

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**COLHEITA DE SÊMEN POR VIBROESTIMULAÇÃO PENIANA PARA
DETERMINAÇÃO DE AZOOSPERMIA APÓS VASECTOMIA E
ORQUIECTOMIA BILATERAIS EM CALITRIQUÍDEOS (GÊNERO
CALLITHRIX)**

CAROLINA SILVEIRA BRAGA

PORTO ALEGRE - RIO GRANDE DO SUL

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**COLHEITA DE SÊMEN POR VIBROESTIMULAÇÃO PENIANA PARA
DETERMINAÇÃO DE AZOOSPERMIA APÓS VASECTOMIA E
ORQUIECTOMIA BILATERAIS EM CALITRIQUÍDEOS (GÊNERO
CALLITHRIX)**

Autora: Carolina Silveira Braga

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi

PORTO ALEGRE - RIO GRANDE DO SUL

2017

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Silveira Braga, Carolina
COLHEITA DE SÊMEN POR VIBROESTIMULAÇÃO PENIANA
PARA DETERMINAÇÃO DE AZOOSPERMIA APÓS VASECTOMIA E
ORQUIECTOMIA BILATERAIS EM CALITRIQUÍDEOS (GÊNERO
CALLITHRIX) / Carolina Silveira Braga. -- 2017.
75 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.

Coorientador: Marcelo Meller Alievi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. sagui. 2. vibroestimulação peniana. 3. azoospermia. 4. vasectomia. 5. orquiectomia. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. Meller Alievi, Marcelo, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Carolina Silveira Braga

**COLHEITA DE SÊMEN POR VIBROESTIMULAÇÃO PENIANA PARA
DETERMINAÇÃO DE AZOOSPERMIA APÓS VASECTOMIA E
ORQUIECTOMIA BILATERAIS EM CALITRIQUÍDEOS (GÊNERO
CALLITHRIX)**

APROVADO POR:

Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini
Orientador e Presidente da Comissão

Prof Dr Claudio Alvarenga de Oliveira
Membro da Banca

Prof^º Dr^a Ender Rosana Oberst
Membro da Banca

Prof Dr Cláudio Estevão Farias da Cruz
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

À minha amada filha, Maria Eduarda.

AGRADECIMENTOS

À minha filha Maria Eduarda por trazer alegria a minha vida.

Ao Eduardo, meu parceiro de vida, agradeço pelo ilimitado e incondicional incentivo e por acreditar nos meus sonhos.

À minha mãe por toda a ajuda e incentivo, sem teu apoio jamais teria conquistado este sonho.

Ao meu pai por todo o amor e carinho.

À minha família, meus irmãos, Caetano, Rafael, Isabel, Ivan e Lucas, minha avó Eli, minha tia Irene, minha prima Lívia, meus cunhados Carla e Rafael, meus amados sobrinhos Matheus, Nicolás e Pedro, agradeço por fazerem parte da minha vida e por todos os momentos compartilhados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emerson Contesini, que sempre foi um exemplo de generosidade e competência, e que muito contribuiu para minha formação acadêmica.

Ao meu querido coorientador Marcelo Meller Alievi, a quem devo muito, obrigado por todos os ensinamentos e por ser um exemplo de dedicação, competência e caráter.

À Prof.^a Dr.^a Ender pelo acolhimento e pelos ensinamentos que muito contribuíram neste trabalho.

Às minhas amigas e parceiras da veterinária Elisa, Pâmela e Lívia, sem vocês este projeto não teria acontecido, obrigada por toda a ajuda durante o experimento, por acreditarem que seria possível e pela incansável ajuda.

Ao amigo Eduardo Ruivo, pela dedicação nos procedimentos anestésicos e por toda a contribuição durante o experimento.

À amiga Luciana Queiroga pelos ensinamentos, por estar sempre disposta a ajudar e pela competência na anestesia dos pacientes.

À amiga Moira Ansolch pela inestimável ajuda e paciência durante as pesquisas no Criadouro Conservacionista Arca de Noé.

À querida amiga Raquel von Hohendorff pelos exemplos de vida, por acreditar no meu trabalho e pelos inúmeros votos de confiança.

À amiga Silvana Vidor pela ajuda na realização e interpretação dos testes estatísticos.

A todos do Preservas/UFRGS pelo apoio e por toda a ajuda durante este projeto.

À Faculdade de Medicina Veterinária e ao Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS.

RESUMO

Saguís-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) e saguís-de-tufo-preto (*C. penicillata*) são animais exóticos na maior parte do território brasileiro, com alto potencial invasor. Portanto, programas de controle populacional devem fazer parte dos planos de manejo adotados para estas espécies. O presente estudo teve como objetivo analisar a viabilidade de métodos cirúrgicos de contracepção masculina em calitriquídeos, determinando o período em que ocorre a eliminação completa de espermatozoides no líquido seminal através de colheitas seriadas de sêmen por vibroestimulação peniana. Foram utilizados 12 saguís divididos em dois grupos de seis animais, ORQ e VAS, e submetidos às técnicas de orquiectomia e vasectomia, respectivamente. Após, amostras de sêmen foram colhidas pelo método de vibroestimulação peniana, com intervalos de sete dias entre elas até a obtenção de duas análises sem presença de espermatozoides no ejaculado. Em relação ao tempo cirúrgico, no grupo ORQ o tempo cirúrgico médio e o desvio padrão foram $10 \pm 2,82$; no grupo VAS $18,17 \pm 4,07$ minutos ($p=0,009$). A técnica de vibroestimulação utilizada ocasionou ejaculação em 85,7% das tentativas de colheita, com o tempo de estimulação médio e desvio padrão de $7,97 \pm 5,04$ minutos. O grupo ORQ apresentou tempo de estimulação médio e erro padrão de $9,78 \pm 1,65$, enquanto que no grupo VAS o valor foi de $6,41 \pm 0,85$ minutos, não havendo diferença estatística entre os grupos. O tempo de estimulação médio e erro padrão das diferentes tentativas de colheita (T) no grupo ORQ foram $11,33 \pm 1,18$ (T1), $8,31 \pm 2,54$ (T2), $8,90 \pm 1,97$ (T3), $10,57 \pm 5,95$ (T4), não havendo diferença estatística entre as tentativas. No grupo VAS, o tempo de estimulação médio e erro padrão das diferentes tentativas foram $11,11 \pm 1,10$ (T1), $7,10 \pm 1,43$ (T2), $4,98 \pm 1,15$ (T3), $2,46 \pm 1,16$ (T4), em que a tentativa T1 foi maior que T2 ($p=0,023$), T3 ($p=0,01$) e T4 ($p<0,001$) e T2 foi maior que T4 ($p=0,018$). Foi constatada ereção peniana em 47,62% das tentativas de colheita de sêmen, sem diferença estatística entre os grupos ORQ e VAS. Observou-se ereção peniana em 55,55% das tentativas de colheita que resultaram em ejaculação, sem diferença estatística entre os grupos ORQ e VAS. Quanto à presença de espermatozoides no ejaculado, apenas um indivíduo do grupo ORQ e dois do grupo VAS foram positivos na primeira colheita realizada após a esterilização cirúrgica. A partir da segunda colheita, foi possível constatar azoospermia em todos os animais. Conclui-se que a vibroestimulação peniana é um método adequado e não invasivo para colheita de sêmen em pequenos primatas. Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir que o período de 21 dias após a esterilização cirúrgica é suficiente para determinar a condição estéril para exemplares de *C. jacchus* e *C. penicillata*. Ambas

as técnicas de esterilização cirúrgica utilizadas neste trabalho são viáveis para serem aplicadas nas duas espécies de *Callithrix* estudadas, apesar do pequeno porte. Este resultado poderá servir como base para estratégias de manejo reprodutivo nas espécies aqui estudadas orientando sobre o tempo necessário, após a esterilização cirúrgica, para se permitir o contato dos machos com fêmeas férteis.

Palavras-chave: sagui, vibroestimulação peniana, azoospermia, vasectomia, orquiectomia.

ABSTRACT

Common marmoset (Callithrix jacchus) and black-tufted marmoset (C. penicillata) are exotic animals in most of the Brazilian territory, with high invasive potential. Therefore, contraceptive methods should be part of the management plan for these species. The present study aimed to analyze the viability of surgical methods of male contraception in Callitrichidae, determining the period which occurs the complete elimination of spermatozoa in the seminal fluid through serial collections of semen by penile vibrostimulation. Twelve marmosets were divided into two groups of six animals, ORQ and VAS, and submitted to orchietomy and vasectomy techniques respectively. Afterwards, semen samples were collected by the penile vibrostimulation method, with intervals of seven days between them until obtaining two analysis without spermatozoa in the ejaculate. Regarding the surgical time, in the ORQ group the average surgical time and standard deviation were 10 ± 2.82 ; In the VAS group 18.17 ± 4.07 minutes ($p = 0.009$). Harvest technique resulted in 85.7% of ejaculation attempts, average stimulation time and standard deviation of 7.97 ± 5.04 minutes. The ORQ group presented average stimulation time and standard error of 9.78 ± 1.65 , while in the VAS group they were 6.41 ± 0.85 minutes, with no statistical difference between the groups. The average stimulation time and standard error of the different harvesting attempts (T) in the ORQ group were 11.33 ± 1.18 (T1), 8.31 ± 2.54 (T2), 8.90 ± 1.97 (T3), 10.57 ± 5.95 (T4), with no statistical difference between the attempts. In the VAS group, the average stimulation time and standard error of the different trials were 11.11 ± 1.10 (T1), 7.10 ± 1.43 (T2), 4.98 ± 1.15 (T3), 2 ($P = 0.023$), and T4 ($p < 0.001$), where the T1 trial was greater than T2 ($p = 0.023$), T3 ($p = 0.01$) and T4 ($p < 0.001$) and T2 was higher than T4 ($p = 0.018$). Penile erection was observed in 47.62% of the semen collection attempts, with no statistical difference between the ORQ and VAS groups. Penile erection was observed in 55.55% of the harvesting attempts that resulted in ejaculation, with no statistical difference between the ORQ and VAS groups. As to the presence of spermatozooids in the ejaculate, only one individual in the ORQ group and two in the VAS group were positive in the first harvest after surgical sterilization. From the second harvest, it was possible to verify azoospermia in all the animals. It is concluded that both techniques of surgical sterilization are viable in the two Callithrix species studied, despite the small size. PVS is an adequate and non-invasive method for semen collection in small primates. In view of the results obtained we can suggest that the period of 21 days after the surgical sterilization is enough to determine the sterile condition for C. jacchus and C. penicillata. This result may serve as

a basis for strategies of reproductive management in the species studied here, guiding the necessary time, after surgical sterilization, to allow the contact of males with fertile females.

Key words: marmoset, orchietomy, vasectomy, population control, azoospermia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Exemplar de sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) (A) Exemplar de sagui-de-tufo-branco (*C. jacchus*) (B). Fonte: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO).22
- Figura 2- Área de distribuição natural de sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) (A) Área de distribuição natural de sagui-de-tufo-branco (*C. jacchus*) (B). Fonte: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO).24
- Figura 3- Recinto de *Callithrix* no Parque Zoológico de Sapucaia do Sul. Visão externa (A), Visão interna (B). Fonte: WOLF, 2017.....42
- Figura 4- Recinto de *Callithrix* no Criadouro Conservacionista Arca de Noé. Visão externa (A), Visão interna (B). Fonte: SURITA, 2016.....42
- Figura 5- Acesso venoso periférico em veia femoral de *Callithrix* (A). Sistema Baraka adaptado para *Callithrix* (B). Fonte: ALIEVI, 2016.45
- Figura 6- Posicionamento dos campos operatórios após antissepsia do sítio cirúrgico em *Callithrix*.Fonte:ALIEVI,2016.....46
- Figura 7- Exposição de cordão espermático durante vasectomia em *Callithrix*. Fonte: SURITA, 2016.....48
- Figura 8- Dupla ligadura em ducto deferente de *Callithrix* durante vasectomia. Fonte: ALIEVI, 2016.48
- Figura 9- Contenção física de *Callithrix* para colheita de sêmen por vibroestimulação peniana (PVS). Fonte: WALTER, 2016.50
- Figura10- Exposição e higienização de pênis e prepúcio em *Callithrix* (A); Vibroestimulação peniana utilizando microtubo plástico adaptado em escova de dentes elétrica (B). Fonte: SURITA, 2016.50
- Figura 11- Ejaculado obtido por vibroestimulação peniana em *Callithrix*.51
- Figura 12- Escores modificados de dureza da ereção (EHSS) em *Callithrix* avaliada em

dois níveis: nenhuma alteração ou leve aumento na rigidez peniana (A); aumento moderado na rigidez peniana ou completamente rígido (B). Fonte: ALIEVI, 2016..... 51

Figura 13- Tempo cirúrgico médio e desvio padrão dos grupos ORQ (orquiectomia) e VAS (vasectomia) (p=0,009)..... 53

Figura 14- Evolução do tempo cirúrgico médio dos grupos ORQ (orquiectomia) e VAS (vasectomia). 54

Figura 15- Tempo de estimulação médio e erro padrão das diferentes tentativas de colheita de sêmen em *Callithrix* orquiectomizados. 56

Figura 16- Tempo de estimulação médio e erro padrão das diferentes tentativas de colheita de sêmen em *Callithrix* vasectomizados. 56

Figura 17- Número total de saguis que apresentaram ereção peniana durante as tentativas de colheita de sêmen por vibroestimulação peniana (VPS). 57

Figura 18- Número total de saguis que apresentaram ereção peniana nas tentativas de colheita de sêmen por VPS que resultaram em ejaculação. 58

Figura 19- Presença de ereção peniana nos grupos ORQ (orquiectomia) e VAS (vasectomia) nas diferentes tentativas de colheita de sêmen. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Evolução do tempo cirúrgico nos grupos VAS (vasectomia) e ORQ (orquiectomia).	54
Tabela 2 - Tempo médio de colheita de sêmen para cada espécime de <i>Callithrix</i> , conforme a técnica de esterilização cirúrgica utilizada.....	55
Tabela 3 - Presença e ausência de espermatozóides no ejaculado em diferentes testes realizados após orquiectomia e vasectomia.	59

LISTA DE SÍMBOLOS

PVS	Vibroestimulação peniana
cm	centímetros
gr	gramas
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
CDB	Convenção Internacional sobre Diversidade Biológica
CETAS	Centros de Triagem de Animais Silvestres
ECO-92	Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento
PNH	Primatas não humanos
PNM	Primatas do Novo Mundo
EE	Eletroejaculação
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
FSH	Hormônio folículo-estimulante
LH	Hormônio luteinizante
µL	Microlitros
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
SEPEC	Setor de Ensino e Pesquisas Cirúrgicas
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
IM	via intramuscular
MPA	medicação pré-anestésica
mL	mililitro
mg	miligrama
kg	quilograma
Hz	Hertz
TALP	Tirode- albumina-lactato-piruvato
HEPES	(<i>N</i> -(2-hidroxiethyl)piperazina- <i>N</i> '-(2-ácido etanosulfônico)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Geral:	20
2.2 Específicos:	20
3. REVISÃO	21
3.1 Aspectos taxonômicos	21
3.2 Conservação	22
3.2.1 Espécie invasora	23
3.3 Aspectos reprodutivos	25
3.3.1 Anatomia Reprodutiva	27
3.3.2 Fisiologia Reprodutiva	30
3.4 Métodos Cirúrgicos de Contracepção Masculina	33
3.4.1 Orquiectomia	33
3.4.2 Vasectomia	34
3.5 Colheita de Sêmen	37
3.5.1 Ejaculação	39
3.5.2 Ereção peniana	39
3.6 Calitriquídeos como modelo de pesquisa	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Seleção dos Animais	41
4.1.1 Critérios de Inclusão	43
4.1.2 Critérios de Exclusão	43
4.1.3 Grupos	43
4.1.4 Avaliação pré-cirúrgica	43
4.1.5 Manutenção dos calitriquídeos em cativeiro	43
4.2. Contenção em viveiro coletivo	44
4.3 Pré-operatório e procedimento anestésico	44
4.4 Procedimentos cirúrgicos	46
4.4.1 Orquiectomia	46
4.4.2 Vasectomia	47
4.5 Cuidados pós-operatórios e acompanhamento clínico	49

4.6 Colheita de sêmen	49
4.6.1 Ereção peniana	51
4.6.1 Espermograma	52
4.7 Análise estatística	52
5. RESULTADOS	53
5.1 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos	53
5.2 Colheita de sêmen e análise	55
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

O Brasil detém a maior diversidade de primatas neotropicais do mundo e apresenta 30% dos seus primatas em ameaça de extinção. A introdução de animais exóticos em ambientes distintos da sua área de ocorrência natural pode transformar a estrutura e a composição da fauna de um ecossistema, causando perda da biodiversidade. Atualmente, populações introduzidas de sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) e sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) vêm causando inúmeros problemas em diversos estados brasileiros prejudicando a sobrevivência de espécies nativas, muitas vezes ameaçadas, através da competição por recursos alimentares e refúgio. Além disto, o excesso populacional de algumas espécies de calitriquídeos mantidas em cativeiro é um problema enfrentado por zoológicos e criatórios brasileiros. Desta forma, impedir a chegada de espécies exóticas invasoras e/ou promover sua erradicação, através de planos de manejo que contemplem técnicas de contracepção, é uma estratégia importante para conservação ambiental.

