes I, II, III e IV da avaliação da atividade citoquímica mitocondrial 1 e 2 horas após a descongelação

<b>TEMPO APÓS DESCONGELAÇÃO</b>				
<b>Categoria</b>	<b>Protocolo</b>	<b>1 hora Média ± EPM (CV)</b>	<b>2 horas Média ± EPM (CV)</b>	<b>p</b>
<b>Classe I</b>	1	16,75 ± 4,59 (77,55)	19,59 ± 3,27 (47,26)	0,4251
	2	20,71 ± 3,57 (57,14)	29,41 ± 5,84 (65,86)	0,3230
	3	16,83 ± 2,55 (52,41)	25,52 ± 5,88 (79,82)	0,3884
<b>Classe II</b>	1	56,27 ± 4,36 (21,92)	52,75 ± 5,71 (30,64)	0,6324
	2	51,57 ± 4,50 (28,91)	49,36 ± 6,22 (41,81)	0,7768
	3	59,21 ± 3,63 (21,24)	55,34 ± 5,17 (32,36)	0,5468
<b>Classe III</b>	1	13,21 ± 5,16 (110,42)	18,33 ± 6,58 (101,48)	0,4737
	2	17,04 ± 4,49 (87,49)	8,68 ± 2,44 (93,23)	0,1175
	3	13,75 ± 1,92 (48,33)	8,60 ± 1,76 (70,92)	<b>0,0295</b>
<b>Classe IV</b>	1	13,77 ± 1,22 (86,62)	9,33 ± 3,09 (93,64)	0,4097
	2	10,68 ± 2,71 (84,11)	6,00 ± 1,30 (71,88)	0,1349
	3	8,96 ± 1,63 (63,21)	6,35 ± 1,11 (60,84)	0,2012

A avaliação do efeito do tempo na média dos protocolos demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas na Classe IV. Os valores da média, erro padrão da média e coeficiente de variação para cada categoria e cada tempo estão demonstrados na tabela 26.

Tabela 26 - Percentual de espermatozoides de *Callithrix jacchus* das médias dos protocolos 1, 2 e 3, nas classes I, II, III e IV da avaliação da atividade citoquímica mitocondrial 1 e 2 horas após a descongelação

<b>TEMPO APÓS DESCONGELAÇÃO</b>			
<b>Categoria</b>	<b>1 hora Média ± EPM (CV)</b>	<b>2 horas Média ± EPM (CV)</b>	<b>p</b>
<b>Classe I</b>	18,19 ± 1,95 (59,78)	25,37 ± 3,17 (69,64)	0,1187
<b>Classe II</b>	55,74 ± 2,40 (24,00)	52,55 ± 3,25 (34,43)	0,4334
<b>Classe III</b>	14,78 ± 2,15 (80,89)	11,14 ± 2,08 (104,21)	0,1044
<b>Classe IV</b>	10,81 ± 1,56 (80,41)	7,00 ± 1,01 (80,19)	<b>0,0443</b>

Foram encontradas as seguintes correlações com os respectivos valores para **r** e **p**.

A categoria Classe IV da atividade citoquímica mitocondrial apresentou correlação positiva com a variável integridade da membrana plasmática nos tempos 1 ( $r=0,3176$ ,  $p=0,0119$ ) e 2 ( $r=0,26097$ ,  $p=0,0405$ ). A Classe I apresentou correlação negativa com as classes II e III em ambos os tempos, quais sejam: no tempo 1, I e II ( $r=-0,4241$ ,  $p=0,0006$ ) e I e III ( $r=-0,4093$ ,  $p=0,0010$ ); e no tempo 2, I e II ( $r=-0,3851$ ,  $p=0,0020$ ) e I e III ( $r=-0,3633$ ,  $p=0,0037$ ).

## 5.8 Experimento 8: Avaliação da taxa da fragmentação de DNA do espermatozóide após a descongelação

Na figura 22 podem ser verificados espermatozóides corados pelo Ensaio Cometa alcalino.

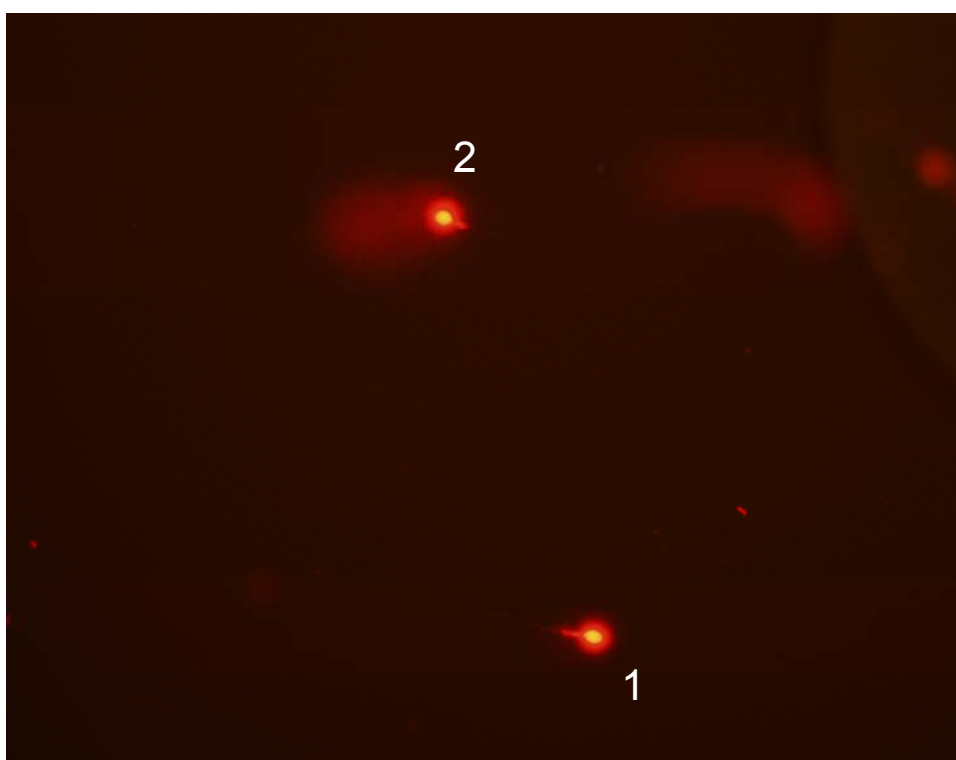


Figura 22 – Fotomicrografia do Ensaio Cometa alcalino em espermatozóides de *Callithrix jacchus* criopreseervados com (1) Classe I e (2) Classe II, em microscopia com módulo de epifluorescência, filtro de excitação 490nm e barreira 590 nm, objetiva 40x

A avaliação do efeito do protocolo de congelação na fragmentação de DNA do espermatozóide demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os protocolos nas classes I, II e IV. Os valores da média, erro padrão da média e coeficiente de variação para cada categoria e cada protocolo estão demonstrados no gráfico 12 e na tabela 27.

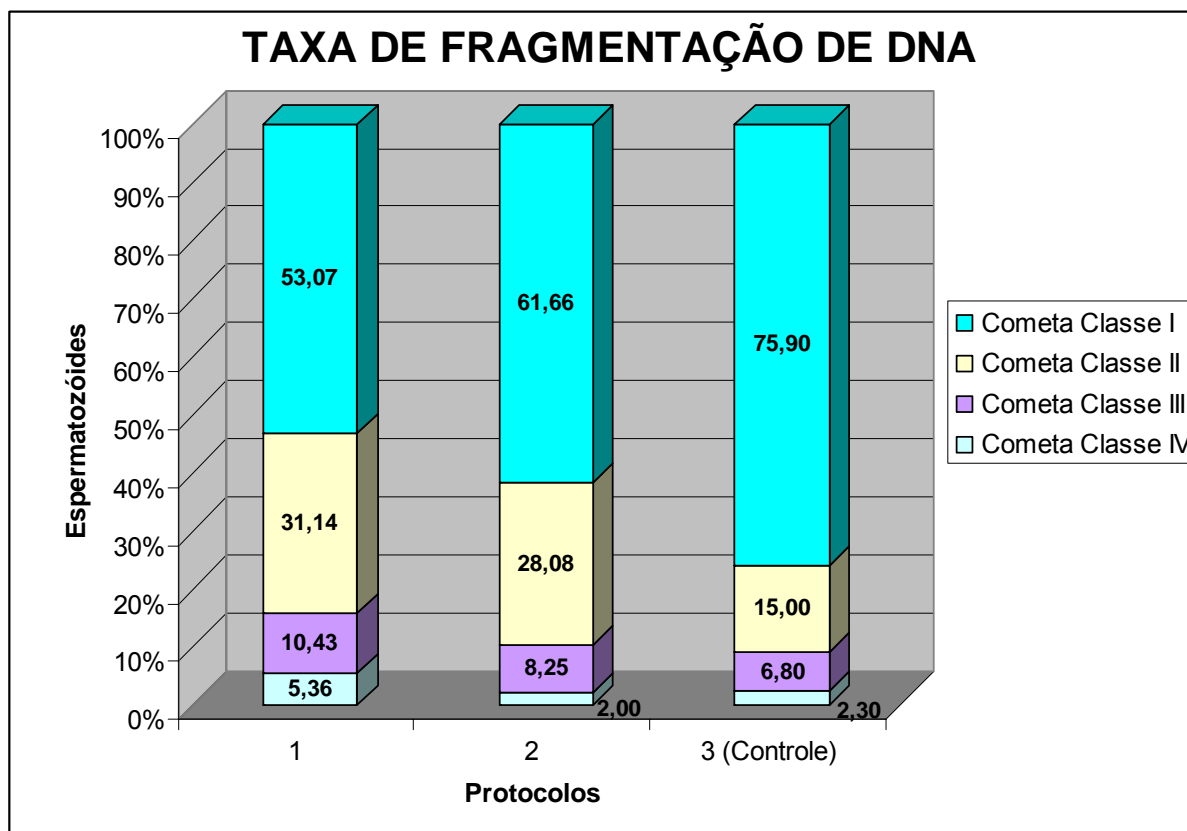


Gráfico 12 – Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* nas classes I (sem fragmentação de DNA), II (pouca fragmentação), III (fragmentação moderada) e IV (DNA altamente fragmentado) em Ensaio Cometa alcalino

Tabela 27 – Percentual de espermatozóides de *Callithrix jacchus* congelados pelos protocolos 1, 2 e 3 nas classes I, II, III e IV da taxa de fragmentação de DNA após a descongelação

<b>PROTOCOLO</b>			
<b>Categoria</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
	<b>Média ± EPM (CV)</b>	<b>Média ± EPM (CV)</b>	<b>Média ± EPM (CV)</b>
<b>Classe I</b>	53,07 ± 6,98 (34,78) <sup>b</sup>	61,66 ± 4,84 (19,24) <sup>ab</sup>	75,90 ± 3,16 (9,31) <sup>a</sup>
<b>Classe II</b>	31,14 ± 5,77 (49,05) <sup>a</sup>	28,08 ± 3,87 (33,73) <sup>a</sup>	15,00 ± 1,83 (27,28) <sup>b</sup>
<b>Classe III</b>	10,43 ± 2,04 (51,82)	8,25 ± 2,07 (61,42)	6,80 ± 2,24 (73,64)
<b>Classe IV</b>	5,36 ± 1,86 (91,72) <sup>a</sup>	2,00 ± 0,41 (50,00) <sup>b</sup>	2,30 ± 0,46 (45,08) <sup>ab</sup>

<sup>ab</sup> Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) na mesma linha.

Foram encontradas correlações negativas para a Classe I com a Classe II ( $r=-0,8758$ ,  $p<0,0001$ ), Classe III ( $r=-0,7377$ ,  $p=0,0017$ ) e integridade da membrana plasmática ( $r=-0,5962$ ,  $p=0,0190$ ).

A Classe II apresentou correlação positiva com a variável motilidade ( $r=0,6694$ ,  $p=0,0063$ ), motilidade progressiva ( $r=0,6394$ ,  $p=0,0103$ ) e integridade da membrana plasmática ( $r=0,5563$ ,  $p=0,0313$ ). Para a Classe III foi encontrada correlação positiva com a integridade da membrana plasmática ( $r=0,5314$ ,  $p=0,0415$ ).

A Classe IV apresentou apenas correlação positiva com a integridade da membrana plasmática ( $r=0,5494$ ,  $p=0,0339$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo compreendeu 8 experimentos que juntos geraram uma grande quantidade de resultados. Por este motivo, esta discussão está organizada na mesma ordem que os resultados foram apresentados, exceto quando o havia algum assunto relacionado em diferentes experimentos.

A avaliação espermática é fundamental para avaliação da qualidade espermática e conseqüentemente do potencial para o sucesso na fertilização natural ou artificial.

Diversos fatores relacionados ao meio podem ter efeito positivo ou negativo nas principais características seminais como motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática e integridade acrossomal.

A avaliação do uso de 3 diferentes técnicas para coloração e avaliação da integridade acrossomal demonstrou que a técnica de coloração dupla Trypan-blue Giemsa não possibilitou avaliação confiável da integridade acrossomal em espermatozóides de *Callithrix jacchus*, corroborando com os resultados encontrados para espermatozóides humanos e eqüinos (CROSS; MEIZEL, 1989; KOVÁCS; FOOTE, 1992) e em contradição com o que ocorre com outras espécies animais como coelhos, touros e suínos (DIDION et al., 1989; KOVÁCS; FOOTE, 1992).

Uma possível causa já sugerida por Kovács e Foote (1992), é relativa ao pequeno tamanho da cabeça do espermatozóide, como ocorre em humanos, eqüinos e no camundongo. Em espermatozóides com a cabeça menor, a região pós acrossomal é corada pelo Giemsa da mesma maneira que a região acrossomal e não há diferenciação das duas regiões.

A coloração simples para acrossoma descrita por Pope, Zhang e Dresser (1991) recomenda a incubação do sêmen com a solução corante à 37°C, porém, conforme os resultados obtidos neste estudo, este procedimento pode ser realizado a 25°C, o que possibilitou a realização da técnica em condições menos controladas como trabalhos a campo. Este fator é importante, pois poderia haver alteração na resposta causada pelo stress relacionado a alteração da temperatura em estudos com animais *in situ*.

Para *Callithrix jacchus*, a coloração por FITC-PSA corroborou com os resultados encontrados para outras espécies, inclusive *Callithrix jacchus* (CROSS et al., 1986; CROSS et al., 1989; CROSS; MEIZEL, 1989; ROTH et al., 1998; PUDRITZ, 2000), pois apresentou espermatozóides com acrossomo íntegro bem definidos e com fluorescência verde intensa, o que possibilitou uma excelente avaliação da integridade acrossomal. Por esta técnica ter sido utilizada rotineiramente no Centro de Primatas da Alemanha – DPZ, ela foi escolhida para comparação com a técnica de coloração simples para acrossoma.

Colorações simples e que não exijam equipamentos sofisticados ou condições especiais para sua realização são imprescindíveis para a avaliação espermática em condições adversas como em trabalhos a campo (MACPHERSON, 2001), porém, a técnica de coloração fluorescente com FITC-PSA utilizada demonstrou ser extremamente sensível e, por exigir condições especiais para sua realização fica impossível o trabalho com primatas neotropicais em condições *in situ*.

A coloração simples para acrossomo demonstrou ser uma técnica confiável que diferenciou claramente espermatozóides com acrossomo íntegro de espermatozóides com acrossomo não íntegro ou danificado, em concordância com os resultados obtidos por Pope, Zhang e Dresser (1991).

Esta técnica, por não exigir equipamentos sofisticados ou condições especiais, apresentou as vantagens descritas por Macpherson (2001) para avaliação espermática a campo e a modificação realizada neste estudo com a montagem com meio para montagem Eukit<sup>®</sup> e laminula propiciou o armazenamento por um período maior quando seguida a recomendação de Pope, Zhang e Dresser (1991), de armazenamento em local com pouca luminosidade.

A consistência dos resultados encontrados nas amostras coradas pela coloração simples para acrossomo e pela técnica com FITC-PSA somados à correlação encontrada entre as duas colorações possibilitou a validação da técnica de coloração simples para acrossomo.

Conforme foi relatado por Pudritz (2000), o protocolo do tratamento para capacitação espermática e indução da reação acrossômica utilizado neste estudo foi eficiente para a espécie *Callithrix jacchus* e resultou em alto percentual de espermatozoides com acrossomo não íntegro. Estes resultados vêm de encontro àqueles obtidos na validação.

Os resultados negativos obtidos na utilização da coloração simples para acrossomo de espermatozoides descongelados impossibilitaram a avaliação da integridade acrossomal nestas condições. Um fator que deve ser considerado é a presença do glicerol nestas condições, pois, segundo Wilton et al. (1991), e conforme foi observado no Centro de Primatas da Alemanha – DPZ, o sêmen de *Callithrix jacchus* é extremamente sensível à centrifugação, o que impediu a retirada do diluidor e crioprotetor após a descongelação. Uma possível causa para este resultado seria o conjunto de alterações que ocorrem na membrana durante o processo de congelação e descongelação que acarretariam alterações na permeabilidade da membrana à solução corante que culminaria por corar toda a



cabeça do mesmo. Como o glicerol é um crioprotetor que penetra na célula, a sua adição antes da congelação e retirada após a descongelação exige que a membrana esteja íntegra para permitir as trocas com o meio diluidor (GAO et al., 1995).