No entanto, ainda é necessário reunir informações básicas sobre a reprodução e fertilidade destas espécies a fim de implementar um programa de manejo reprodutivo efetivo e voltado ao bem-estar animal. Dentre os métodos contraceptivos permanentes está a esterilização cirúrgica, sendo a vasectomia a técnica mais indicada atualmente para primatas não humanos (PNH) por eliminar o potencial reprodutivo mantendo a função testicular. Costuma-se não indicar a orquiectomia como método de eleição por haver a possibilidade de rupturas na estrutura de hierarquia social e, em alguns casos, perda de características sexuais secundárias. Apesar disto, sabe-se que a orquiectomia é amplamente utilizada como método de controle populacional em cativeiro.

Não existem estudos sobre impactos na estrutura social, no comportamento reprodutivo ou determinando em quanto tempo o macho, após a esterilização cirúrgica, poderia voltar ao convívio do grupo sem risco de cópula fértil. Sendo assim, a proposta do presente estudo foi contribuir para o manejo reprodutivo de calitriquídeos, analisando a viabilidade de duas técnicas de esterilização cirúrgica, orquiectomia e vasectomia, em *C. penicillata* e *C. jacchus*, relacionando o tempo decorrido entre o procedimento cirúrgico e a detecção da azoospermia, observada através de colheitas de sêmen seriadas pelo método de vibroestimulação peniana (PVS).

A atividade de pesquisa proposta pela pós-graduanda foi realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e aos demais órgãos de pesquisa

da Faculdade de Veterinária e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O projeto foi executado no Parque Zoológico de Sapucaia do Sul, Sapucaia do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil; no Criadouro Conservacionista Arca de Noé, Morro Reuter, Rio Grande do Sul, Brasil e no Setor de Ensino e Pesquisas Cirúrgicas (SEPEC) da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Contribuir para o controle populacional dos calitriquídeos mantidos em cativeiro e de vida livre, buscando determinar o método de colheita de sêmen de melhor aplicabilidade e a técnica de esterilização com menor interferência na fisiologia reprodutiva dos animais.

2.2 Específicos:

- Avaliar a viabilidade da técnica de vasectomia em *C. penicillata* e *C. jacchus*, conforme descrito para cães e gatos.

- Avaliar a viabilidade da técnica de orquiectomia em *C. penicillata* e *C. jacchus*, conforme descrito para cães e gatos.

- Estabelecer um protocolo seguro e eficaz para colheita de sêmen, por vibroestimulação peniana (PVS), em *C. penicillata* e *C. jacchus*.

- Determinar o prazo, após a esterilização cirúrgica, para que se obtenha ausência total de células espermáticas no ejaculado.

3. REVISÃO

3.1 Aspectos taxonômicos

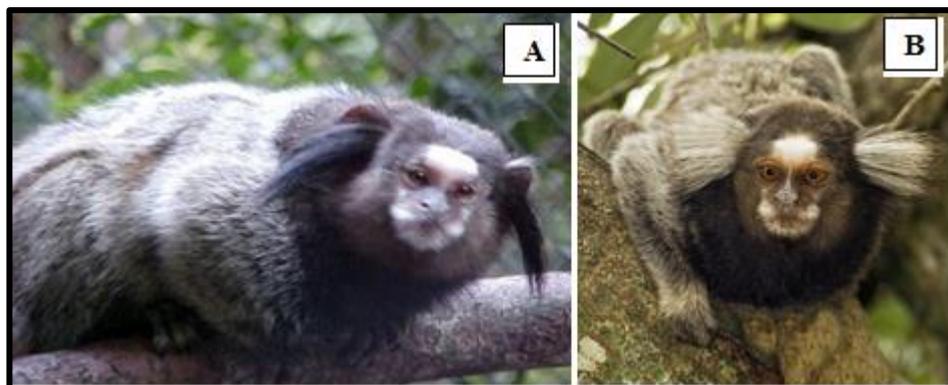
A Ordem Primates é composta pelas subordens Strepsirrhini e Haplorrhini. Na primeira estão incluídos os primatas menos evoluídos (os prossímios) e a segunda subordem é formada por duas superfamílias: Tarsiioidea (társios) e Anthroipoidea, sendo esta dividida nas infraordens Catarrhini (primatas do Velho Mundo) e Platyrrhini (primatas do Novo Mundo ou primatas neotropicais) (ANDRADE *et al.*, 2010; BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011).

Conforme proposto por Rylands *et al* (2012), a infraordem Platyrrhini é formada por cinco famílias (Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae e Pitheciidae) e 20 gêneros (*Alouatta*, *Aotus*, *Ateles*, *Brachyteles*, *Cacajao*, *Callibella*, *Callimico*, *Callithrix*, *Callicebus*, *Cebuella*, *Cebus*, *Chiropotes*, *Lagothrix*, *Leontopithecus*, *Mico*, *Oreonax*, *Pithecia*, *Saguinus*, *Saimiri*, *Sapajus*), com ampla distribuição geográfica.

O gênero *Callithrix* é composto, atualmente, por seis espécies: *Callithrix penicillata*, *C. jacchus*, *C. aurita*, *C. flaviceps*, *C. geoffroyi* e *C.kuhlii*. Todas estas espécies são endêmicas no Brasil e 50% destas correm risco de extinção (*C. aurita*, *C. flaviceps*, *C.kuhlii*) (FORD; PORTER; DAVIS, 2009).

Saguis-de-tufo-preto (*C. penicillata*) e saguis-de-tufo-branco (*C. jacchus*) (FIGURA 1) são primatas da família Callitrichidae, chamados popularmente de micos ou sagüis. Uma característica marcante desta família é a presença de ornamentos na cabeça como tufos, cristas, juba e bigodes, que aparecem em várias espécies. Possuem garras nos membros torácicos e pélvicos, que auxiliam a escalada de troncos de árvores, bem como o forrageamento de insetos e pequenos vertebrados. Apresentam mandíbula e dentes diferenciados e especializados que perfuram troncos de árvores em busca de exsudatos, látex ou goma das árvores (VERONA; PISSINATTI, 2014). Medem cerca de 30 cm de corpo, possuem cauda longa e não prênscil e seu peso varia de 230 a 420 gr. São animais altamente prolíferos, geram de um a três filhotes/parto e sua gestação é de 140 a 148 dias. Vivem aproximadamente 10 anos na natureza e 16 anos em cativeiro (AURICCHIO, 1995; FORD; PORTER; DAVIS, 2009).

Figura 1 Exemplar de sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) (A) Exemplar de sagui-de-tufo-branco (*C. jacchus*) (B). Fonte: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).



Estão naturalmente distribuídas do nordeste ao norte do rio São Francisco e a leste do rio Parnaíba, mas são comumente encontradas em zoológicos e instituições mantenedoras de fauna silvestre (VERONA; PISSINATTI, 2014). São primatas arborícolas que podem habitar vegetação secundária, perturbada e fragmentada, devido a grande flexibilidade alimentar (BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011).

Ainda hoje, o sistema de organização social dos *Callithrix* não está completamente estabelecido e, além disto, a condição de cativeiro introduz possíveis alterações no seu comportamento social e reprodutivo.

3.2 Conservação

O Brasil possui uma das maiores diversidades de primatas do mundo com 116 espécies conhecidas, sendo 48,4% de toda a diversidade de macacos do mundo (REIS *et al.*, 2015). No entanto, a crescente pressão antrópica sobre as populações selvagens provoca uma drástica diminuição e, muitas vezes, a extinção de espécies, antes mesmo de serem conhecidas (RYLANDS *et al.*, 2001). Estima-se que 26 espécies e subespécies de primatas não humanos estejam ameaçadas de extinção no País (VALLE, 2007). O aquecimento global, a destruição ou fragmentação de *habitats*, a introdução de espécies exóticas nos ecossistemas e a caça contribuem para este quadro (AURICCHIO, 1995).

Espécies exóticas invasoras podem transformar a estrutura e a composição da fauna de um ecossistema por repressão ou exclusão de espécies nativas e pela alteração na forma com que nutrientes circulam através do sistema. Solturas clandestinas vêm

contribuindo para o estabelecimento dessas populações invasoras e, dentre os primatas exóticos introduzidos desta forma, destacam-se algumas espécies de saguis. A introdução de animais exóticos em ambientes distintos da sua área de ocorrência natural é considerada a segunda principal causa de perda da biodiversidade, superada apenas pela supressão de ambientes naturais, e, portanto, manejar estas espécies é uma estratégia importante para conservação ambiental (AURICCHIO, 1995).

As Unidades de Conservação devem ser consideradas com especial atenção, pois a presença de espécies exóticas invasoras nessas áreas é incompatível com a conservação da biodiversidade e dos recursos naturais e devem ser objeto de erradicação ou de controle permanente. Invasões biológicas tendem a crescer indefinidamente ao longo do tempo e devem ser redobrados os cuidados para impedir a chegada de espécies exóticas invasoras e/ou promover a erradicação destas (LEÃO *et al.*, 2011).

Desta forma, técnicas de contracepção são importantes ferramentas de manejo reprodutivo a fim de controlar o número de indivíduos de espécies que não fazem parte dos programas de reprodução em cativeiro, no entanto, ainda é necessário reunir informações básicas sobre reprodução e fertilidade destas espécies.

3.2.1 Espécie invasora

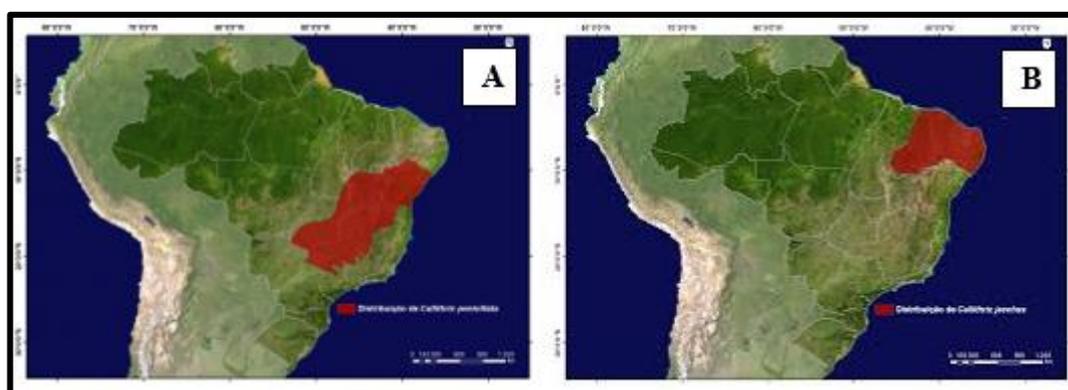
Uma espécie é considerada exótica (ou introduzida) quando situada em um local diferente do de sua distribuição natural por consequência de ações humanas. Se a espécie introduzida consegue se reproduzir e gerar descendentes férteis, com alta probabilidade de sobreviver no novo hábitat, ela é considerada estabelecida. Caso a espécie estabelecida expanda sua distribuição no novo hábitat, ameaçando a biodiversidade nativa, ela passa a ser considerada uma espécie exótica invasora. Essas definições fornecidas pela Convenção Internacional sobre Diversidade Biológica (CDB) são utilizadas como referência para a construção de políticas públicas pelos países signatários, como o Brasil. Desta forma, no âmbito das espécies exóticas invasoras, o País deve impedir que sejam introduzidas e controlar ou erradicar espécies exóticas que ameacem ecossistemas, hábitats ou espécies (LEÃO *et al.*, 2011). As espécies invasoras são, atualmente, vistas como um elemento significativo nas mudanças ambientais globais e como a segunda maior ameaça à diversidade biológica (SANTOS *et al.*, 2007).

Esta fauna invasora representa perigo, pois espécies exóticas invasoras podem

produzir híbridos ao cruzar com espécies nativas e eliminar genótipos originais, competem por alimento com espécies nativas, aumentando os riscos de extinção de populações locais e é considerada uma ameaça ao equilíbrio ecológico (PRYMACK; RODRIGUES, 2001).

As espécies sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) e o sagui-de-tufo-branco (*C. jacchus*) ocorrem originalmente na Região Nordeste do Brasil, do nordeste ao norte do Rio São Francisco e leste do Rio Parnaíba (FIGURA 2) (AURICCHIO, 1995).

Figura 2 Área de distribuição natural de sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) (A) Área de distribuição natural de sagui-de-tufo-branco (*C. jacchus*) (B). Fonte: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).



Estas espécies foram introduzidas em diversas regiões do Brasil, em locais originalmente distintos de suas áreas de ocorrência natural, ocupando fragmentos florestais, parques e praças. São encontradas nas regiões sul e sudeste do Brasil desde a década de 1980, configurando espécies invasoras (RYLANDS *et al.*, 2001). Atualmente as duas espécies podem ser encontradas em todo o território nacional, gerando um descontrole populacional em vida livre e em instituições mantenedoras da fauna silvestre.

Os saguis possuem várias características biológicas que os fazem invasores potenciais, tais como, hábitos alimentares generalistas, flexibilidade comportamental e alta taxa de reprodução. Além disto, saguis filogeneticamente próximos hibridizam gerando indivíduos altamente adaptados e viris em meio natural (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Esta alta capacidade adaptativa associada ao grande número de animais provenientes de vida livre que chegam aos zoológicos, criadouros e Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), gera um grande número de excedentes e torna a reprodução destas espécies em cativeiro inviável (PAZ; TEIXEIRA; GUIMARÃES, 2005).