A validação da técnica de coloração pela Eosina-nigrosina demonstrou a eficácia da técnica para a espécie *Callithrix jacchus* e a montagem com meio de montagem Eukitt® e lamínula possibilitou a visualização das células coradas e não coradas posteriormente, em contraste com a aplicação rotineira da técnica que determina a análise imediata do preparado, pois pode ocorrer a entrada do corante na célula em função da umidade do ambiente (BJÖRNDAHL; SÖDERLUND; KVIST, 2003).

Embora a coloração pela Eosina Y para avaliação da integridade da membrana plasmática seja utilizada em primatas não humanos como *Callithrix jacchus* e *Alouatta caraya* (KUEDERLING et al., 2000; VALLE et al., 2004) e humanos (WHO, 1999), a coloração pela Eosina-nigrosina é largamente utilizada em diversas espécies animais e no homem (WHO, 1999; GRAHAM, 2001; BJÖRNDAHL; SÖDERLUND; KVIST, 2003). O contraste ocasionado pela nigrosina, que evidencia as células com membrana plasmática íntegra (não coradas), facilitou a análise e aumentou sua confiabilidade.

Como a avaliação do sêmen diluído no meio TALP-HEPES, tradicionalmente utilizado para diluição seminal em diversas espécies animais, e no meio TEST-GEMA clarificado utilizado nos experimentos com congelação demonstrou não haver diferença significativa em nenhuma variável avaliada, foi possível comparar com confiabilidade as variáveis obtidas para o sêmen diluído nos 2 diluidores.

Esta avaliação foi necessária, pois não é difícil perceber que a motilidade do espermatozóide é afetada pelo meio onde ele está e, portanto, a alta viscosidade do

meio e maior quantidade de moléculas grandes que agem como barreiras possuem efeitos negativos nesta variável. Com exceção da técnica de reprodução artificial *ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)*, onde o espermatozóide é colocado diretamente no citoplasma do oócito, a motilidade progressiva é de extrema importância e sua avaliação deve ser realizada da melhor maneira possível.

O volume médio encontrado para as duas colônias,  $26,05 \pm 2,88$ ;  $48,12 \mu\text{L}$  para o CENP e  $27,04 \pm 2,45$ ;  $42,56 \mu\text{L}$  para o DPZ (média  $\pm$  erro padrão da média; coeficiente de variação) corroboram com os valores encontrados nas principais literaturas consultadas que relatam  $30 \mu\text{L}$  (CUI et al., 1991) para sêmen colhido por eletroejaculação, e  $31,9 \mu\text{L}$  (KUEDERLING et al., 2000) para sêmen colhido pela vibro estimulação peniana (PVS) e são superiores ao encontrado por Schneiders (2004),  $21,8 \mu\text{L}$  com sêmen colhido por PVS, mesma técnica utilizada no presente estudo.

Embora haja relato de volume médio maior,  $40,02 \mu\text{L}$  em sêmen colhido por eletroejaculação (CUI, 1996), os valores encontrados neste estudo refletem melhor os achados para a espécie, uma vez que a técnica de colheita de sêmen em *Callithrix jacchus* por eletroejaculação apresenta resposta com alta variação inter e intra indivíduos (CUI et al., 1991).

Os valores de concentração espermática para os animais do CENP,  $1096,99 \pm 252,37 (100,28) \times 10^6$  espermatozóides / mL e do DPZ  $1032,88 \pm 205,56 (93,35) \times 10^6$  espermatozóides / mL (média  $\pm$  erro padrão da média (coeficiente de variação)) corroboram com o valor encontrado por Kuederling et al. (2000),  $1154,2 \times 10^6$  espermatozóides / mL, e superam Schneiders (2004), que encontrou  $655 \times 10^6$  espermatozóides / mL, quando, para os 3 estudos, a técnica de colheita foi a vibro estimulação peniana.

No entanto, os valores encontrados com colheita por outras técnicas foram bem inferiores,  $5,1 \times 10^6$  espermatozóides / mL (CUI et al., 1991) e  $27,3 \times 10^4$  espermatozóides/ $\mu$ L (CUI, 1996) por eletroejaculação e  $6,07 \times 10^6$  / 100  $\mu$ L por lavagem vaginal após a cópula (KUEDERLING; MORREL; NAYUDU, 1996).

A motilidade espermática encontrada nas duas colônias,  $83,68 \pm 2,19$  (11,41)% para o CENP e  $81,82 \pm 3,20$  (18,34) % para o DPZ foram superiores á motilidade encontrada por Kuederling, Morrel e Nayudu (1996), 68,5% com sêmen colhido por lavagem vaginal e a 47,4% com sêmen colhido por eletroejaculação (CUI, 1996). Os valores foram superiores até mesmo quando a técnica utilizada foi a mesma, 59,6% (KUEDERLING et al., 2000) e 56,9% (SCHNEIDERS, 2004). Porém, ainda com sêmen colhido pela mesma técnica, Grupen, Scott e Gilchrist (2004), encontraram motilidade 85%, valor que corrobora com os apresentados neste estudo, embora os autores tenham utilizado apenas dois animais..

Uma vez que a motilidade apresentou correlações positivas com motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal e percentual de espermatozóides normais, e negativa com cabeça solta e defeitos menores no presente estudo, é possível inferir que quanto maior a motilidade, melhor a qualidade seminal, e comparado com os dados da literatura consultada a vibro estimulação foi superior ás outras técnicas, mesmo que nem todas as variáveis tenham sido avaliadas nos outros estudos.

O único estudo encontrado que relata a motilidade progressiva, 48%, foi realizado com colheita por eletroejaculação (CUI et al., 1991), valor bem inferior ao encontrado para as colônias do CENP e do DPZ que ficaram acima dos 75 %.

Como a motilidade progressiva apresentou correlação positiva com a motilidade, integridade da membrana plasmática, percentual de espermatozóides

normais, integridade acrossomal e concentração, e correlação negativa com cabeça solta e defeitos menores, pode-se dizer que esta é uma boa variável para a avaliação da qualidade seminal e deve ser utilizada com maior frequência.

O valor médio do percentual de espermatozóide com membrana plasmática íntegra ou espermatozóides vivos encontrados para os animais do CENP e do DPZ ficou acima de 84%, valor superior ao encontrado por Kuederling et al. (2000), 74,6%, e por Schneiders, Sonksen e Hodges (2004), 73,6%, e próximo ao encontrado por Kuederling, Morrel e Nayudu (1996) no sêmen colhido por lavagem vaginal, 84,1%.

A falta de estudos e relatos na literatura científica impede comparações mais aprofundadas destas características nesta espécie, porém, estes valores indicam que a técnica de colheita por vibro estimulação apresenta melhores resultados que outras técnicas para a maioria das características avaliadas.

Segundo estudos realizados anteriormente, isto ocorre não apenas para a colheita de sêmen desta espécie, mas também de *Saimiri boliviensis* (YEOMAN et al., 1997b, 1998; SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004). Isto se deve provavelmente principalmente à diferente composição do plasma seminal obtido pelas diferentes técnicas (YOUNG; SMITHWICK; GOULD, 1995; YEOMAN et al., 1998).

A análise morfológica demonstrou que praticamente não houve diferença significativa entre as duas colônias, com diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) apenas para as variáveis cauda enrolada e cauda fortemente dobrada que foram maiores nos animais do DPZ, e grânulo no acrossoma, gota citoplasmática proximal, e cauda dobrada ou enrolada com gota que foram maiores no CENP.

Embora os baixos valores encontrados para as variáveis que foram maiores

nos animais do CENP, em torno de 1%, em contraste com aproximadamente 6% e 11% para cauda enrolada e cauda fortemente dobrada nos animais do DPZ sugerissem uma ligeira superioridade na qualidade seminal da colônia do CENP, não houve diferença significativa no percentual total de espermatozóides normais e nem nos percentuais de defeitos maiores e de defeitos menores.

O total de espermatozóides com morfologia normal encontrado para as duas colônias foi superior ao encontrado por Cui et al. (1991) com sêmen colhido por eletroejaculação, 49% contra 63,58% e 61,65% para o CENP e o DPZ, respectivamente, o que demonstrou melhor qualidade seminal obtida pela colheita por vibro estimulação.

Foram encontrados poucos estudos na literatura científica que relatam as características morfológicas de espermatozóides de *Callithrix jacchus*, porém é relatado que os defeitos de cabeça são raros em relação aos defeitos de cauda (CUI et al., 1991; SCHNEIDERS, 2004), o mesmo foi encontrado neste estudo.

O valor discretamente mais elevado para a variável cabeça solta nas duas colônias avaliadas neste estudo pode estar relacionado à técnica utilizada para a avaliação, que utiliza esfregaço seminal para a coloração e posterior avaliação. O esfregaço pode ocasionar o deslocamento mecânico da cabeça e este fator pode aumentar a ocorrência desta alteração na amostra avaliada.

Porém, várias técnicas que utilizam esfregaço são recomendadas para avaliação da morfologia espermática como Papanicolau (WHO, 1999) e as técnicas utilizadas no presente estudo, que foram realizadas com os kits comerciais Spermac<sup>®</sup> e SpermOscan<sup>®</sup> recomendados pelos fabricantes para sêmen humano e utilizados rotineiramente para humanos e outras espécies (CHAN et al., 1996; BARAN et al., 2004).

Nenhum estudo consultado apresentou valores para a variável integridade acrossomal na espécie *Callithrix jacchus* independentemente da técnica de colheita utilizada. Os valores apresentados para a colônia do CENP e do DPZ constituem o primeiro relato desta característica para esta espécie e servirá como parâmetro para estudos futuros.

A avaliação da integridade acrossomal é fundamental, pois este estudo demonstrou correlação positiva desta variável com a motilidade e motilidade progressiva. Espermatozóides móveis e com acrossomo íntegro são necessários para ocorrência da capacitação, reação acrossômica e fertilização.

Adicionalmente, outras correlações positivas importantes foram encontradas entre a integridade acrossomal e a integridade da membrana plasmática e o percentual de espermatozóides normais. Estas correlações positivas, somadas às correlações negativas com defeitos menores e cabeça solta indicam que amostras com baixo índice de espermatozóides com acrossomo íntegro apresentam baixa qualidade e provavelmente baixo potencial para fertilização.

A gota citoplasmática distal ou vesícula causada por sensibilidade osmótica é comumente confundida com excesso de citoplasma residual. A primeira é encontrada em espermatozóides móveis normais e espermatozóides epididimários, já a segunda é patológica, com retenção anormal do citoplasma (COOPER et al., 2004). Neste caso, a correlação positiva da concentração com gota citoplasmática distal não representa qualidade seminal baixa em amostras com alta concentração, uma vez que esta apresenta correlação positiva também com motilidade progressiva.

O pH seminal apresentou correlação positiva com a concentração e com gota citoplasmática distal, o que demonstrou ser este um importante fator para estas

características, pois estas últimas apresentaram correlação positiva entre elas, conforme já citado. Adicionalmente apresentou correlação negativa com cauda fortemente dobrada e defeitos maiores, o que demonstrou sua importância na qualidade seminal.

O pH seminal encontrado para os animais do CENP e do DPZ foi 7,6, e as correlações encontradas demonstraram que em pH mais ácido há maior incidência de defeitos maiores e de cauda fortemente dobrada, características diretamente ligadas à fertilidade. Em pH mais básico há concentrações maiores, porém com maior incidência de gota citoplasmática distal, o que poderia significar maior quantidade de células imaturas ou com característica epididimária.

O glicerol é um crioprotetor utilizado para congelamento seminal em diversas espécies, porém é tóxico para a célula, além de causar injúrias por ser um crioprotetor penetrante e necessitar entrar na célula antes do congelamento e sair após o descongelamento, e, adicionalmente, diferentes espécies apresentam diferentes sensibilidades a este efeito (ROYERE et al., 1996; LEIBO; PICTON; GOSDEN, 2001; LI et al., 2005).

A queda na motilidade, motilidade progressiva e no percentual de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra após a adição do glicerol encontrados no presente estudo são exemplos claros de seu efeito prejudicial para a qualidade seminal. A integridade da membrana plasmática é essencial para a sobrevivência da célula aos processos de congelação e descongelação, e juntamente com a motilidade e a motilidade progressiva são extremamente importantes para a fertilização e precisam ser preservadas para que a fertilização com sêmen descongelado possa ocorrer.

Embora tenha apresentado diferenças significantes para algumas características morfológicas, não houve diferença significativa para os defeitos maiores e menores antes e após a adição do glicerol. Estes resultados somados às diferenças encontradas demonstraram que a concentração de glicerol utilizada, 4 %, foi suficiente para causar alterações principalmente na motilidade, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática, o que fazem destas as principais características a serem avaliadas em estudos futuros para definir a concentração ideal de glicerol para utilização com sêmen de *Callithrix jacchus*.

Todos os protocolos de congelação testados apresentaram queda com diferença significativa entre as fases pré e pós congelação nas variáveis motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, defeitos maiores, defeitos menores e percentual de espermatozóides normais.

A intensidade da queda destes valores demonstrou que nenhum dos protocolos apresentou resultados satisfatórios para estas variáveis, porém o protocolo 1 (com fase de equilíbrio e de vapor de nitrogênio) obteve resultados numericamente melhores em todas as variáveis, com diferença significativa para o percentual de espermatozóides normais e defeitos menores.

A queda foi mais intensa no protocolo 3 (sem fase de equilíbrio e de vapor de nitrogênio) com diferença significativa com os protocolos 1 e 2 (sem fase de equilíbrio, com fase de vapor de nitrogênio) para a motilidade e integridade da membrana plasmática. O percentual de defeitos maiores não apresentou diferença significativa entre os protocolos.

O efeito da congelação na morfologia dos espermatozóides resultou em maior quantidade de células com lesões típicas causadas pela congelação, principalmente



cauda enrolada, vacúolo no acrossoma, cauda fortemente dobrada e cauda fortemente enrolada nos 3 protocolos testados, com diferença significativa entre as fases pré congelação e pós-descongelação. O protocolo 3 não apresentou diferença significativa para a variável cauda fortemente enrolada com os protocolos 1 e 2, porém esta foi a principal variável com diferença significativa entre os dois últimos.

A avaliação do efeito da congelação na média de todos os protocolos deixou claro que o crioprotetor não foi eficaz na proteção do espermatozóide durante os processos que envolvem a congelação e a descongelação. As principais características necessárias para viabilidade espermática foram afetadas.

A avaliação do efeito da adição do glicerol discutida anteriormente demonstrou seu efeito prejudicial à célula, porém os valores obtidos após a adição do glicerol para as características afetadas apresentaram discreta diferença, embora significativa, dos valores encontrados no sêmen com diluidor sem o glicerol, e por este motivo seu efeito foi avaliado nos 3 protocolos de congelamento.

Os valores encontrados após a descongelação apresentaram diferenças acentuadas muito inferiores aos valores pré congelação. Estes valores continuaram a diminuir ao longo do tempo para as variáveis avaliadas até o período de 4 horas pós-descongelação.

É possível que, embora o sêmen tenha sido diluído após a descongelação, com conseqüente diminuição da concentração de glicerol de 4% para 2%, seus efeitos tóxicos tenham continuado a afetar a célula e ocasionado a diminuição contínua da qualidade da amostra e afetado a viabilidade da célula.

Mesmo com os baixos valores encontrados, foi possível verificar valores superiores para o protocolo 1 quando comparado com os outros dois, porém nem sempre com diferenças significantes com o protocolo 2. Isto indica que o uso do

glicerol como crioprotetor apresentou melhores resultados quando houve a fase de equilíbrio.

Não houve diferença significativa na avaliação da atividade citoquímica mitocondrial entre os 3 protocolos após 1 ou 2 horas da descongelação, o que não possibilita avaliar o melhor protocolo baseado apenas na atividade citoquímica mitocondrial.

No entanto, a avaliação da atividade citoquímica mitocondrial demonstrou que, embora tenha ocorrido esta queda nos valores das variáveis motilidade, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática, as células apresentavam atividade mitocondrial e, portanto, havia respiração celular e metabolismo energético.

O aumento numérico em todos os protocolos nos valores para a Classe I e a manutenção dos valores para a Classe II entre os tempos 1 e 2, embora sem diferença significativa, contrastaram com a queda das variáveis citadas nos mesmos tempos, principalmente a integridade da membrana plasmática. Este resultado não era esperado, uma vez que espermatozóides com a integridade da membrana plasmática comprometida são considerados mortos.

As correlações positivas encontradas entre a Classe IV da atividade mitocondrial e a integridade da membrana plasmática nos tempos 1 e 2, embora com valores baixos, 1 ( $r=0,3176$ ,  $p=0,0119$ ) e 2 ( $r=0,26097$ ,  $p=0,0405$ ) sugerem que quanto maior a quantidade de células com membrana íntegra, maior o número de células na Classe IV, portanto, sem atividade mitocondrial.