Pesquisas realizadas no Estado do Rio de Janeiro, entre 1998 e 2000, indicam que

o tamanho da população de espécies invasoras de saguis em vida livre excedeu a dos micos-leões, que ocorrem naturalmente na região (OLIVEIRA *et al.*, 2008). No Paraná, as espécies de *C. penicillata* e *C. jacchus* introduzidas estão causando desequilíbrio e deslocamento das espécies nativas, devido à competição por abrigo e limitação de recursos alimentares. A introdução dessas espécies também já foi notificada no Estado de Santa Catarina (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Além disto, pesquisadores observaram que uma espécie sob ameaça de extinção e endêmica da Mata Atlântica, o *Callithrix aurita*, vem sofrendo processo de hibridização com as espécies acima citadas (RYLANDS; CHIARELLO, 2003).

O sagui (*C. jacchus*) é apontado como um dos principais reservatórios do vírus da raiva silvestre no Brasil, desta forma, também é necessário que se tenha atenção em relação à agressão de pessoas por saguis, uma vez que é comum a identificação destes animais criados como animais de estimação (AURICCHIO, 1995).

A Convenção sobre a Diversidade Biológica, assinada durante a ECO-92, determinou que cada parte contratante deve controlar e erradicar espécies exóticas que ameçassem os ecossistemas ou espécies. O Brasil, como signatário desta Convenção, prevê na sua Política Nacional de Biodiversidade a erradicação e o controle de espécies exóticas invasoras e de espécies problema que ameaçam a biodiversidade. Desta forma, a erradicação deve assegurar a melhor opção de manejo para espécies invasoras, assegurando-se que os métodos empregados sejam humanos e éticos, embora consistentes no propósito de eliminar a espécie em questão (OLIVEIRA, 2005).

3.3 Aspectos reprodutivos

Espécies pertencentes à Ordem Primates apresentam grande variação tanto nos aspectos morfológicos fenotípicos, quanto nos comportamentais e endócrino-reprodutivos. Possuem grande capacidade adaptativa respondendo aos desafios ambientais com múltiplos sistemas de acasalamento, diferentes tipos de ciclos ovarianos e mecanismos de ovulação, além de hábitos sociais complexos (GUIMARÃES, 2007). Um único macho é capaz de produzir uma grande quantidade de gametas, e assim, fertilizar inúmeras fêmeas. Formam grupos compostos por dois a 13 indivíduos, com mais de um par de adultos, jovens e infantes, mas normalmente com apenas uma fêmea reprodutora (BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011). Relata-se que a longevidade

das espécies aqui estudadas pode chegar a 15 anos, em condições de cativeiro (VERONA; PISSINATTI, 2014).

Segundo Guimarães (2007), espécies como o sagui-de-tufo-branco possuem ciclos ovarianos do tipo estral, porém acasalam em qualquer fase do ciclo. A fêmea reprodutora possui ciclos ovarianos normais, suprimindo a ovulação das fêmeas subordinadas através da liberação de feromônios (BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011). A função testicular dos machos subordinados é suprimida pelo macho dominante através de mecanismos neuroendócrinos (ABBOTT *et al.*, 2003). O ciclo reprodutivo das fêmeas é de aproximadamente 30 dias, sendo que o período fértil corresponde a três dias. O período de gestação é de aproximadamente cinco meses e, dada à ausência da supressão lactacional da ovulação, esta ocorre duas a quatro semanas após o nascimento dos filhotes. Como consequência desse fato, o intervalo entre nascimentos pode variar de cinco a seis meses (BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011; VERONA; PISSINATTI, 2014). Estudos em vida livre sugerem que os nascimentos ocorrem de agosto a novembro ou de abril a junho. Porém, em cativeiro os nascimentos podem ocorrer o ano todo (VERONA; PISSINATTI, 2014). Normalmente dão à luz a gêmeos dizigóticos, mas também podem ocorrer nascimentos de um ou três filhotes (BICCA-MARQUES; SILVA; GOMES, 2011). Em vida livre, os saguis do gênero *Callithrix* podem viver em diversos sistemas de acasalamento tais como poliândricos (fêmea copula com vários machos em um mesmo ciclo menstrual), poligênicos (várias fêmeas reproduzem com um único macho) e monogâmicos (apenas um casal reproduz), apresentando como característica social o cuidado cooperativo da prole, particularmente pelos machos adultos (ANDRADE *et al.*, 2010).

A presença de híbridos em ambiente natural foi descrita por Alonso *et al.* (1987). Em cativeiro, foram realizados cruzamentos entre *C. penicillata* e *C. jacchus*, onde foram obtidas até três gerações férteis de híbridos (COIMBRA-FILHO, 1978).

Uma vez que a cópula em primatas nem sempre ocorre com o objetivo de reprodução, mas também como uma estratégia sociosexual, o conhecimento das características reprodutivas dos primatas é essencial para que se possa programar melhoria na qualidade de vida destes animais mantidos em cativeiro, assim como, aplicar com sucesso técnicas de controle populacional (ANDRADE *et al.*; 2011). O comportamento reprodutivo dos primatas pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles o número de indivíduos no grupo, relação macho-fêmea, ocorrência de competição espermática e organização social (ANDRADE *et al.*; 2011). Um estudo

realizado por Barino *et al.* (2007) observou que, quando estudados em cativeiro, o comportamento reprodutivo de *Callithrix jacchus* varia de acordo com as características do ambiente em que está inserido, não apresentando sazonalidade reprodutiva quando mantido em alojamento com macroambiente controlado. Para *C. penicillata* há uma carência de informações na literatura acerca da sazonalidade na reprodução em cativeiro.

Pesquisas na área da reprodução de primatas não humanos, tanto com objetivos clínico-cirúrgicos como conservacionistas, devem ser desenvolvidas com o intuito de viabilizar o conhecimento acerca da biologia reprodutiva de espécies invasoras, aplicando esta informação à reprodução e ao controle reprodutivo de espécies não ameaçadas (SOUZA-ARAÚJO, 2012).

Estes primatas mantidos em cativeiro nos zoológicos, centros de primatologia e criatórios têm um importante papel na área de educação ambiental e pesquisa biomédica e, com isto, vem a responsabilidade ética de proporcionar aos animais cuidados veterinários adequados e bem-estar. Desta forma, programas voltados para conservação são fundamentais, para tanto, é necessário obter conhecimentos a respeito da biologia e dos aspectos relacionados à reprodução das espécies em questão. Apesar de espécies do gênero *Callithrix*, especialmente *Callithrix jacchus*, serem cada vez mais utilizadas na pesquisa biomédica, o seu comportamento especializado e fisiologia reprodutiva ainda não são bem conhecidos.

3.3.1 Anatomia Reprodutiva

Os órgãos reprodutores de machos de primatas não humanos são semelhantes tanto em anatomia quanto em fisiologia aos órgãos sexuais de machos humanos (SETCHELL; BREED, 2006). Os machos de todas as espécies de PNM apresentam vesículas seminais, próstata, glândulas bulbouretrais, um escroto, dois testículos, dois epidídimos, dois cordões espermáticos, dois ductos deferentes, um pênis e um prepúcio (GUIMARÃES, 2014).

O escroto é um saco de tecido musculo-cutâneo que recobre os testículos e está localizado na região perineal nos saguis. É formado por duas camadas, uma externa e uma interna. A externa refere-se à pele, e a interna é a túnica dartos, formada por musculatura lisa, fibras elásticas e colágenas com função de auxiliar na termorregulação. Internamente à túnica dartos, revestindo o testículo, existe uma membrana serosa chamada de túnica

vaginal, que é uma extensão do peritônio que atravessa a parede abdominal pelo canal inguinal e está dividida em duas lâminas: parietal e visceral, sendo importantes na orquiectomia. O escroto contém os testículos, que são separados por um septo mediano em duas cavidades, ocupado por um testículo, pelo seu epidídimo e pela parte distal do funículo espermático. Aderido ao escroto passa o músculo cremáster, um prolongamento em forma de fita do músculo oblíquo abdominal interno, que aproxima ou afasta o escroto da cavidade abdominal (COLVILLE, 2010).

Além do prepúcio, a genitália externa dos primatas possui outras estruturas especializadas e presentes para todos os primatas como o corpo cavernoso do pênis. A vesícula seminal possui importantes funções nos primatas não humanos, como sintetizar o líquido ou fluido seminal, onde os espermatozóides estarão suspensos na ejaculação. Este líquido contém proteínas que reagem com a enzima prostática (vesiculase) e causam a coagulação seminal produzindo um *plug* copulatório firme após a ejaculação (GUIMARÃES, 2014).

A seleção sexual via competição espermática ocorre em sistemas em que a fêmea acasala com vários machos e resultou em testículos proporcionalmente grandes e em vesículas seminais maiores do que os machos que vivem em sistemas monogâmicos (ANDRADE *et al.*, 2010). Em saguis os testículos são grandes em relação ao tamanho do corpo e estão alojados externamente ao abdômen, dentro de uma estrutura em forma de bolsa, derivada da fâscias musculares da parede abdominal, denominada escroto (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). A posição dentro do escroto e a direção do eixo longitudinal dos testículos variam de acordo com cada espécie. Em saguis, o escroto é de formato globular ou piriforme e o pênis, curto e cilíndrico, projeta-se para dentro de um prepúcio curto, derivado da pele escrotal, e a mesma é geralmente grossa e glandular. A secreção destas glândulas escrotais exala o cheiro característico dos saguis (TEIXEIRA, 2005). Cada testículo fica suspenso separadamente pelo funículo espermático, um feixe de estruturas que inclui o ducto deferente, vasos e nervos, envoltos por um revestimento duplo de peritônio.

O testículo é um órgão com função exócrina, relacionada com a produção, armazenamento e transporte de espermatozóides, e função endócrina relacionada com a produção de hormônios andrógenos como a testosterona. É subdividido em dois compartimentos – tubular e intertubular – compostos por tipos celulares que desempenham funções distintas (SETCHELL; BREED, 2006; MURTA, 2013). O parênquima testicular é constituído de túbulos seminíferos e tecido intersticial e está

envolto, sob pressão moderada, em uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea, de forma que a incisão nesta cápsula ocasiona a protrusão do testículo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Esta túnica envia trabéculas de tecido conjuntivo (os septos testiculares) de forma espécie específica, para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo-o em lóbulos (COSTA; SILVA 2006). O tecido intersticial é composto por aglomerados de células intersticiais ou de Leydig, sustentados por uma rede de tecido conjuntivo, por onde passam vasos sanguíneos e linfáticos. O epitélio dos túbulos seminíferos consiste de células espermatogênicas e células de sustentação ou de Sertoli, que apresentam propriedades tanto de nutrição quanto de produção hormonal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O testículo está unido ao epidídimo pelo ligamento próprio do testículo. O epidídimo consiste em um ducto dividido em cabeça, corpo e cauda com base na estrutura de seu epitélio e desemboca no ducto deferente (SETCHELL; BREED, 2006). Possui um importante papel na maturação dos espermatozóides, embora esta função seja menos documentada em primatas não humanos (YEUNG *et al.*, 1996). O epidídimo também desempenha uma importante função no transporte, concentração, proteção e armazenamento dos espermatozoides, além de ser o local onde adquirem mobilidade. O principal local de armazenamento de espermatozóides em mamíferos é a cauda do epidídimo (SETCHELL; BREED, 2006). Nos saguis o epidídimo tem a metade do comprimento do testículo, a cauda é grande, constituindo quase a metade do órgão. Como continuação da cauda do epidídimo surge o ducto deferente, cuja primeira porção é contorcida, mas logo se retifica e se encontra com as outras estruturas para formar o funículo espermático, entre a porção cranial dos testículos e o anel vaginal (inguinal) externo. Apresenta um envoltório fibroso (TEIXEIRA, 2005).

Algumas espécies, como *Callithrix jacchus*, apresentam espículas penianas bem desenvolvidas em torno dos receptores táteis do pênis que contribuem para maximizar sua habilidade copulatória ao permitir a maximização do estímulo sexual no momento da cópula. A relação entre os níveis séricos de andrógenos e a presença e o desenvolvimento das espículas já foi comprovada, uma vez que as mesmas desaparecem após a castração e ressurgem com a aplicação exógena de testosterona (GUIMARÃES, 2014).

3.2.2 Fisiologia Reprodutiva

O testículo desempenha uma importante função na produção e secreção de andrógenos. A testosterona é um hormônio masculino, tradicionalmente associado à agressão, embora esta relação possa ser menos determinista do que comumente retratado (BERCOVITCH, 1993). Estimula a espermatogênese e é responsável pela libido do animal (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Poucos estudos abordam o papel dos hormônios sexuais no comportamento social de calitriquídeos machos em cativeiro e, além disto, informações relativas aos níveis plasmáticos de testosterona em primatas do Novo Mundo são escassas (CASTRO; SOUSA, 2005). Sabe-se que, além das funções relacionadas à fisiologia reprodutiva, os hormônios sexuais são moduladores do comportamento sociosexual de primatas, contribuindo para a expressão de diferentes estratégias reprodutivas de machos e fêmeas (BARBOSA *et al.*, 2007).

Moreland *et al.* (2001), estudaram a fisiologia reprodutiva de machos de *Alouatta caraya*, através da colheita e análise do sêmen por eletroejaculação (EE) e dosagem de testosterona nas fezes e constataram que as características do sêmen foram similares entre machos de diferentes idades e os níveis de testosterona nas fezes foram constantes ao longo do ano.

Segundo Phoenix (1977) o comportamento sexual masculino não está somente sob controle gonadal, uma vez que anos após realização de orquiectomia, machos de macacos rhesus podem apresentar penetração vaginal e mostrar reflexo ejaculatório. A redução dos níveis de testosterona acarreta declínio na frequência do comportamento sexual, mas os machos ainda são capazes de apresentar toda a sequência da cópula (ANDRADE *et al.*, 2010). Entretanto, em grupos sociais com vários machos pode-se mitigar, pela posição social adotada pelo animal orquiectomizado no grupo, o grau de influência da remoção dos hormônios testiculares sobre a dinâmica do grupo.

Uma vez que a fertilidade masculina é resultado de uma complexa sincronia entre fisiologia, endocrinologia e comportamento reprodutivo, as decisões a serem tomadas para se iniciar ações de manejo de uma espécie dependem de dados sobre sua biologia e, desta forma, o conhecimento e a compreensão das características endócrino-reprodutivas dos primatas são essenciais para que seja possível aplicar com sucesso técnicas de controle populacional (DURRANT, 1990; GUIMARÃES, 2007). Diversos estudos têm sido desenvolvidos visando o estabelecimento dos valores fisiológicos de referência para

características reprodutivas de primatas do Novo Mundo, no entanto, esses dados ainda são escassos para a maioria dos pequenos primatas. Algumas técnicas não invasivas para extrações e dosagens de metabólitos fecais e urinários de esteróides sexuais vêm viabilizando a análise de aspectos comportamentais, suas relações com os hormônios e o ambiente de cativeiro e sua influência no desempenho reprodutivo de animais silvestres (FRENCH *et al.*, 1992; GUIMARÃES, 2007).

O conhecimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é a chave para o entendimento da fisiologia reprodutiva do macho (RODRIGUES, 2010). A ação dos hormônios hipotalâmicos (GnRH) sobre a hipófise anterior desencadeia a produção de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteizante (LH).

A produção da testosterona dá-se pela ação do LH sobre as células de Leydig dos testículos, havendo uma pequena produção do hormônio pelo córtex adrenal (KRETZER, 1978; HARRISON; KUBISCH, 2005). Aumentos na secreção de LH são seguidos por concentrações sanguíneas aumentadas de testosterona, dentro de 30 a 60 minutos. Em *C. jacchus*, observa-se que o nível sanguíneo de testosterona varia de forma acentuada entre os indivíduos, apresentando flutuação ao longo de 24 horas, com níveis mais altos durante a fase escura, diminuindo na fase de luz (LI; DONALD; GOLUB, 2005). A função deste hormônio esteroide está associada ao desenvolvimento de glândulas sexuais acessórias, estímulo das características sexuais secundárias, libido e espermatogênese. Também interfere na agressividade, no processo de dimorfismo sexual e no sucesso reprodutivo. Os níveis de testosterona estão relacionados ao período reprodutivo, uma vez que os elevados picos estão ligados à agressão sexual e à competição por parceiras, indicando o início da época reprodutiva (RODRIGUES, 2010).

O controle hormonal da espermatogênese é realizado pelas células de Leydig e de Sertoli. Trata-se de um processo biológico altamente eficiente que se inicia com a proliferação das espermatogônias até a formação de espermatozoides maduros (HARRISON; KUBISCH, 2005; FERRAZ, 2015). É caracterizada por divisões mitóticas de espermatogônias, divisões meióticas de espermatócitos produzindo células germinativas haplóides e a diferenciação morfológica e maturação de espermátides (WEINBAUER *et al.*, 2001). O processo de espermatogênese em todos os mamíferos pode ser dividido em três fases que incluem a fase proliferativa (divisão mitótica rápida de espermatogônias), a fase meiótica (diferenciação e divisão meiótica de espermatócitos), e fase espermiogênica (diferenciação de espermátides) (LI; DONALD; GOLUB, 2005). Os espermatozoides não possuem motilidade quando deixam o testículo, tornando-se

férteis após passagem pelo epidídimo e ducto deferente (ALEXANDER, 1972).

Embora exista grande variação no tempo do desenvolvimento das células germinativas, acredita-se que o processo de espermatogênese é semelhante entre as espécies de mamíferos. Assim, a espermatogênese é completada em 64 dias nas espécies domésticas (LIN *et al.*, 2012). Em *Saimiri sciureus* (mico-de-cheiro), o processo completo tem aproximadamente 39 dias e na espécie *C. jacchus*, a espermatogênese tem duração de 37 dias (YEOMAN *et al.*, 1997; MILLAR *et al.*, 2000). Uma vez iniciada a vida reprodutiva, os machos serão capazes de se reproduzir até o fim da vida (GUIMARÃES, 2014).

O número final de espermatozóides produzidos em uma espécie depende de vários fatores, sendo muito baixo em primatas. As espécies de saguis *C. jacchus* e *C. penicillata* possuem processos espermatogênicos semelhantes ao do homem e, por isso, tornaram-se modelos experimentais atrativos (FERRAZ, 2015). Entretanto, as relações entre o tamanho dos testículos, a eficiência da espermatogênese e produção diária de espermatozóides ainda não foram estabelecidos (COSTA; SILVA 2006).

A ereção peniana é um processo fisiologicamente complexo que envolve vias neurológicas, sensoriais e químicas. A estimulação do sistema nervoso parassimpático resulta na contração dos músculos isquiocavernosos e no relaxamento dos corpos cavernosos, altamente vasculares, e dos tecidos do corpo esponjoso. A contração do músculo isquiocavernoso obstrui o fluxo venoso dos tecidos penianos, enquanto que o relaxamento dos tecidos do corpo cavernoso e do corpo esponjoso permite que esses tecidos se encham de sangue. Ereções penianas espontâneas são bem documentadas em macacos machos, na presença ou ausência de fêmeas da mesma espécie, e os mecanismos envolvidos são semelhantes aos dos humanos. A estimulação vibratória da glândula peniana pode ativar os centros autonômicos espinhais e levar ao preenchimento gradual do pênis com sangue arterial, resultando em ereção mesmo em homens com lesões na medula espinhal (HAYES *et al.*, 2016).

O papel fisiológico da testosterona na função sexual masculina, assim como o papel fisiopatológico na disfunção sexual masculina, no caso de privação de andrógenos permanece controverso. Estudos têm proposto uma relação direta entre testosterona livre e a integridade hemodinâmica veno-oclusiva em homens com disfunção erétil. Traish *et al.* (2003) observaram que em coelhos orquiectomizados, ocorre uma redução de 87% na concentração da testosterona plasmática em duas semanas após a castração, repercutindo de forma negativa na função erétil destes animais

3.4 Métodos Cirúrgicos de Contraceção Masculina

Métodos contraceptivos têm sido empregados em PNM como ferramenta para manejo de populações cativas. Um método contraceptivo ideal deve impedir a reprodução, mantendo estável ou reduzindo determinada população (GUIMARÃES, 2014). Informações geradas a partir de estudos nesta área podem contribuir para introdução de programas de manejo reprodutivo baseados nas necessidades comportamentais de cada espécie e voltados ao bem-estar animal.

Medidas biológicas, tais como a esterilização, são métodos de manejo que podem resultar na redução da natalidade. Técnicas de esterilização obtidas através de estudos em cativeiro podem ser adequadas para situações de vida livre após um estudo de campo. Desta forma, o estudo das técnicas de esterilização cirúrgica, bem como das variáveis fisiológicas envolvidas, torna-se útil para futuros programas de controle e erradicação de algumas espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A esterilização cirúrgica de machos, através das técnicas de orquiectomia e vasectomia, é um dos procedimentos mais comumente realizados na prática veterinária de pequenos animais, sendo um método efetivo no controle populacional. Cada técnica oferece vantagens e desvantagens (HOWE, 2006).

Os métodos contraceptivos podem ser divididos em dois grupos: irreversíveis e reversíveis. Métodos irreversíveis carregam a responsabilidade de retirar indivíduos do *pool* genético da população de forma definitiva, sendo, dessa forma, utilizados em casos específicos. Trata-se da aplicação de técnicas cirúrgicas como a orquiectomia e vasectomia. Entre os métodos reversíveis destaca-se o método contraceptivo hormonal, que ainda é considerado experimental para espécies silvestres (GUIMARÃES, 2014).

3.4.1 Orquiectomia

Dentre os métodos cirúrgicos de esterilização, a orquiectomia é uma das alternativas utilizadas em primatas não humanos. No entanto a utilização dessa técnica elimina por completo o animal de futuros programas de reprodução, podendo resultar na perda de importantes linhas genéticas. Outro aspecto a ser ressaltado quanto à utilização da orquiectomia é a possível ruptura da estrutura social do grupo que pode resultar em alterações comportamentais (PAZ; TEIXEIRA; GUIMARÃES, 2005).

Esta técnica pode ser realizada pelos métodos aberto ou fechado, que se referem à abertura ou não da túnica vaginal. Consiste em uma incisão cutânea diretamente sobre cada testículo ou no ápice da bolsa escrotal, efetua-se então incisão do tecido subcutâneo e fáscia espermática, expondo a túnica vaginal externa (SLATTER, 2003; HEDLUND, 2005). Na técnica aberta é realizada incisão da túnica vaginal externa sobre o cordão espermático, no qual são realizadas ligaduras duplas. Na técnica fechada, o cordão espermático é ligado da mesma forma, porém envolvido pela túnica vaginal externa. Utiliza-se a técnica das três pinças, posicionadas da seguinte forma: primeira pinça (proximal), segunda pinça (média) e terceira pinça (distal). A primeira pinça tem como função realizar o esmagamento do tecido para posterior alojamento da ligadura, a segunda pinça oferece segurança no caso de perda do coto e a terceira pinça impede o retorno venoso da parte distal do tecido seccionado. Após o posicionamento das três pinças, realiza-se a incisão do cordão espermático distal às ligaduras e os testículos são removidos (SLATTER, 2003). Embora a técnica aberta ofereça maior risco de contaminação, mostra-se vantajosa pelo fato da ligadura ser colocada diretamente ao redor do pedículo vascular reduzindo o risco de edemas (HEDLUND, 2005; HOWE, 2006).

A orquiectomia bilateral é um método contraceptivo completamente eficaz e a subsequente redução da testosterona circulante se correlaciona com a diminuição de comportamentos sexuais masculinos. As complicações que podem ser observadas no pós-operatório incluem edema, hemorragias e infecção. As hemorragias após a castração podem ser graves e resultar em hemorragia no interior da cavidade abdominal (HOWE, 2006). Em longo prazo é possível observar obesidade e diminuição das características sexuais secundárias em animais orquiectomizados (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

3.4.2 Vasectomia

A vasectomia é um procedimento cirúrgico mais delicado quando comparado à orquiectomia, cuja técnica consiste na interrupção da patência de ambos os ductos deferentes ou retirada da cauda dos epidídimos (epididimectomia) (KUMAR; RAJ, 2012; VERONA; PISSINATTI, 2014). Uma incisão de pele é realizada, seguido por divulsão e isolamento do ducto deferente. Diferentes técnicas podem ser utilizadas, como ligadura do ducto deferente seguida ou não pela secção de um segmento (HEDLUND, 2005). Em pequenos mamíferos, uma abordagem inguinal ou pré-escrotal é descrita (LAFORTUNE

et al., 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Neaves (1974) avaliou técnicas de vasectomia em ratos, onde o procedimento foi realizado unilateralmente, através de secção do ducto deferente, com e sem a ligadura das estruturas. Três meses após o procedimento cirúrgico, a análise de ambos os testículos não demonstrou diferenças significativas quanto à concentração espermática, apontando que a vasectomia possui pouca influência neste parâmetro.

Em humanos, trata-se de um procedimento ambulatorial seguro, realizado sob anestesia local e usado em todo o mundo como uma opção de método contraceptivo masculino. Após a cirurgia é recomendado o uso de um método contraceptivo alternativo até a obtenção da azoospermia, no entanto, depois de detectada a ausência de espermatozoides no líquido seminal, a taxa de gravidez indesejada após a vasectomia é inferior a 1%. Alguns homens relataram desconforto testicular após a vasectomia (MATHEW; BANTWAL, 2012).

Os efeitos da vasectomia sobre a espermatogênese permanecem controversos. Alguns pesquisadores afirmam não haver nenhum efeito em humanos, camundongos, macacos, coelhos ou ratos, enquanto que outros estudos observaram efeitos significativos em cães, cobaias, hamsters, humanos e macacos. Em humanos a produção de células da série espermatogênica permanece após a vasectomia, podendo esta técnica ser revertida cirurgicamente com retorno de espermatozoides para o ejaculado em cerca de 87% dos casos (PENG *et al.*, 2002). No entanto, um estudo realizado com macacos rhesus (*Macaca mulatta*) demonstrou que a vasectomia, em longo prazo, causa alterações morfológicas e funcionais no epidídimo e ducto deferente. Em animais intactos, o epitélio dos ductos deferentes é formada por um número aproximadamente igual de células ciliadas e não-ciliadas que contém lipídeos complexos associados às mitocôndrias e macrófagos são raramente encontrados no ducto deferente. Em animais vasectomizados, o número de células ciliadas é reduzido, os complexos lipídicos característicos estão ausentes e os espermatozoides aglutinam-se no lúmen do ducto deferente, onde são fagocitados por macrófagos (ALEXANDER, 1972). Existem relatos de que a vasectomia pode afetar a função secretora da próstata, diminuindo o volume do ejaculado em longo prazo em primatas não humanos e homens (PENG *et al.*, 2002).

Alexander (1981) não encontrou diferença nas taxas de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH), estrona, diidrotestosterona (DHT), estradiol ou testosterona entre machos de *Macaca mulatta* vasectomizados e controle (inteiros), avaliados durante 13 anos. Também observou que a vasectomia não influenciou no

comportamento sexual destes animais. Por outro lado, doenças andrógeno-dependentes e comportamentos sexuais indesejáveis provavelmente continuarão a ocorrer com esta técnica de esterilização (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Como a esterilização é obtida sem que as taxas circulantes de testosterona reduzam, o animal vasectomizado forma uma barreira reprodutiva na população, pois continua competindo com os machos intactos pelas fêmeas, colaborando no controle populacional. Estudos com gatos de rua comprovam ser a vasectomia a melhor opção quando se trabalha com controle populacional (HOWE, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Existe controvérsia na literatura quanto ao tempo para obtenção de azoospermia pós-vasectomia nas diferentes espécies. Em cães, Oliveira *et al.* (2012) e Hedlund (2005) afirmam que os espermatozoides permanecem no ejaculado por mais três semanas após a vasectomia, enquanto que Paula (2010) relata a obtenção de azoospermia na primeira ejaculação, realizada sete dias após a cirurgia, e Santos *et al.* (2012) obteve azoospermia no terceiro dia após a cirurgia. A vasectomia foi descrita em machos de *Sapajus apella* por Teixeira, Paz e Guimarães (2003), sugerindo que é necessário um período de 105 dias após a cirurgia para determinar a condição estéril nesta espécie. Nos felinos, entretanto, os espermatozoides permanecem no ejaculado por até sete semanas (HEDLUND, 2005).

Há uma carência de relatos envolvendo vasectomia em primatas não humanos, apesar de ser uma técnica alternativa para o controle reprodutivo destes animais por manter a produção de células da série espermatogênica (PENG *et al.*, 2002). Desta forma, técnicas de reprodução assistida como Fertilização *in vitro* (FIV) ou Injeção Intra-Citoplasmática (ICSI) poderiam ser utilizadas, através de sêmen coletado do epidídimo de machos vasectomizados (PAZ, TEIXEIRA; GUIMARÃES, 2005).

Estudos baseados em vasectomias experimentais revelam diferenças marcantes nas respostas ao procedimento em diferentes espécies (ALEXANDER, 1981). Em ratos já foram observados formação de granulomas no sítio cirúrgico e criptorquidismo como complicação pós-operatória (NEAVES, 1974). Em coelhos e cobaias relata-se o desenvolvimento de orquite (ALEXANDER, 1981). Observou-se criptorquidismo em alguns animais como complicação pós-operatória, principalmente quando utilizado o acesso abdominal.

Para Morris e David (1993) a vasectomia representa o método de esterilização masculina com menor possibilidade de afetar o comportamento de saguis mantidos em cativeiro. No entanto, informações sobre esta técnica cirúrgica em saguis ainda são escassas.

3.5 Colheita de Sêmen

A colheita e análise do sêmen é uma forma de avaliar o desempenho reprodutivo de primatas não humanos (VERONA *et al.*, 2009). Diversos métodos de colheita em animais silvestres têm sido descritos, tais como: eletroejaculação transretal (EE), lavagem vaginal, vibroestimulação peniana, vagina artificial, masturbação peniana e a punção do epidídimo (OLIVEIRA *et al.*, 2012; SOUZA-ARAÚJO, 2012). A vibroestimulação peniana (PVS) e a eletroejaculação transretal são os dois principais métodos utilizados para obtenção de ejaculados em primatas não humanos, no entanto, a PVS tem sido mais utilizada recentemente por representar um método menos invasivo de realizar a colheita em pequenos primatas (HORST, 2005; VIDAL *et al.*, 2007; SOUZA-ARAÚJO, 2012).