Isto significa que parte dos espermatozóides não corados pela técnica Eosina-nigrosina e classificados como “vivos”, ou seja, com membrana plasmática

íntegra, não podem ser considerados vivos, pois não apresentam respiração celular e metabolismo energético.

Porém, os valores das Classes I, II e III demonstraram que células com a membrana plasmática danificada, portanto coradas, podem apresentar metabolismo energético e respiração celular e não poderiam ser considerados mortos. Estas células poderiam estar com a membrana plasmática danificada ou com sua permeabilidade alterada.

A alteração na permeabilidade da membrana facilitaria a entrada do corante eosina na célula. A presença do glicerol no meio diluidor do sêmen seria um fator que possivelmente seria uma causa para esta alteração na permeabilidade da membrana.

É sabido que a atividade mitocondrial apresenta correlação direta com a motilidade (AMANN, 1989), o que indica que a queda nos valores da motilidade e da motilidade progressiva não estavam relacionados com a respiração celular e o metabolismo energético, portanto devem haver outros fatores envolvidos.

A correlação positiva entre a motilidade e a motilidade progressiva com a integridade da membrana plasmática é um possível fator que estaria relacionado à queda nos valores destas variáveis.

Embora tenha havido manutenção da atividade mitocondrial 1 e 2 horas após a descongelação com diferença significativa apenas para a Classe IV, características como motilidade, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática sofreram alterações significantes nos mesmos tempos.

Mesmo que apenas uma destas características sozinhas não apresente correlação com a fertilidade (SMITH et al., 1981), este estudo demonstrou a correlação positiva entre elas, o que evidencia a baixa eficácia do glicerol na

proteção do espermatozóide nas condições utilizadas e nos processos de congelação avaliados.

A integridade do DNA do espermatozóide é essencial para a transmissão exata do código genético (SMITH et al., 2005) e necessita estar estável para que possa descondensar no momento da fertilização (AMANN, 1989).

Diversas causas podem ocasionar a fragmentação do DNA, tais como falha na compactação da cromatina, apoptose abortiva e estresse oxidativo (SAKKAS et al., 2002), porém a causa mais importante para este estudo é o efeito da congelação na integridade da cromatina, que já foi relatada em humanos (EVENSON; JOST, 1994; ROYERE et al., 1996).

Um dos efeitos da congelação é o aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (Eros) após a descongelação (MAZZILLI et al., 1995; WANG et al., 1997), que culmina por aumentar a fragmentação do DNA (SAKKAS et al., 2002).

A avaliação da taxa de fragmentação do DNA demonstrou que o percentual de espermatozóides sem fragmentação de DNA no protocolo 1 apresentou diferença significativa com o controle e foi mais baixo que o protocolo 2.

No protocolo 1 houve a fase de equilíbrio com resfriamento do sêmen até 4°C por um período de 2 horas e posterior congelamento no vapor de nitrogênio. Este período pode ter ocasionado maior produção de EROs pré congelação com aumento da taxa de espermatozóides com DNA fragmentado. O mesmo foi descrito para espermatozóides humanos por Wang et al. (1997), onde o grupo que sofreu resfriamento ocasionou a maior concentração de EROs. É possível sugerir que isto justificaria a diferença significativa do protocolo 1 com o controle nas Classes I, II e IV.

O protocolo 2 foi congelado diretamente em vapor de nitrogênio, o que não permitiu aumento na produção de EROs antes da congelação. O mesmo ocorreu com o controle, que foi realizado com as amostras congeladas diretamente no nitrogênio líquido. Estas condições justificariam haver diferença significativa apenas na Classe II entre o protocolo 2 e o controle mas não com o 1, o que demonstra que ambos apresentaram percentuais maiores de espermatozóides com pouca fragmentação de DNA que o controle.

Na Classe III não houve diferença significativa em nenhum dos protocolos com o controle, o que indica que não houve efeito do protocolo no percentual de espermatozóides com fragmentação de DNA moderada.

O mesmo já não ocorreu com o percentual de espermatozóides com DNA altamente fragmentados (Classe IV), onde o protocolo 1 pode ser considerado como o pior resultado, pois apresenta o maior percentual, porém, não houve diferença significativa com o controle, apenas entre os protocolos 1 e 2.

Se forem consideradas apenas as Classes I e II, ou seja, os percentuais de espermatozóides sem ou com pouca fragmentação de DNA, podemos inferir que o protocolo 2 apresentou melhores resultados, com melhor preservação da integridade do DNA.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o glicerol não é um bom crioprotetor para esta espécie, possivelmente devido à sensibilidade dos espermatozóides desta espécie ao glicerol e à centrifugação. Esta última seria uma alternativa para a retirada do glicerol após a descongelação.

Porém, diferentes concentrações e protocolos para adição do glicerol devem ser avaliados para certificar que esta baixa eficiência na proteção do espermatozóide não foi causada pelos protocolos utilizados, mas sim pelo crioprotetor.

Adicionalmente, testes para a dosagem da produção dos EROs devem ser realizados para determinar se esta é a principal causa da baixa motilidade ou da alta taxa de fragmentação do DNA em determinados protocolos após a descongelação. A alta produção de EROs já foi relatada como causa para estas características em espermatozoides humanos (MAZZILLI et al., 1995; WANG et al., 1997).

O uso de crioprotetores não penetrantes seria uma alternativa viável que deve ser investigada para utilização nesta espécie. A adição de açúcares em substituição total ou parcial do glicerol já é testada e até utilizada em camundongos e outras espécies de primatas (LI et al., 2005).

Técnicas alternativas para a preservação dos espermatozoides devem ser avaliadas para a espécie *Callithrix jacchus*, pois técnicas como a vitrificação já são utilizadas para preservação de gametas em outras espécies como o camundongo, que como os *Callithrix jacchus* possuem espermatozoides extremamente sensíveis à centrifugação e ao glicerol (ISACHENKO; NAYUDU, 1999; ISACHENKO et al., 2005).

A espécie *Callithrix jacchus* é um importante modelo para pesquisas com biotecnologia da reprodução em primatas neotropicais, pois as técnicas desenvolvidas para esta espécie poderão ser aplicadas com pouca ou nenhuma adaptação em espécie ameaçadas, principalmente de outros Callithriquídeos.

Estas técnicas são extremamente importantes para uso em manejo genético, principalmente para utilização de material dos bancos de germoplasma, que podem propagar a informação genética de um indivíduo por longos períodos ou várias gerações futuras.

## 7 CONCLUSÕES

- O protocolo de vibro estimulação peniana para colheita de sêmen de *Callithrix jacchus* utilizado foi seguro e eficaz.
- O uso da coloração simples para acrossomo pôde ser validado para avaliação da integridade acrossomal de sêmen fresco da espécie *Callithrix jacchus* e não é válido para sêmen descongelado na presença de glicerol.
- Não foi possível avaliação da integridade acrossomal com a coloração Trypan-blue Giemsa.
- Foi validada a coloração Eosina-nigrosina para avaliação da integridade da membrana plasmática.
- Os diluidores TALP-HEPES ou TEST-GEMA clarificado não interferiram na avaliação das características seminais de *Callithrix jacchus*.
- Foi possível descrever e comparar as características seminais dos indivíduos das colônias de *Callithrix jacchus* do Centro Nacional de Primatas – CENP e do *Deutsches Primatenzentrum* - DPZ, que apresentaram características seminais semelhantes.
- Foi possível avaliar o efeito da adição do glicerol nas características seminais da espécie *Callithrix jacchus*.
- Nenhum dos protocolos propostos apresentou resultados satisfatórios, porém o protocolo 1 apresentou resultados ligeiramente superiores.
- Foi possível avaliar a atividade mitocondrial de espermatozóides criopreservados de *Callithrix jacchus*, que não apresentaram diferença entre os protocolos.
- O glicerol apresentou baixa eficácia na proteção celular nos protocolos propostos.

- A taxa de fragmentação do DNA de espermatozoides criopreservados de *Callithrix jacchus* pôde ser avaliada pelo método Cometa e o protocolo 2 apresentou os melhores resultados



## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D. H.; BARNET, D. K.; COLMAN, R. J.; YAMAMOTO, M. E.; SCHULTZ-DARKEN, N. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. **Comparative Medicine**, v. 53, n. 4, p. 339-350, 2003.
- ABBOTT, D. H.; HODGES, J. K.; GEORGE, L. M. Social status control LH secretion and ovulation in female marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*). **Journal of Endocrinology**, v. 117, p. 329-339, 1988.
- AMANN, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**. v.10, p. 89-98, 1989.
- ARAÚJO, A.; ARRUDA, M. F.; ALENCAR, A. I.; ALBUQUERQUE, F.; NASCIMENTO, M. C.; YAMAMOTO, M. E. Body weight of wild and captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). **International Journal of Primatology**, v. 21, n. 2, p. 317-324, 2000.
- AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995. 168 p.
- BALLOU, J. D. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. **Cryobiology**, v. 29, p. 19-25, 1992.
- BARAN, A.; ŞAHİN, B. E.; EVECEN, M.; DEMİR, K.; ILERI, I. K. Use of Spermac<sup>®</sup> staining technique in the determination of acrosomal defects in cat semen. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 28, p. 519-525, 2004.
- 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.
- BENCHAIB, M.; BRAUN, V.; LORNAGE, J.; HADJ, S.; SALLE, B.; LEJEUNE, H.; GUERIN, J. F. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Human Reproduction**, v. 18, p. 1023-1028, 2003.
- BERTOLLA, R. P. **Efeito do estresse térmico na gametogênese masculina**. 2006. 85 f. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006.
- BJÖRNDAHL, L.; SÖDERLUND, I.; KVIST, U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. **Human Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 813-816, 2003.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.

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

CARVALHO, L. J. M.; ALVES, F. A.; OLIVEIRA, S. G.; VALLE, R. R.; FERNANDES, A. A. M.; MUNIZ, J. A. P. C.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Severe anemia affects both splenectomized and nonsplenectomized *Plasmodium falciparum*-infected *Aotus infulatus* monkeys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 679-686, 2003.

CHAN, P. J.; CORSELLI, J. U.; JACOBSON, J. D.; PATTON W. C.; KING, A. Correlation between intact sperm acrosome assessed using the spermac stain and sperm fertilizing capacity. **Archives of Andrology**, v. 36, p. 25-27, 1996.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

COOPER, T. G.; YEUNG, C. H.; FETIC, S.; SOBHANI, A.; NIESCHLAG, E. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. **Human Reproduction**, v. 19, n. 10, p. 2283-2288, 2004.

CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.

CROSS, N. L.; MORALES, P.; FUKUDA, M.; BEHBOODI, E. Determining acrossomal status of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm by fluorescence microscopy. **American Journal of Primatology**, v. 17, p. 157-163, 1989.

CROSS, N. L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J. W.; HANSON, F. W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, v. 15, p. 213-226, 1986.

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.; GUERIN, M. V.; NAPIER, A. J.; MATTHEWS, C. D. Collection and analysis of semen from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Andrology**, v. 12, n. 3, p. 214-220, 1991.

CUI, K. H.; MATTHEWS, C. D. Anatomy of adult female common marmoset (*Callithrix jacchus*) reproductive system. **Journal of Anatomy**, v. 185, p. 481-486, 1994.

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

DE SOUZA, P.; RUNE, G. M.; HEGER, W.; MERKER, H. Spermatogenesis from birth to sexual maturity in the marmoset testis. In: NEUBERT, D.; MERKER, H.;

DIDION, B. A.; DOBRINSKY, J. R.; GILES, J. R.; GRAVES, C. N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, v. 22, n. 1, p. 51-57, 1989.

DONNELLY, E. T.; O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. Differences in nuclear DNA fragmentation and human mitochondrial integrity of semen and prepared spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, p. 1552-1561, 2000.

DUKELOW, W. R. The Squirrel Monkey. In: HEARN, J. P. (Ed.). **Reproduction in new world primates**. Lancaster: MTP Press, 1983. p. 151-179.

DUKELOW, W. R.; PIERCE, D. L.; ROUDEBUSH, W. E.; JAROSZ, S. J.; SENGOKU, K. In vitro fertilization in nonhuman primates. **Journal of Medical Primatology**, v. 19, n. 7, p. 627-639, 1990.

DURAN, E. H.; MORSHELDI, M.; TAYLOR, S.; OEHNINGER, S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. **Human Reproduction**, v. 17, p. 3122-3128, 2002.

DURRANT, B. S. Semen collection, evaluation and cryopreservation in exotic animal species: maximizing reproductive potential. **Ilar News**, v. 32, n. 1, p. 2-9, 1990.

EVENSON, D. P.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay: DANN denaturability. **Methods in Cell Biology**, v. 42, p. 159-175, 1994.

FAULKES, C. G.; ARRUDA, M. F.; MONTEIRO DA CRUZ, M. A. O. Matrilineal genetic structure within and among populations of the cooperatively breeding common marmoset, *Callithrix jacchus*. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1101-1108, 2003.

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, p. 1109-1122, 1995.

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

GILCHRIST, R. B.; NAYUDU, P. L.; NOWSHARI, M. A.; HODGES, J. K. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte cumulus cell associations. **Biology Reproduction**, v. 52, p. 1234-1243, 1995.

GOULD, K. G.; MARTIN, D. E.; WARNER, H. Improved method for artificial insemination in the Great Apes. **American Journal of Primatology**, New York, v. 8, p. 61-67, 1985.

GOULD, K. G.; STYPEREK, R. P. Improved methods for freeze preservation of chimpanzee sperm. **American Journal of Primatology**, New York, v. 18, p. 275-284, 1989.

GOULD, K. G.; WARNER, H.; MARTIN, D. E. Rectal probe electroejaculation. **Journal**

of **Medical Primatology**, New York, v. 7, p. 213-222, 1978.

GOULD, K. G.; YOUNG, L. G. Functional parameters of chimpanzee (*Pan troglodytes*) sperm from ejaculates collected by rectal probe electrostimulation and by artificial vagina. **American Journal of Primatology**, v. 39, p. 115-122, 1996.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality. In: American Association of Equine Practitioners Annual Convention, 47., 2001, San Diego. **Proceedings ...** v. 47, p. 302–305.

GRAHAM, E. F.; SCHMEHL, N. K. L.; NELSON, D. S. Problems with laboratory assays. In: **Proceedings 8th NAAB Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction**, Colorado, p. 59–66, 1980.

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. **Ciclo ovariano do macaco prego (*Cebus apella*, LINNAEUS, 1758): técnicas de extração e dosagem de progesteronas fecais e hormônio luteinizante urinário.** 1999. 78 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

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 Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

GUIMARÃES, M. A. B. V.; OLIVEIRA, C. A.; BARNABE, A. H.; BARNABE, R. C. Morphometry of the spermatozoa from Capuchin Monkeys (*Cebus apella*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 88-90, 2002.

GUIMARÃES, M. A. B. V.; OLIVEIRA, C. A.; BARNABE, R. C. Seasonal variation in the testicular volume of Capuchin Monkeys (*Cebus apella*) in captivity. **Folia Primatologica**, v. 74, n. 1, p. 54-56, 2003.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal.** 6. ed. São Paulo: Manole, 1995, 582 p.

HEARN, J. P. The Common marmoset (*Callithrix jacchus*). In: HEARN, J. P. (Ed.). **Reproduction in New World Primates.** Lancaster: MTP Press, 1983. p. 181-215.

HEARN, J. P.; ABBOTT, D. H.; CHAMBERS, P. C.; HODGES, J. K.; LUNN, S. F. Use of the common marmoset, *Callithrix jacchus*, in reproductive research. **Primates Medicine**, v. 10, p. 40-49, 1978.

HENDRICKX, A. G. (Ed.). **Non-human primate: developmental biology and toxicology.** Wien: Ueberreuter Wissenschaft, 1988. p. 511-528

HERNANDEZ-LOPEZ, 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.

HOLT, W.V.; ABAIGAR, T.; WATSON, P. F.; WILDT, D. E. Genetic resource banks for species conservation. In: HOLT, W. V.; PICKARD, J. C.; RODGERS, D. E.; WILDT, D. E. (Ed.). **Reproductive Science and Integrated conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p. 267-280.

HOLT, W. V.; WILTON, L. J.; MARSHALL, V. S. Cryopreservation of spermatozoa from the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). In: Symposium on Spermatology, 7., 1994, Cairns, Australia. **Proceedings...** v. 1, p. 17.

HOWARD, J.; MARINARI, P.E.; WILDT, D.E. Black-footed ferret: model for assisted reproductive technologies contributing to in situ conservation. In: HOLT, W. V.; PICKARD, J. C.; RODGERS, D. E.; WILDT, D. E. (Ed.). **Reproductive Science and Integrated conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p. 249-266.

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.

ISACHENKO, E. F.; NAYUDU, P. L. Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromatin and spindle normality and cumulus integrity. **Human Reproduction**, v. 14, p. 400-408, 1999.

ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E. F.; MONTAG, M.; ZAEVA, V.; KRIVOKHARCHENKO, I.; NAWROTH, F.; DESSOLE, S.; KATKOV, I. I.; VAN DER VEM, H. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 10, p. 350-354, 2005. Disponível em: <<http://www.rbmonline.com/Article/1637>>. Acesso em: 25 jan. 2005.

JANINI, J. B. M.; PEREIRA, O. S. **Atlas de morfologia espermática**. São Paulo 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 251 p.