A lavagem vaginal após cópula natural exige intensa observação e pode sofrer contaminação com o muco do trato genital feminino (ISHIBASHI; MOTOHASHI, 2013). A coleta de sêmen pelo método da vagina artificial (VA) tem como vantagem a possibilidade de obter-se uma amostragem frequente sem a necessidade de contenção química ou física. Esta técnica é bem reportada para chimpanzés (*Pan troglodytes*) e gorilas (*Gorilla gorilla*) (DURRANT, 1990). Em estudo realizado com chimpanzés, os animais foram condicionados pelos pesquisadores a fim de permitir a colheita de sêmen pelo método de masturbação. A ejaculação ocorreu em todos os indivíduos em um tempo máximo de 2 minutos (MARSON *et al.*, 1988).

A obtenção de sêmen do epidídimo é possível durante a orquiectomia ou mediante dissecação cirúrgica, porém, esta abordagem é invasiva e não pode ser repetida (VERONA *et al.*, 2009; ISHIBASHI; MOTOHASHI, 2013). Portanto, este é o último recurso, utilizado somente quando outros métodos não são possíveis (ISHIBASHI; MOTOHASHI, 2013). Os espermatozóides colhidos por esta técnica diferem dos colhidos pelas demais por não haver exposição ao plasma seminal (MORRELL; KUDERLING; HODGES, 1996).

A eletroejaculação transretal é considerada um método seguro e apropriado para a colheita de sêmen de animais selvagens, incluindo primatas não humanos, 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; MORELAND *et al.*, 2001). Ishibashi e Motohashi (2013) afirmam que esta técnica tem sido amplamente utilizada em espécies de primatas maiores, como

as do Velho Mundo, mas não é amplamente utilizada em saguis, por se tratar de um método invasivo e que requer anestesia. Por outro lado, estudos realizados por Vidal *et al.* (2007) e Verona *et al.* (2009) concluíram que a EE é um método eficaz e seguro para a colheita de sêmen em *C. jacchus*, embora possa seguir um fluxo retrógrado e um grande número de espermatozoides ser direcionado para a bexiga. Essa técnica tem sido utilizada em espécies como *Sapajus apella*, *Callithrix jacchus*, *Alouatta caraya*, *Ateles sp.*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Saimiri boliviensis*. A voltagem e o número de estimulações necessárias para a ereção e ejaculação é afetada pelo plano anestésico do animal. Em geral, quanto mais profundo o plano anestésico, maior estímulo é necessário e, desta forma, alguns tranquilizantes e anestésicos não são indicados (DURRANT, 1990). Mollineau *et al.* (2008) relataram que apenas 31,3% das amostras colhidas por EE em cutias (*Dasyprocta leporina*) continham espermatozoides suficientes para análise. Embora esta seja a técnica mais indicada para algumas espécies, em todos os estudos acima citados, as amostras apresentaram uma baixa qualidade espermática.

A PVS é um método de colheita seminal que vem sendo utilizado com bastante sucesso em espécies de primatas não humanos de pequeno porte, tais como *C. jacchus* e *S. boliviensis* (KUEDERLING *et al.*, 2000). Utiliza-se como equipamento uma unidade vibratória adaptada com um tubo que servirá como uma vagina artificial (YEOMAN *et al.*, 1997). O objetivo deste método é ativar o reflexo ejaculatório na região toracolombar da medula espinhal, através da estimulação do nervo dorsal peniano (SONKSEN; OHL, 2002). O sêmen obtido por PVS apresenta melhor qualidade e menor quantidade de coágulo seminal do que quando colhido por EE em *S. boliviensis* (YEOMAN *et al.*, 1997). Em *C. jacchus*, a concentração espermática, o número total de espermatozoides no ejaculado e o percentual de espermatozoides vivos obtidos por PVS é maior do que quando colhidos por EE (SCHNEIDERS; SONKSEN; HODGES, 2004). Esta técnica é utilizada para colheita de sêmen em homens com injúrias na coluna vertebral (VALLE, 2007). Em primatas não humanos, a estimulação vibratória peniana (PVS) tem sido descrita como um método alternativo para colheita de ejaculado, por se tratar de um método não invasivo e que permite colheitas seriadas com uma boa qualidade de sêmen (ISHIBASHI; MOTOHASHI, 2013). Durrant (1990) afirmou que esta técnica é a mais eficaz para colheita de um grande número de amostras do mesmo indivíduo, entretanto, o sucesso da colheita está vinculado diretamente ao operador.

3.5.1 Ejaculação

A ejaculação é um processo complexo, neurologicamente mediado e independente da ereção, composto por emissão seminal, oclusão do colo da bexiga e ejaculação anterógrada (VIDAL *et al.*, 2007). O reflexo ejaculatório tem influência aferente da sensação tátil através dos nervos dorsais do pênis e também dos estímulos eróticos dos centros cérebro-corticais. O cérebro, a medula espinhal, os elementos simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autônomo e os elementos motores (eferentes) e sensoriais (aferentes) dos nervos periféricos participam na iniciação, elaboração e coordenação da ejaculação. As atividades da inervação simpática e parassimpática da ejaculação são complementares, e não antagônicas (SONKSEN; OHL, 2002). Enquanto os estímulos simpáticos resultam na emissão do sêmen para a uretra e no fechamento do colo da bexiga, os estímulos parassimpáticos decorrentes da medula espinhal sacral (S2-S4) estimulam a propulsão anterógrada do fluido seminal (VIDAL *et al.*, 2007).

O ejaculado de primatas não humanos consiste em duas frações principais: fração líquida e coágulo seminal (HORST, 2005). Pode assumir consistências variadas (desde fluido até *plug* copulatório) conforme o tipo de acasalamento da espécie. Em regimes monogâmicos, em que a fêmea tem somente um parceiro sexual, o *plug* tende a ser menos consistente ou ausente, em contraste com regimes poligâmicos, quando atinge consistência quase sólida, agindo como um mecanismo de seleção sexual. O *plug* ou coágulo seminal se molda no contorno da vagina da fêmea após a cópula, atuando como uma barreira que impede a inseminação por outros machos. Este coágulo é a porção de maior concentração espermática do sêmen, portanto, o principal desafio é estabelecer um diluidor que promova a dissolução do coágulo seminal e mantenha a viabilidade espermática (DOMINGUES *et al.*, 2011).

O volume de ejaculado depende de diversas variáveis, tais como método de colheita, período de descanso entre colheitas e tamanho da espécie. Em *C. jacchus* o volume médio é de 31,9µl (KUEDERLING *et al.*, 2000).

3.5.2 Ereção peniana

A resposta erétil dos mamíferos depende da dilatação das arteríolas que transportam sangue para os corpos cavernosos (PALESE; CRONE; BURNETT, 2003). Em situações normais, um estímulo sensor aferente do pênis, através do nervo pudendo,

atinge a medula espinhal toracolombar (T11-L2), de onde é encaminhado ao córtex cerebral (SONKSEN; OHL, 2002).

Em um estudo realizado por Vidal *et al.* (2007), 10 saguis machos adultos foram submetidos à eletroejaculação, obteve-se ejaculados em todos os animais, porém, 17,5% deles não apresentaram ereção peniana.

3.6 Calitriquídeos como modelo de pesquisa

Nos últimos anos, a primatologia tem sido uma área de grande interesse científico em face da similaridade anatômica, fisiológica e etológica observada entre os primatas não-humanos e humanos (AURICCHIO, 1995). Neste contexto, os calitriquídeos já foram usados em pesquisas nas áreas biomédicas e comportamental e demonstraram valor como espécies modelo para as diversas áreas do conhecimento humano. Entre as vantagens estão o baixo custo de aquisição, o tamanho, a produção regular de gêmeos e maturidade precocemente atingida em aproximadamente 21 meses de idade (ABBOTT *et al.*, 2003).

Oerke *et al.* (1996) também destacaram a grande utilidade de *C. jacchus* para estudos científicos, graças às suas características de alta adaptabilidade e fertilidade em cativeiro. Além de ser amplamente usado em pesquisas biomédicas como animais experimentais, ele tem sido utilizado na biologia da conservação como um modelo para as espécies ameaçadas. As espécies de saguis *C. jacchus* e *C. penicillata* são primatas do Novo Mundo que, por possuírem processos espermatogênicos semelhantes ao do homem, tornam-se modelos experimentais atrativos (HORST, 2005). Entretanto é consenso que ainda são necessários estudos sobre anatomia, fisiologia e patologia dos calitriquídeos buscando maior conhecimento para contribuir com os programas de conservação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à aprovação pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBIO por meio da autorização para atividades com finalidade científica número 53262 e autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS) sob o número 31546.

Todos os procedimentos foram realizados nas instituições mantenedoras dos animais incluídos no projeto e no Setor de Ensino e Pesquisas Cirúrgicas da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SEPEC/FAVET/UFRGS).

Como as espécies aqui estudadas não apresentam sazonalidade reprodutiva optou-se pelo segundo semestre para realização do respectivo estudo.

4.1 Seleção dos Animais

Os animais deste estudo foram provenientes de dois mantenedores de fauna regulamentados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA): o Parque Zoológico de Sapucaia do Sul, Sapucaia do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil (FIGURA 3); e o Criadouro Conservacionista Arca de Noé, Morro Reuter, Rio Grande do Sul, Brasil. Nas duas instituições, os animais foram mantidos segundo diretrizes do IBAMA para manutenção destas espécies em cativeiro e, durante o estudo, tratados pelos princípios éticos na experimentação animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Figura 3: Recinto de *Callithrix* no Parque Zoológico de Sapucaia do Sul. Visão externa (A), Visão interna (B). Fonte: WOLF, 2017.



Figura 4: Recinto de *Callithrix* no Criadouro Conservacionista Arca de Noé. Visão externa (A), Visão interna (B). Fonte: SURITA, 2016.



Foram utilizados 12 exemplares de calitriquídeos, machos, pertencentes às espécies sagui-de-tufo-preto (*C. penicillata*) e sagui-de-tufo-branco (*C. jacchus*), com idade superior a 21 meses e com peso entre 255 e 420 gramas. Destes, 11 eram alojados nas instituições de origem em grupos familiares de dois a cinco animais, em recintos externos, com acesso a luz e ar naturais, e mantinham contato visual, olfatório e auditivo entre si e com as fêmeas. Enquanto que um deles possuía tutor e era mantido isolado em viveiro.

Todos os animais foram identificados através da leitura de seus microchips, implantados anteriormente próximo à região interescapular, no subcutâneo.

4.1.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos saguis-de-tufo-preto (*C. penicillata*) e saguis-de-tufo-branco (*C. jacchus*) machos, hípidos, com idade superior a 21 meses, quando a maturidade sexual é atingida, e que apresentavam os dois testículos no saco escrotal (ABBOTT *et al.*, 2003; MANSFIELD, 2003). Os espécimes utilizados no experimento não haviam sido submetidos a nenhum procedimento anterior de esterilização cirúrgica e já eram mantidos em condições de cativeiro há mais de dois anos antes do início do experimento.

4.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos animais com sinais de enfermidades ou má formação na genitália externa, com idade inferior a 21 meses e que já haviam sido submetidos à esterilização cirúrgica anteriormente.

4.1.3 Grupos

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos com seis indivíduos e submetidos aos seguintes procedimentos de esterilização cirúrgica:

- Grupo ORQ: composto por seis saguis, submetidos ao procedimento de orquiectomia.
- Grupo VAS: composto por seis saguis, submetidos ao procedimento de vasectomia.

4.1.4 Avaliação pré-cirúrgica

Antes dos procedimentos cirúrgicos, foram realizados exame clínico e avaliação hematológica (hemograma) visando à padronização das condições clínicas gerais de saúde para amostrar somente animais hípidos. Em relação ao prepúcio e pênis, nenhum dos exemplares apresentou anormalidades.

4.1.5 Manutenção dos calitriquídeos em cativeiro

Os recintos seguiram o modelo de cada instituição e o manejo de limpeza e alimentação também foi realizado conforme o protocolo já utilizado anteriormente ao experimento.

Quando encaminhados ao SEPEC, foram mantidos em recintos com as medidas de 60cmx70cmx60cm, ornados com galhos, o piso recoberto com papel absorvente e os animais tiveram à disposição uma caixa para abrigo (caixa-ninho), um comedouro e um bebedouro. A higienização dos recintos foi realizada duas vezes ao dia. A água do bebedouro foi substituída duas vezes ao dia garantindo o consumo *ad libitum* e os itens alimentares foram oferecidos conforme indicação de Stasienuk (2009):

- Alimentação da manhã: banana, frutas da época, legumes, hortaliças e ovo.
- Alimentação da tarde: ração MegaZoo P25.

Durante o experimento, os saguis foram identificados através da leitura dos microchips e numeração dos recintos.

4.2. Contenção em viveiro coletivo

No criatório de origem, os animais foram capturados no interior dos viveiros com o auxílio de puçás de malha fina e, mantendo-os dentro da malha, foram contidos manualmente com o uso de luvas de couro e transferidos para caixas de contenção e transporte. Estas caixas foram levadas até a sala de manejo, onde os animais foram pesados em balança digital de precisão¹ e contidos novamente com o uso de luvas de couro para a realização da colheita de sêmen por vibroestimulação peniana. O valor de massa corporal foi obtido pelo peso da caixa com o animal, descontado o peso da caixa vazia.

4.3 Pré-operatório e procedimento anestésico

Antes dos procedimentos cirúrgicos, os indivíduos, submetidos a um jejum prévio de 12 horas, foram capturados com puçá e a contenção química realizada a partir da aplicação de uma associação de tiletamina e zolazepam² (7,5mg.kg⁻¹) e metadona³ (0,1mg.kg⁻¹), mantidos na mesma seringa e administrados por via intramuscular (IM)

¹ W30, Welmy®, Indústria e Comércio Ltda., Santa Bárbara do Oeste/SP, Brasil

² Zoletil, Laboratório Virbac do Brasil, São Paulo/SP, Brasil

³ Mytedon, Cristália, Itapira/SP, Brasil

como medicação pré-anestésica (MPA), seguido por pré-oxigenação (GIANNICO *et al.* 2013).

Após cerca de 5 minutos da MPA, obteve-se acesso venoso na veia femoral com cateter intravenoso periférico 24G⁴ e a indução anestésica foi realizada com propofol⁵ na dose de 5mg.kg⁻¹ por via intravenosa. Na medida em que os reflexos palpebrais, interdigitais e laringotraqueais foram perdidos, 0,1ml de lidocaína 2% sem vasoconstritor⁶ foi instilada topicamente na laringe. Em seguida, realizou-se intubação orotraqueal com sonda uretral 06⁷ adaptada e o plano anestésico foi mantido com isoflurano⁸ vaporizado em oxigênio 100% e administrado em circuito anestésico semi-aberto por meio do sistema Baraka adaptado, utilizando aparelho de anestesia inalatória (vaporizador universal) conforme sugerido por Giannico *et al.* (2013) e Prestes *et al.* (2014).

Figura 5: Acesso venoso periférico em veia femoral de *Callithrix* (A). Sistema Baraka adaptado para *Callithrix* (B). Fonte: ALIEVI, 2016.



A monitorização transoperatória foi realizada pela mensuração das frequências cardíaca e respiratória, verificação do reflexo palpebral, saturação de oxigênio através de oximetria de pulso e pelo traçado eletrocardiográfico. A temperatura corporal foi aferida antes do início da cirurgia e logo após o término da mesma.

Como profilaxia antimicrobiana foi administrado ampicilina sódica⁹ (22mg.kg⁻¹)

⁴ Cateter, BD, Curitiba/PR, Brasil

⁵ Provive 1%, Claris Produtos Farmacêuticos, São Paulo/SP, Brasil

⁶ Xylestesin 2%, Cristália, Itapira/SP, Brasil

⁷ Sonda uretral, BioSani, Arapoti/PR, Brasil

⁸ Isoforine, Cristália, Itapira/SP, Brasil

⁹ Ampicilina Veterinária Injetável, Vetnil, Porto Alegre/RS, Brasil

por via intravenosa, 10 minutos antes do procedimento cirúrgico.

Durante a recuperação anestésica, os saguis foram acomodados em caixas de transporte individuais até a completa recuperação anestésica quando foram devolvidos aos seus respectivos recintos de origem.

4.4 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados nas instituições de origem de cada animal selecionado e nas instalações do SEPEC.

Tanto a vasectomia como a orquiectomia foram realizadas com o paciente posicionado em decúbito dorsal, sobre colchão térmico¹⁰. Foi realizada tricotomia da região periescrotal e inguinal e a antisepsia do sítio cirúrgico realizada com gluconato de clorexidine 4%¹¹. A área operatória foi delimitada pelo posicionamento dos campos operatórios, compostos por um campo plástico e campos de algodão (FIGURA 6).

Figura 6: Posicionamento dos campos operatórios após antisepsia do sítio cirúrgico em *Callithrix*. Fonte: ALIEVI, 2016.



4.4.1 Orquiectomia

Para os procedimentos de orquiectomia foi utilizada a técnica escrotal aberta conforme descrito por Hedlund (2005) com incisão única na linha média escrotal.

Após estabilização dos testículos na região escrotal, uma incisão de pele e tecido subcutâneo de aproximadamente um centímetro foi realizada na linha média escrotal, com

¹⁰ Ortovet, São Paulo/SP, Brasil

¹¹ Vic pharma, Taquaritinga/SP, Brasil

lâmina de bisturi nº 15¹² acoplada em cabo de bisturi nº3, permitindo a abertura de ambas as fâscias espermáticas com exposição da túnica vaginal parietal. Em seguida, a túnica vaginal parietal foi incisada, exteriorizando o testículo com discreta tração. O ligamento da cauda do epidídimo foi separado digitalmente da túnica vaginal visceral, expondo os vasos espermáticos para a realização da técnica aberta proposta para ligadura e hemostasia.

Após, foi realizado o pinçamento do cordão espermático utilizando-se três pinças Halsted curvas, posicionadas da seguinte forma: primeira pinça (proximal), segunda pinça (média), terceira pinça (distal). Seccionou-se entre a segunda e terceira pinças, permitindo a remoção do testículo. Em seguida, proximal à primeira pinça, realizou-se dupla ligadura englobando o cordão vascular e ducto deferente com poliglactina 910¹³, número 4-0, e a primeira pinça foi removida. A segunda pinça foi então retirada, observando-se a adequada hemostasia. O cordão espermático foi recolocado na túnica e o outro testículo removido da mesma forma.

O sítio operatório foi lavado com solução salina isotônica estéril e a dermorráfia foi realizada em padrão isolado simples com fio mononáilon¹⁴, número 4-0 e ferida cirúrgica foi ocluída com cola cirúrgica aplicada sobre a incisão.

4.4.2 Vasectomia

Procedeu-se a palpação e localização do funículo espermático seguido por incisão única de aproximadamente um centímetro na pele, sobre o funículo espermático, na linha média ventral, acima da sínfise púbica, aproximadamente um centímetro da borda cranial do escroto. Assim que a túnica vaginal comum foi visualizada, realizou-se divulsão do tecido subcutâneo, localização e exposição do cordão espermático (FIGURA 7).

¹² Solidor, Osasco/SP, Brasil

¹³ Vicryl, Ethicon, Vila Olímpia/SP, Brasil

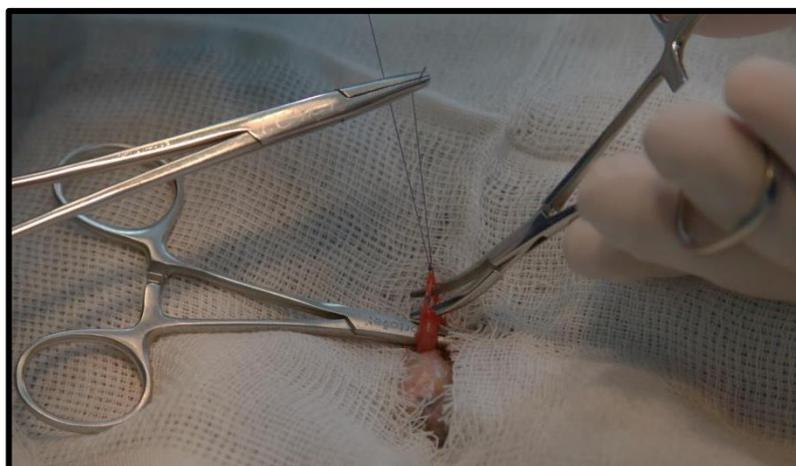
¹⁴ Mononylon, Ethicon, Vila Olímpia/SP, Brasil)

Figura 7: Exposição de cordão espermático durante vasectomia em *Callithrix*. Fonte: SURITA, 2016.



A túnica vaginal foi aberta através de uma pequena incisão, o ducto deferente foi localizado e isolado dos vasos por meio de dissecação roma. Foram aplicadas duas ligaduras no ducto deferente, com fio de poliglactina 910 4-0, a porção entre as ligaduras foi seccionada e um fragmento de cerca de 0,4 cm removido (FIGURA 8). Este procedimento foi realizado bilateralmente. A lavagem do sítio operatório foi realizada com solução salina isotônica estéril e, em seguida, o tecido subcutâneo foi aproximado com o mesmo fio, em padrão contínuo simples e a dermorrafia realizada em padrão isolado simples com fio mononáilon 4-0. Cola cirúrgica foi aplicada sobre a incisão a fim de prevenir automutilação.

Figura 8: Dupla ligadura em ducto deferente de *Callithrix* durante vasectomia. Fonte: ALIEVI, 2016.



4.5 Cuidados pós-operatórios e acompanhamento clínico

No pós-operatório imediato, os animais receberam meloxica¹⁵ na dose 0,2mg.kg⁻¹ pela via intravenosa. Exames clínicos foram realizados semanalmente, antes da colheita de sêmen, e os dados anotados em fichas clínicas individuais. Os parâmetros aferidos foram: peso, temperatura retal, coloração de mucosas, hidratação e ausculta cardio-respiratória. Em relação à ferida cirúrgica, não foram observados secreção, edema, seroma, hemorragia, hematoma, necrose ou infecção, até sua completa cicatrização. Os pontos foram removidos no sétimo dia após a cirurgia.

4.6 Colheita de sêmen

As colheitas de sêmen foram realizadas pelo método de vibroestimulação peniana (PVS), conforme descrito para *Callithrix jacchus* (Kuederling *et al.*, 2000 e adaptado por Valle, 2007). Neste estudo, utilizou-se um microtubo plástico acoplado em escova de dentes elétrica, equipamento este adaptado a partir do vibrador FertiCare® (Multicept ApS, Rungsted, Dinamarca) utilizado por Kuederling *et al.* (2000) e Valle *et al.* (2014) para colheita em *C. jacchus*. O diâmetro interno do microtubo foi adaptado para cada animal com o objetivo de fornecer um contato adequado com o pênis e garantir o nível de estímulo adequado. A técnica de colheita foi adaptada e otimizada a partir do protocolo padronizado por Kuederling *et al.* (2000) e as mesmas realizadas no primeiro semestre do ano de 2016, com intervalo de sete dias entre elas. A primeira colheita foi realizada no dia do procedimento cirúrgico, a fim de assegurar a presença de espermatozóides nos indivíduos a serem testados. Os machos foram separados do seu grupo de origem somente no momento da colheita de sêmen.

Os saguis foram contidos fisicamente, com as patas traseiras ligeiramente dobradas, em postura semelhante à assumida durante o acasalamento (FIGURA 9). Em seguida o pênis e o prepúcio foram expostos e higienizados com solução salina isotônica estéril e uma escova de dentes elétrica com frequência de 117 Hz com microtubo cilíndrico de plástico¹⁶ com bordas arredondadas e fundo cônico adaptado à base foi utilizada como vibrador, de forma que funcionasse como uma vagina artificial (FIGURA 10). Com pênis posicionado dentro do tubo, onde era mantido durante o protocolo de

¹⁵ Maxican 0,2% injetável, Ouro Fino, São Paulo/SP, Brasil

¹⁶ Eppendorf 200µl, Carl, Cotia/SP, Brasil

estimulação, o aparelho era suavemente pressionado contra o orifício prepucial. Os parâmetros vibratórios variaram conforme a resposta de cada animal à estimulação e eram aumentados gradualmente. Caso a ejaculação não fosse alcançada em 20 minutos consecutivos, a estimulação era descontinuada. O tempo de contenção de cada animal não ultrapassou 30 minutos a cada colheita e os procedimentos de colheita de sêmen foram repetidos semanalmente até a obtenção de dois resultados consecutivos negativos para células espermáticas, determinando assim a azoospermia do animal (TEIXEIRA; PAZ; GUIMARÃES, 2003).

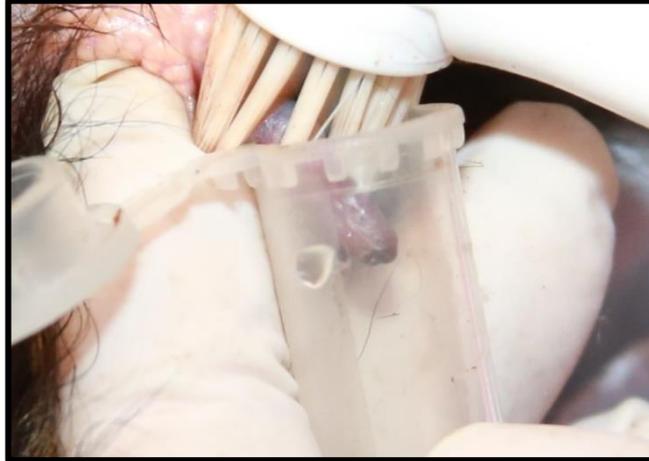
Figura 9: Contenção física de *Callithrix* para colheita de sêmen por vibroestimulação peniana (PVS). Fonte: WALTER, 2016.



Figura 10: Exposição e higienização de pênis e prepúcio em *Callithrix* (A); Vibroestimulação peniana utilizando microtubo plástico adaptado em escova de dentes elétrica (B). Fonte: SURITA, 2016.



Figura 11: Ejaculado obtido por vibroestimulação peniana em *Callithrix*.



Todos os dados referentes às colheitas foram registrados em fichas específicas individuais, onde constavam os dados de identificação do animal, data, tempo de estimulação, se houve ereção e colheita de sêmen, assim como os resultados da análise do ejaculado.

4.6.1 Ereção peniana

A qualidade da ereção foi determinada de forma subjetiva, utilizando escores modificados de dureza da ereção (EHSs) conforme descrito por Hayes *et al.* (2016) com uma escala de dois níveis: nenhuma alteração ou leve aumento observável na rigidez peniana; aumento moderado na rigidez peniana ou completamente rígido (FIGURA 12).

Figura 12: Escores modificados de dureza da ereção (EHSs) em *Callithrix* avaliada em dois níveis: nenhuma alteração ou leve aumento na rigidez peniana (A); aumento moderado na rigidez peniana ou completamente rígido (B). Fonte: ALIEVI, 2016.



4.6.1 Espermograma

Um total de 36 ejaculados foram obtidos de 12 saguis pela técnica de PVS e as amostras foram processados segundo metodologia descrita por Paz et al. (2005), adaptada ao volume da amostra. A análise das amostras de sêmen fresco foi realizada logo após a colheita sempre pelo mesmo observador e o material utilizado para colheita do sêmen apresentava-se aquecido, entre 33 e 37°C.

Após a ejaculação, 200µl do meio TALP HEPES¹⁷, foi adicionado no próprio tubo de colheita devido ao pequeno volume do ejaculado. Uma gota do sêmen diluído foi colocada sobre lâmina aquecida recoberta por lamínula e as lâminas foram exploradas em microscopia de campo claro com aumento de 40X em toda a sua extensão. Esta análise teve como objetivo identificar a presença ou ausência de espermatozóides na amostra.

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com software IBM SPSS versão 22 (SPSS Inc. IBM Company, EUA). Em relação aos tempos de coleta e de ocorrência de ejaculações, utilizaram-se as Equações de Estimções Generalizadas (GEE), com Matriz de correlação trabalho não estruturada, um estimador robusto para a Matriz de covariância, uma resposta com distribuição normal e função de ligação identidade. Para análise entre os grupos dos tempos cirúrgicos e número de coletas até a azoospermia, foi realizado o teste de Mann Whitney. Para a verificação de correlação entre as variáveis tempo de coleta com ocorrência de ereção, foi utilizada a correlação de Spearman. Os resultados das análises de GEE (tempo de coleta e ocorrência de ejaculação) foram expressos em média e erro padrão, enquanto os das análises de Mann Whitney (tempo cirúrgico e número de coletas até azoospermia) foram expressas em média e desvio padrão. O nível de significância considerado foi de 0,05.

¹⁷ Spectrun, São Paulo/SP, Brasil

5. RESULTADOS

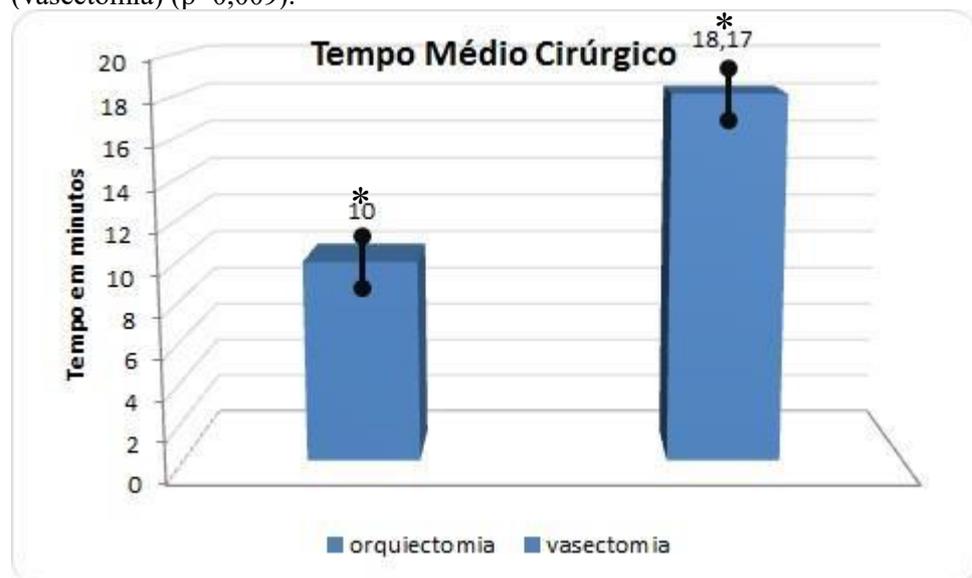
5.1 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

O protocolo anestésico utilizado proporcionou adequado plano anestésico para os procedimentos de orquiectomia e vasectomia em saguis. Todos os animais apresentaram comportamento normal para a espécie logo após a total recuperação anestésica, com ingestão de alimentos e água e ausência de comportamento característico de dor.