KENDRICK, K. M.; DIXSON, A. F. The effect of the ovarian cycle on the sexual behavior of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Physiology & Behavior**, v. 30, p. 735-742, 1983.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTROM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v. 363, p. 89-96, 1996.

KOVÁCS, A.; FOOTE R. H. Viability and acrosome staining of bull boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 67, p. 119-124, 1992.

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.; CARVALHO, R. A.; DOMINGUES, S. F. S.; GUIMARAES, D. A. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; VALLE, R. R.; FELIPPE, E. C. G.; SILVA, K. S. M.; OLIVEIRA, C. A. Análise colpocitológica e endocrinológica do ciclo ovariano de bugio (*Alouatta caraya*). In: CONGRESSO, 9; ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 14., 2005, São José do Rio Preto. **Anais ...** São José do Rio Preto: Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2005. p. 86.

LANG, C. M. A technique for the collection of sêmen from squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) by electro-ejaculation. **Laboratory Animal Care**, v. 17, n. 2, p. 218-221, 1967.

LARSSON-COOK, K. L.; BRANNIAN, J. D.; HANSEN, K. A.; KASPERSON, K. M.; AAMOLD, E. T.; EVENSON, D. P. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 895-890, 22003.

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

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.

LI, L. H.; DONALD, J. M.; GOLUB, M. S. Review on testicular development, structure, function, and regulation in common marmoset. **Birth Defects Research (Part B)**, v. 74, p. 450-469, 2005.

MACPHERSON, M. L. How to evaluate semen in the field. In: **AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS ANNUAL CONVENTION**, 47., 2001, San Diego. **Proceedings ...** v. 47, p. 412-416.

MAKLER, A.; ZAIDISE, I.; PALDI, E.; BRANDES, J. M. Factors affecting sperm motility. I. In vitro change in motility with time after ejaculation. **Fertility and Sterility**, v. 31, p. 147-154, 1979.

MANSFIELD, K. Marmoset models commonly used in biomedical research. **Comparative Medicine**, v. 53, n. 4, p. 383-392, 2003.

MAZZILLI, F.; ROSSI, T.; SABATINI, L.; PULCINELLI, F. M.; RAPONE, S.; DONDERO, F.; GAZZANIGA, P. P. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. **Acta European Fertility**, v. 26, n. 4, p. 145-148, 1995.

MILLAR, M. R.; SHARPE, R. M.; WEINBAUER, G. F.; FRASER, H. M.; SAUNDERS, P. T. K. Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human. **International Journal of Andrology**, v. 23, p. 266-277, 2000.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção**. (Publicação eletrônica). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>>. Acesso em: 04 mar. 2004.

- MITTERMEIER, R. A.; COIMBRA-FILHO, A. F. Distribution and conservation of New World primate species used in biomedical research. In: HEARN, J. P. (Ed.). **Reproduction in new world primates**, Lancaster: MTP Press, 1983. p. 3-37.
- MOORE, H. D. M. An assessment of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **International Journal of Andrology**, v. 4, n. 3, p. 321-330, 1981.
- MORREL, J. M. Cryopreservation of marmoset sperm (*Callithrix jacchus*). **Cryoletters**, v. 18, p. 45-54, 1997.
- 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.; KUEDERLING, 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.
- MORREL, J. M.; NOWSHARI, M.; ROSENBUSCH, J.; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Birth of offspring following artificial insemination in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. **American Journal of Primatology**, v. 41, n. 1, p. 37-43, 1997.
- MORRELL, J. M.; NUBBEMEYER, R.; HEISTERMANN, M.; ROSENBUSCH, J.; KUEDERLING, I., HOLT, W.; HODGES, J. K. Artificial insemination in *Callithrix jacchus* using fresh or cryopreserved sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 52, n. 2, p. 165-174, 1998.
- MORTIMER, D.; CURTIS, E. F.; MILLER, R. G. Specific labeling by peanut agglutinin of outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 127-135, 1987.
- MULLER, T.; SIMONI, M.; PEKEL, E.; LUETJENS, C. M.; CHANDOLIA, R.; AMATO, F.; NORMAN, R. J.; GROMOLL, J. Chorionic gonadotrophin beta subunit mRNA but not luteinizing hormone beta subunit mRNA is expressed in the pituitary of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 32, p. 115-128, 2004.
- NAGLE, C. A.; DENARI, J. H. The reproductive biology of capuchin monkeys (*Cebus spp*). **International Zoo Yearbook**, London, v. 22, p. 143-150, 1982.
- NIEVERGELT, C. M.; DIGBY, L. J.; RAMIAKRISHNAN, U.; WOODRUFF, D. S. Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (*Callithrix jacchus*) population. **International Journal of Primatology**, v. 21, p. 1-20, 2002.
- NOWSHARI, M. A.; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Effect of cryoprotectant concentration and equilibration time on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed mature mouse oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p. 1193-1204, 1994.
- NOWSHARI, M. A.; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed

pronuclear stage mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 10, n. 12, p. 3237-3242, 1995.

O'CONNELL, M.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, p. 704-709, 2002.

OETTLE, E. E. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. **Animal Reproduction Science**, v. 12, p. 145-150, 1986.

PEDREIRA, C. M.; PEIXOTO, L. I. S. Comparison of karyotypes of two brazilian species of marmosets (*Callithrix penicillata* and *Callithrix jacchus*). **Ciência e Cultura**, v. 27, p. 229-232, 1975.

PIECZARKA, J. C. Biodiversidade de primatas da amazônia e seu uso em pesquisas médico-biológicas. **Projeto de Pesquisa Dirigida, Edital PPD 01/98**. Belém: Universidade Federal do Pará, 1998.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, 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, 2000.

ROTH, T. L. Gamete biotechnology for assisting reproduction in endangered species. **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**, p. 277-280, 1993.

ROTH, T. L.; WEISS, R. B.; BUFF, J. L.; BUSH, L. M.; WILDT, D. E.; BUSH, M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered african antelope, the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 475-482, 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.; RODRÍGUEZ-LUNA, E. A species list for the New World primates (Platyrrhini): Distribution by country, endemism and conservation status according to the Mace-Land system. **Neotropical Primates**, v. 3, p. 113-160, 1995. Supplement.

RYLANDS, A. B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A.; GROVES, C. P.; RODRÍGUEZ-LUNA, E. An assessment of the diversity of new world primates. **Neotropical Primates**, v. 8, n. 2, p. 61-93, 2000.

SAKKAS, D.; MOFFATT, O.; MANICARDI, G. C.; MARIETHOZ, E.; TAROZZI, N.; BIZZARO, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1061-1067, 2002.



- SALISBURY, G. W.; LODGE, J. R.; VANDEMARK, N. L. **Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle**. San Francisco: W. H. Freeman, 1961. 639 p.
- SANKAI, T.; TERAOKA, K.; YANAGIMACHI, R.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 273–278, 1994.
- SCHNEIDER, H.; ROSENBERG, A. L. Molecules, morphology, and platyrrhine systematics. In: NORCONK, A. L.; ROSENBERG, P. A.; GARBER, P. A. (Ed.). **Adaptive Radiations of Neotropical Primates**, New York: Plenum Press, 1996. p. 3-19.
- SCHNEIDERS, A. **Ejakulatgewinnung und Ejakulatanalyse bei Krallenaffen (Callithrichidae; Platyrrhini; Primates)**. 2004. 119 f. Doutorado (Inaugural-Dissertation) - Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, 2004.
- 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.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SMITH, M. F.; MORRIS, D. L.; AMOSS, M. S.; PARISH, N. R.; WILLIAMS, J. D.; WILTBANK, J. N. Relationships among fertility, scrotal circumference, seminal quality and libido in Santa Gertrudis bulls. **Theriogenology**, v. 16, p. 379, 1981.
- SMITH, R.; KAUNE, H.; PARODI, D.; MADARIAGA, M.; RIOS, R.; MORALES, I.; CASTRO, A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. **Human Reproduction**, v. 21, p. 986-993, 2006.
- SONKSEN, J.; BIERING-SØRENSEN, F.; KRISTENSEN, J. K. Ejaculation induced by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injuries. The importance of the vibratory amplitude. **Paraplegia**, v. 32, p. 651-660, 1994.
- STEVENSON, M. F.; RYLANDS, A. B. The Marmosets, Genus *Callithrix*. In: MITTERMEIER, A. B.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A.; FONSECA, G. A. B. (Ed.). **Ecology and behavior of Neotropical primates**. Contagem-MG: Editora Littera Maciel Ltda, v. 2, p. 131-222, 1988.
- SZASZ, G.; CARPENTER, C. Clinical observations in vibratory stimulation of the penis of men with spinal cord injury. **Archives of Sexual Behavior**, v. 18, n. 6, p. 461-474, 1989.
- TARDIF, S. D.; SMUCNY, D. A.; ABBOTT, D. H.; MANSFIELD, K.; SCHULTZ-DARKEN, N.; YAMAMOTO, M. E. Reproduction in captive common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Comparative Medicine**, v. 53, n. 4, p. 364-368, 2003.
- THOMSON, J. A.; ILLIF-SIZEMDRE, S. A.; GLIESSMAN, P. M.; WOLF, D. P. Collection and fertilization potential of sperm from the Sulawesi crested black

macaque (*Macaca nigra*). **American Journal of Primatology**, v. 28, p. 289-297, 1992.