A realização de ambas as cirurgias ocorreu sem intercorrências, havendo adequada hemostasia. A incisão na linha média escrotal realizado na orquiectomia permitiu acesso a ambos os testículos com uma pequena incisão de pele. Da mesma forma, a incisão única na linha média ventral utilizada para vasectomia foi adequada para identificação e ligadura de ambos os ductos deferentes, sem a necessidade de realizar outro acesso no mesmo animal.

O tempo cirúrgico total variou de sete a 14 minutos (tempo médio e desvio padrão de $10 \pm 2,82$ minutos) para o grupo ORQ; de 11 a 23 minutos (tempo médio e desvio padrão de $18,17 \pm 4,07$ minutos) para grupo VAS. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos cirúrgicos totais dos dois grupos ($p=0,009$) (FIGURA 13).

Figura 13 Tempo cirúrgico médio e desvio padrão dos grupos ORQ (orquiectomia) e VAS (vasectomia) ($p=0,009$).



O tempo cirúrgico individual dentro de cada grupo está demonstrado na Figura 14 e descrito na Tabela 1. Observa-se que não houve diferença estatística significativa no

tempo de execução das cirurgias dentro do mesmo grupo.

Figura 14: Evolução do tempo cirúrgico médio dos grupos ORQ (orquiectomia) e VAS (vasectomia).

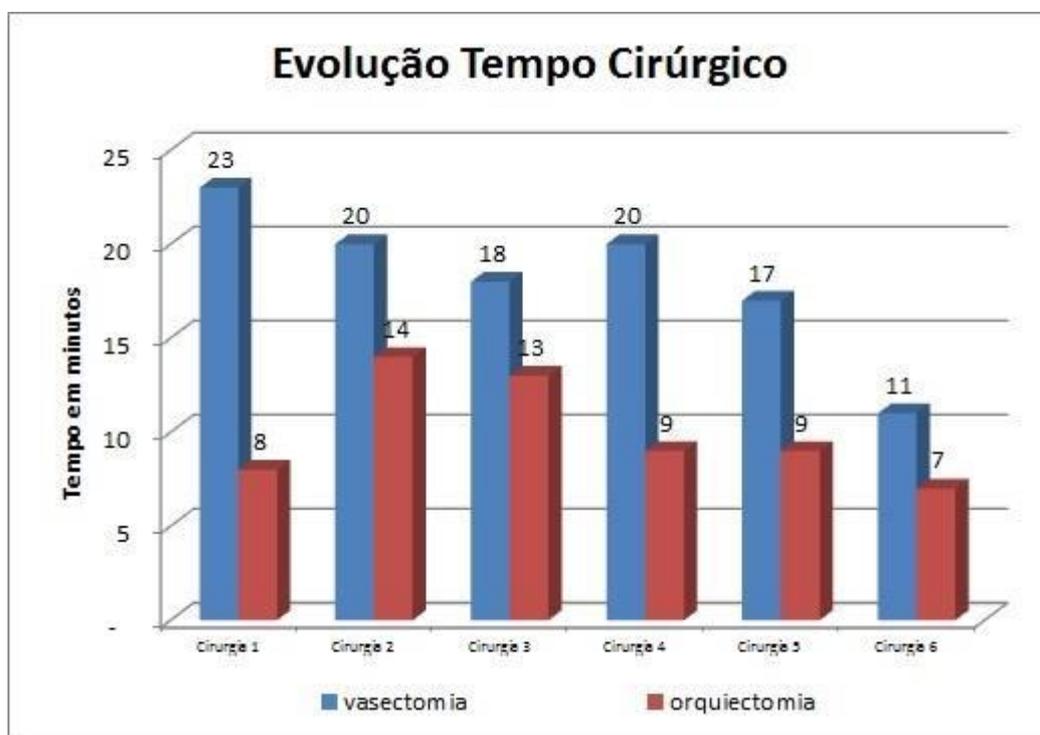


Tabela 1: Evolução do tempo cirúrgico nos grupos VAS (vasectomia) e ORQ (orquiectomia).

	VAS (tempo em minutos)	ORQ (tempo em minutos)
Cirurgia 1	23	8
Cirurgia 2	20	14
Cirurgia 3	18	13
Cirurgia 4	20	9
Cirurgia 5	17	9
Cirurgia 6	11	7
Média	18,17	10

Não foram observados sintomas inflamatórios ou infecção na ferida cirúrgica que, após sete dias do procedimento, apresentava avançado processo cicatricial. Os pontos de sutura foram removidos sete dias após a cirurgia. Nenhum animal apresentou

autotraumatismo no sítio cirúrgico.

Os saguis tiveram boa tolerância em relação ao método de esterilização cirúrgica empregado, não manifestando qualquer comportamento de estresse que pudesse evidenciar dor ou desconforto.

5.2 Colheita de sêmen e análise

O protocolo de estimulação utilizado apresentou resultados positivos, uma vez que as ejaculações foram obtidas em 85,7% das colheitas realizadas por PVS, totalizando 36 amostras de sêmen dos 12 espécimes utilizados, não condicionados anteriormente para colheita de sêmen por este método.

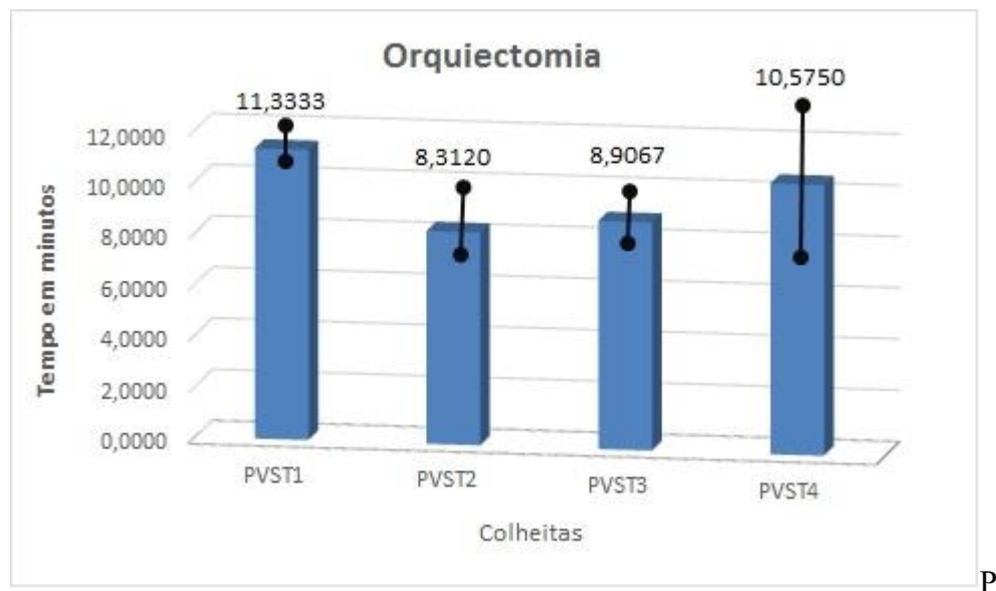
O tempo de estimulação total variou de 0,38 a 19 minutos, com média total e desvio padrão de $7,97 \pm 5,04$ minutos. O grupo ORQ apresentou tempo de estimulação médio e erro padrão de $9,78 \pm 1,65$, enquanto que no grupo VAS foram de $6,41 \pm 0,85$ minutos, não havendo diferença estatística entre os grupos. A Tabela 2 mostra o tempo médio de colheita para cada indivíduo.

Tabela 2 - Tempo médio de colheita de sêmen para cada espécime de *Callithrix*, conforme a técnica de esterilização cirúrgica utilizada.

Espécie	Intervenção Cirúrgica	Tempo Médio Colheita (minutos)
<i>Callithrix penicillata</i>	Orquiectomia	16,5
<i>Callithrix penicillata</i>	Orquiectomia	11
<i>Callithrix jacchus</i>	Orquiectomia	3,42
<i>Callithrix penicillata</i>	Orquiectomia	11,4
<i>Callithrix penicillata</i>	Orquiectomia	9,7
<i>Callithrix penicillata</i>	Orquiectomia	6,62
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	7,41
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	6,83
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	2,56
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	6,19
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	8,61

O tempo de estimulação médio e erro padrão das diferentes tentativas de colheita (T) no grupo ORQ foram $11,33 \pm 1,18$ (T1), $8,31 \pm 2,54$ (T2), $8,90 \pm 1,97$ (T3), $10,57 \pm 5,95$ (T4), não havendo diferença estatística entre as tentativas (FIGURA 15).

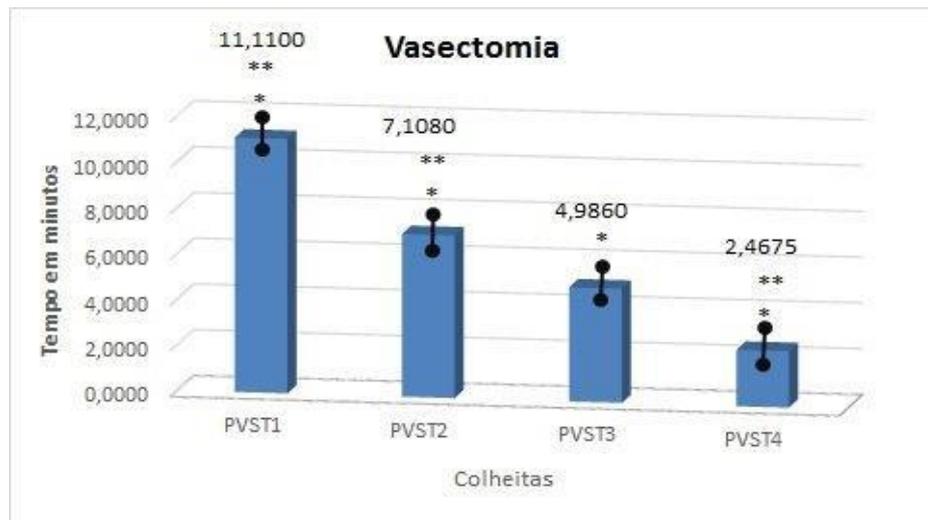
Figura 15 Tempo de estimulação médio e erro padrão das diferentes tentativas de colheita de sêmen em *Callithrix* orquiectomizados.



No grupo VAS, o tempo de estimulação médio e erro padrão das diferentes tentativas foram $11,11 \pm 1,10$ (T1), $7,10 \pm 1,43$ (T2), $4,98 \pm 1,15$ (T3), $2,46 \pm 1,16$ (T4), em que a tentativa T1 foi maior que T2 ($p=0,023$), T3 ($p=0,01$) e T4 ($p<0,001$) e T2 foi maior que T4 ($p=0,018$) (FIGURA 16).

Figura 16 Tempo de estimulação médio e erro padrão das diferentes tentativas de colheita de

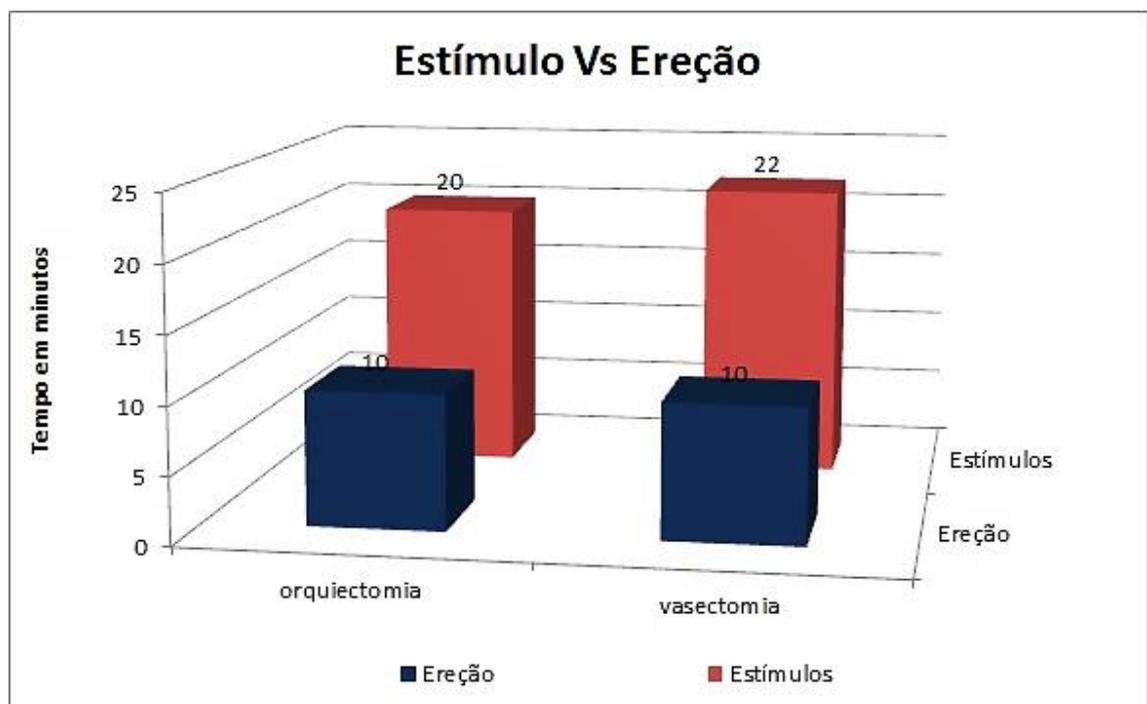
sêmen em *Callithrix* vasectomizados.



Todas as amostras colhidas apresentaram-se com coágulo seminal, o qual representava, praticamente, 100% do volume dos ejaculados (cerca de 0,03ml).

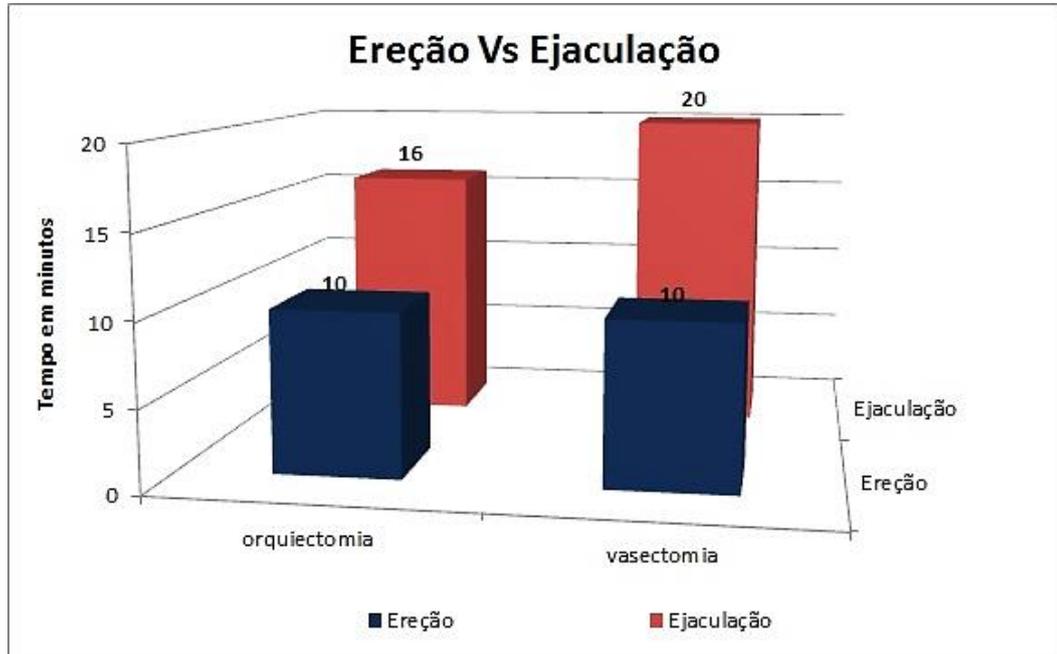
Foi constatada ereção peniana em 47,62% das tentativas de colheita de sêmen, sem diferença estatística entre os grupos ORQ e VAS (FIGURA 17).