THOMPSON, S. D. Zoo research and conservation: beyond sperm and eggs toward the science of animal management. **Zoo Biology**, v. 12, p. 155-159, 1993.

TOLLNER, T. L.; VANDEVOORT, C. A.; OVERSTREET, J. W.; DROBNIS, E. Z. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 347-352, 1990.

VALLE, C. M. R.; VALLE, R. R.; EITNER, F.; SCHLUMBOHM, C.; CARVALHO, R. A.; SCHOENMANN, U.; BOMBONATO, P. P.; NAYUDU, P. L. The development of a non-invasive differential diagnostic for nephropathy, glucose intolerance and enteritis in captive *Callithrix jacchus*. **Primate Report**, v. 72, n. 1, p. 47-48, 2005b.

VALLE, R. R. **Características físicas e morfológicas do sêmen de *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812) mantidos em cativeiro**. 2002. 66 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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.

VALLE, R. R.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; NAYUDU, P. L. Validation of an acrosome staining for a Neotropical primate species, the common marmoset (*Callithrix jacchus*) for use under field conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, Suppl. 1, p. 38, 2006. Supplement 1.

VALLE, R. R.; ROOS, C.; SCHNEIDER, M. P. C.; SCHOENMANN, U.; SILVA, K. S. M.; CARVALHO, R. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; NAYUDU, P. L. Application of sperm banking to assist genetic management of endangered Neotropical primate populations in Brazil. **Primate Report**, v. 72, n. 1, p. 48-48, 2005a.

WANG, A. W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I.; ANDERSON, D. J.; LOUGHLIN, K. R. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, n. 6, p. 921-925, 1997

WATSON, P. F. A review of techniques of semen collection in mammals. In: **SYMPOSIUM OF THE ZOOLOGICAL SOCIETY OF LONDON**, 1978, London. Anais... London: Symp Zoological Society of London, n. 43, p. 97-126, 1978.

WEINBAUER, G. F.; ASLAM, H.; KRISHNAMURTHY, H.; BRINKWORTH, M. H.; EINSPANIER, A.; HODGES, J. K. Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 120-126, 2001.

WILDT, D.; PUKAZHENTHI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S.; HOWARD, J.; ROTH, T. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction Fertility Development**, v. 7, p. 811-824, 1995.

WILDT, D. E. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. **Zoo Biology Supplement**, v. 1, p. 17-20, 1989.

WILTON, L. J.; TEICHTAHL, H.; TEMPLE-SMITH, P. D.; JOHNSON, J. L.; SOUTHWICK, G. J.; BURGER, H. G.; DE KRETZER, D. M. Young's syndrome (obstructive azoospermia and chronic sinobronchial infection): a quantitative study of axonemal ultrastructure and function. **Fertility and Sterility**, v. 55, n. 1, p. 144-151, 1991.

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.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge: University Press, 1999. 130 p.

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, 1997a.

YEOMAN, R. R.; RICKER, R. B.; WILLIAMS, L. E.; SONKSEN, J.; ABEE, C. R. Vibrostimulation of ejaculation yields increased motile spermatozoa compared with electroejaculation in squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Contemp. Topics Laboratory Animal Science**, v. 36, p. 62-64, 1997b.

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.

YOUNG, L. G.; SMITHWICK, E. B.; GOULD, K. G. Characteristics of chimpanzee (*Pan troglodytes*) ejaculates collected by rectal probe electroejaculation and by artificial vagina. **American Journal of Primatology**, v. 35, p. 293-304, 1995.

## APÊNDICE A

<b>Animal:</b>		<b>Espécie:</b>		<b>Idade:</b>	
<b>Procedência:</b>		<b>Galpão: IV</b>		<b>Gaiola:</b>	
<b>Histórico:</b>			<b>Exames sanitários:</b>		
<b>Peso (Kg) :</b>			<b>Contenção:</b>		<b>Hora:</b>
<b>EXAME CLÍNICO GERAL</b>			<b>TESTÍCULO</b>	<b>Direito</b>	<b>Esquerdo</b>
Condição Corporal:			Circun. Escrotal	Larg:	Comp:
Pele/pelos:			Simetria		
<b>EXAME CLÍNICO ESPECIAL</b>			Comprimento (cm)		
Prepúcio:			Largura (cm)		
Bolsa escrotal:			Consistência		
Pênis:			Mobilidade		
Inserção ligamento escrotal:			Obs:		
<b>EPIDÍDIMO</b>			<b>COLHEITA:</b>	<b>Mét. Colheita:</b>	
	<b>Direito</b>	<b>Esquerdo</b>	<b>OBS:</b>		
Cabeça					
Corpo					
Cauda					
<b>EXAME DO SÊMEN</b>					
<b>Data/Hora Colheita</b>					
Freq. / Ampl. / Volt.					
Aspecto / Coágulo					
Volume (µL)					
Cor					
Motilidade (%)					
Mot. Prog. Lin. (%)					
Int Memb Plasm (%)					
Conc. (x10 <sup>6</sup> /mL)					
Ph					
Int Acrossomo (%)					
Hiperativo					
<b>MORFOLOGIA</b>					
<b>Data da Colheita</b>					
Cab. sub-desenv. / dupla					
Pirif/Estr. base					
Cauda dupla / Enrolada					
Cab.Isol/P.I.					
Grânulo acr / Vacúolo acr					
Fort.Dobr/ Fort. enrolada					
Dobr. gota / Enrol. gota					
Cab gigante / delgada					
GCD / GCP					
NAI / NANI					
<b>Total Maiores</b>					
<b>Total Menores</b>					
<b>Conclusão:</b>					

## APÊNDICE B

### Meios diluidores TALP – HEPES e TALP

MEIO DILUIDOR		
Componentes	TALP- HEPES	TALP
	Concentração g/500ml	Concentração g/500ml
NaCl	3,710	3,330
KCl	0,118	0,1175
NaHCO <sub>3</sub>	0,084	1,052
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	0,021	0,0240
Na Lactate	930 µl	926 µl
MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	0,050	0,050
Glucose	0,4505	0,4505
Hepes (Na-salt)	0,651	-
Hepes (Acid)	0,596	-
Phenolrot	0,0050	0,0050
Bi-dest. H <sub>2</sub> O	/500ml	/500ml
pH	7,33	7,33

## APÊNDICE C

### TEST – Gema de ovo clarificado

#### Componentes:

- Gema de ovo, H<sub>2</sub>O bidestilada estéril, TES, TRIS, Glicose, Penicilina / estreptomicina, Glicerol

COMPONENTES	QUANTIDADE			CONCENTRAÇÃO
	8 mL	16 mL	80 mL	
Gema de ovo clarificada	8 mL	16 mL	80 mL	
TES 229,2 g/mol	0,482 g	0,964 g	4,82 g	210 mM
TRIS Base (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ) 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 5000U./ 5 mg / mL	0,1 mL	0,2 mL	1,0 mL	1 mL / 100 mL = 5mg / mL
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril	1,1 mL	2,2 mL	11 mL	
Glicerol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )ou H <sub>2</sub> O bidest. estéril	0,8 mL	1,6 mL	8 mL	Glicerol = 8 %
<b>TOTAL</b>	10 mL	20 mL	100 mL	

#### Preparo da Gema de ovo clarificada:

- Lavar o ovo e secar bem; separar gema da clara; colocar a gema no papel filtro, furar com agulha e pipetar de uma só vez o conteúdo com pipeta de 10 mL; colocar a gema no cilindro graduado; adicionar H<sub>2</sub>O bidestilada estéril, 3 vezes o volume da gema de ovo; homogeneizar por 15 – 30 minutos em agitador magnético; centrifugar por 1 hora a 4500 U/min, 4°C; retirar sobrenadante, colocar em tubo estéril, adicionar químicos.
- Colocar solução sem glicerol em dois frascos tipo Becker estéril.
- Em um frasco com metade da solução, adicionar o glicerol. A solução deve ter concentração final de glicerol = 8%.
- No frasco que contém a outra metade, adicionar o mesmo volume de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)