Figura 17 Número total de saguis que apresentaram ereção peniana durante as tentativas de colheita de sêmen por vibroestimulação peniana (PVS).



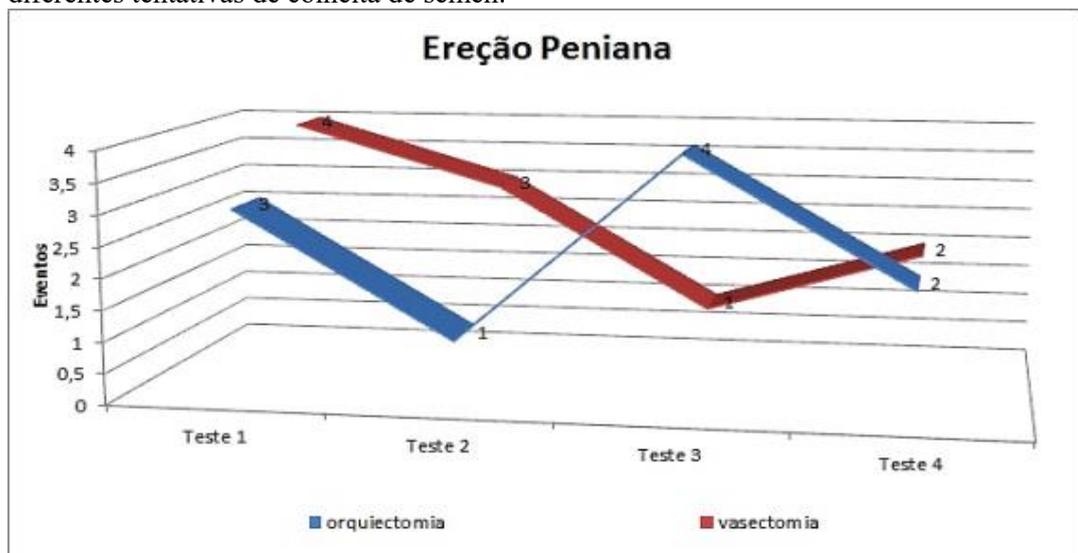
Observou-se ereção peniana em 55,55% das tentativas de colheita que resultaram em ejaculação, sem diferença estatística entre os grupos ORQ e VAS (FIGURA 18).

Figura 18 Número total de saguis que apresentaram ereção peniana nas tentativas de colheita de sêmen por PVS que resultaram em ejaculação.



Não foi observada uma tendência no comportamento relacionado à presença de ereção peniana (FIGURA 19).

Figura 19: Presença de ereção peniana nos grupos ORQ (orquiectomia) e VAS (vasectomia) nas diferentes tentativas de colheita de sêmen.



Quanto à presença de espermatozoides no ejaculado, um indivíduo do grupo ORQ (20%) e dois do grupo VAS (40%) apresentaram espermatozoides na primeira colheita, realizada sete dias após a esterilização cirúrgica. A partir da segunda colheita, realizada

14 dias após a cirurgia, foi possível constatar ausência total de espermatozóides no líquido seminal em todos os animais dos dois grupos (100%). Desta forma, considerando o protocolo de duas amostras consecutivas sem presença de células espermáticas, podemos afirmar que 21 dias após ambos os métodos cirúrgicos de esterilização cirúrgica (orquiectomia e vasectomia) os animais aqui estudados apresentavam-se azoospermicos. Os tempos (dias) para os saguis atingirem a azoospermia estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Presença e ausência de espermatozóides no ejaculado em diferentes testes realizados após orquiectomia e vasectomia.

Espécie	Intervenção Cirúrgica	ET1 (dia 0)	ET2 (dia 07)	ET3 (dia 14)	ET4 (dia 21)
<i>Callithrix penicillata</i>	Orquiectomia	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix penicillata</i>	Orquiectomia	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix jacchus</i>	Orquiectomia	Presente	Presente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix penicillata</i>	Orquiectomia	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix penicillata</i>	Orquiectomia	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix penicillata</i>	Orquiectomia	Presente	Presente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	Presente	Presente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Callithrix penicillata</i>	Vasectomia	Presente	Ausente	Ausente	Ausente

Não foram observadas quaisquer reações adversas nos machos durante todo o período experimental e nem mesmo nos cinco meses subsequentes ao estudo.

6. DISCUSSÃO

As espécies *Callithrix penicillata* e *C. jacchus* foram escolhidas por serem calitriquídeos exóticos invasores com alta capacidade adaptativa e que, portanto, devem ter a sua população controlada em áreas onde não ocorrem naturalmente. Desta forma, a implementação de métodos contraceptivos visando o controle populacional deve fazer parte dos planos de manejo para estas espécies na tentativa de amenizar o impacto ambiental negativo gerado pelo descontrole populacional. Diante disso, o estudo de métodos contraceptivos para o controle populacional de *C. jacchus* e *C. penicillata*, busca uma técnica que seja eficaz, rápida, de baixo custo, pouco invasiva e que leve em conta o bem-estar animal. Os resultados obtidos neste estudo colaboram para o avanço das técnicas de manejo reprodutivo de forma prática, eficiente e de baixo custo para primatas do gênero *Callithrix*.

Os animais foram provenientes de mantenedores de fauna regulamentados IBAMA, o que foi vantajoso para o experimento uma vez que os animais possuíam um controle sanitário e alimentar semelhantes, além de serem acostumados ao manejo. No exemplar com tutor, da mesma forma, era realizado controle sanitário e o mesmo era adaptado ao manejo diário.

O protocolo analgésico e anestésico mostrou ser eficiente e seguro, assim como as adaptações realizadas nos equipamentos, pois proporcionou rápida recuperação sem sinais de desconforto no pós-operatório. Segundo Prestes *et al.* (2014), a associação de tiletamina e zolazepam e metadona em calitriquídeos, nas doses aqui utilizadas, produzem mínimos efeitos sobre o sistema cardiovascular e respiratório e, por isso, pode ser utilizada com segurança. Além disso, o isoflurano proporcionou um adequado controle do plano anestésico dos pacientes.

Optou-se pela utilização de gluconato de clorexidina 4% para antisepsia do sítio operatório devido a sua eficácia como antisséptico, por produzir pouca irritação na pele e por não reduzir a temperatura corporal do animal (EVANS *et al.*, 2009), fatos observados neste experimento já que não foram detectadas alterações cutâneas nos animais ou infecção no pós-operatório. O uso de colchão térmico foi fundamental para manutenção da temperatura corporal e a utilização de campo plástico também contribuiu para a manutenção da temperatura, embora o tempo cirúrgico tenha sido curto.

Os procedimentos de esterilização cirúrgica (orquiectomia e vasectomia) foram estudados com o intuito de comparar sua viabilidade e eficiência para as espécies

estudadas, assim como o tempo cirúrgico na execução das técnicas. O material utilizado na cirurgia de pequenos mamíferos deve ser delicado e, em muitas situações, são utilizados instrumentais oftálmicos no intuito de minimizar lesões nos tecidos moles. Lafortune *et al.* (2004) utilizaram microinstrumentos cirúrgicos e lupas de magnificação para realização de vasectomias em morcegos, no entanto neste estudo utilizamos instrumentais delicados sem a necessidade de magnificação das estruturas anatômicas apesar do tamanho reduzido dos animais.

O tempo cirúrgico no grupo VAS foi estatisticamente maior do que no grupo ORQ, provavelmente devido à delicadeza das estruturas anatômicas que devem ser localizadas e dissecadas na realização da vasectomia. No entanto, o tempo cirúrgico médio no grupo VAS foi inferior ao obtido por Santos *et al.* (2012) (25 minutos) para cães utilizando a mesma técnica aqui relatada. A média de tempo cirúrgico nos dois grupos foi curta e, desta forma, a curva de aprendizado não foi significativa para o cirurgião, ficando evidenciado na comparação entre o tempo de cirurgia do primeiro e último procedimento dentro de cada grupo. Ambos os procedimentos cirúrgicos foram relativamente simples e não ofereceram maiores complicações na execução.

A realização da orquiectomia por incisão única na rafe escrotal, conforme realizado neste estudo, parece ser relevante para a redução do impacto negativo no bem-estar dos saguis durante o período pós-cirúrgico, uma vez que produz apenas uma ferida cirúrgica. Nenhum dos animais apresentou hemorragia com esta técnica, apesar de Oliveira *et al.* (2010) afirmarem que uma incisão única no septo escrotal pode ocasionar hemorragia acentuada e favorecer a formação de hematomas em gatos.

O acesso na linha média ventral, acima da sínfise púbica, foi citado por Morris e David (1993) e possibilitou uma boa exposição do cordão espermático bilateralmente para realização da vasectomia. Nenhuma das complicações relatadas em humanos (hematoma, infecção, granuloma, epididimite ou orquite) foram observadas nos saguis. Embora esta técnica seja passível de reversão em humanos, Peng *et al.* (2002) observaram que a reversão cirúrgica resulta em redução da concentração espermática em humanos. Além disto, danos à espermatogênese são relatados em alguns modelos animais, no entanto, a vasectomia em primatas não humanos é um procedimento seguro no que diz respeito aos efeitos estruturais em órgãos reprodutivos.

Diferentes métodos para a colheita de sêmen em primatas não humanos são citados na literatura entretanto, para PNM, as técnicas de vibroestimulação peniana e eletroejaculação são as mais utilizadas (VERONA *et al.*, 2009). A técnica de

vibroestimulação peniana foi escolhida neste estudo por não ser invasiva, não causar dor e não necessitar de contenção química dos animais.

Neste estudo, obteve-se ejaculado em 85,7% das tentativas de coleta de sêmen pela técnica de PVS, em animais não condicionados, utilizando um microtubo plástico acoplado em escova de dentes elétrica. Este equipamento foi adaptado a partir do vibrador FertiCare® (Multicept ApS, Rungsted, Dinamarca) utilizado por Kuederling *et al.* (2000) e Valle *et al.* (2014) para colheita em *C. jacchus*, onde a taxa de sucesso foi de 35,2% e 83,33%, respectivamente. Schneiders *et al.* (2004) utilizaram o mesmo equipamento em *Saimiri boliviensis* e obtiveram resultado positivo em 80% das tentativas. Viana (2012), entretanto, realizou 293 estimulações por PVS com mesmo aparelho em 12 micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) e obteve 56 ejaculados, com uma taxa de sucesso de 19,11%. O condicionamento dos animais a PVS parece não exercer uma grande influência na obtenção de ejaculados por este método, entretanto, dada a diferença nas taxas de colheita obtidas por diferentes autores que utilizaram o mesmo aparelho como vibrador em animais não condicionados, pode-se afirmar que um maior sucesso na colheita de sêmen por esta técnica parece estar associado a ajustes nas técnicas de contenção e estimulação.

O tempo médio de estímulo até a ejaculação foi de 7,97 minutos, resultado semelhante ao obtido por Kuederling *et al.* (2000) e Valle *et al.* (2014) em colheitas por PVS, e não apresentou diferença significativa entre os grupos ORQ e VAS, nem entre os diferentes testes do grupo ORQ. No grupo VAS, houve redução do tempo de estímulo de forma decrescente e estatisticamente significativa entre os testes, o que pode ser explicado pelo aprimoramento da técnica de colheita que propiciou uma colheita bem-sucedida em um período de tempo cada vez menor. No grupo ORQ, no entanto, não houve diferença significativa nos tempos dos estímulos entre os diferentes testes do grupo, isto poderia estar relacionado à provável redução de testosterona circulante nos animais orquiectomizados o que, segundo Wallen (2001), pode afetar a sensibilidade tátil do pênis.

Viana (2012) afirma que a obtenção da primeira amostra pode ser um fator determinante para a taxa de sucesso do número de ejaculados nas coletas subsequentes, uma vez que *S. sciureus*, ao ejacular pela primeira vez, responderam regularmente aos novos estímulos. Isso não foi observado no presente estudo com duas espécies de calitriquídeos, onde não houve animal que respondeu a todos os estímulos após a primeira ejaculação, embora tenha havido elevação da taxa de sucesso.

O diâmetro interno do microtubo plástico foi adaptado para cada animal a fim de fornecer um contato adequado com o pênis para atingir o nível de estimulação requerido,

da mesma forma que relatado por Valle *et al.* (2014).

O protocolo de estímulo peniano preconizado por Valle (2007) utilizou uma sequência de estímulo com dois ciclos de 60 segundos seguidos por pausa de 30 segundos até a ejaculação ou até que atingisse o tempo máximo de 15 minutos, obtendo taxa de sucesso de 52,6%. Da mesma forma, o protocolo para colheita de sêmen em homens com lesão de coluna também prevê pausa de um minuto a cada período de três minutos de estímulo. No entanto, neste estudo as colheitas foram realizadas sem o intervalo acima descrito, alcançando uma taxa de ejaculado superior ao trabalho acima citado.

O coágulo seminal foi observado em todas as amostras colhidas neste estudo. A coagulação do sêmen em primatas já foi descrita anteriormente, dificultando a avaliação dos ejaculados. (VERONA *et al.*, 2009). O diluente TALP-HEPES foi empregue satisfatoriamente na dissolução do coágulo seminal.

As análises mostraram que a taxa de ereção peniana não diferiu significativamente entre os grupos ORQ e VAS a ponto de influenciar no número de ereções apresentado nos testes em que houve ejaculação. A ereção peniana depende de múltiplos mecanismos fisiológicos, funcionais e anatômicos. Schneiders *et al.* (2004) afirmam que, em saguis, a ereção peniana não é um bom indicador do sucesso na estimulação, o que foi confirmado neste estudo, uma vez que se obteve sucesso em 85,7% das tentativas de colheitas e, destas, apenas 55,55% apresentaram ereção peniana. Como um indicador de estimulação adequada, Valle *et al.* (2014) observaram que os animais empurram a pelve para a frente antes da ejaculação, movimento também observado neste estudo. Segundo Sonksen e Ohl (2002), pode-se observar ereção peniana em homens com lesão na medula espinhal durante colheita de sêmen por PVS, desde que o arco reflexo ejaculatório esteja intacto (acima de T10).

Segundo Wallen (2001), diferente do que ocorre na maioria das espécies de mamíferos, os hormônios gonadais não regulam a capacidade de copular dos primatas, mas influenciam sua motivação sexual. Entretanto, em estudo realizado com ratos, Palese *et al.* (2003) afirmaram existir um mecanismo androgênico-dependente na função erétil veno-oclusiva, uma vez que, durante a estimulação erétil, o fluxo sanguíneo intrapeniano não foi reduzido em ratos castrados resultando em resposta erétil prejudicada. Segundo os autores, isto pode ser explicado pela falha na oclusão venosa devido a compressão passiva de veias emissárias entre a túnica albugínea e o corpo cavernoso devido a ação dos andrógenos no tecido erétil. No entanto, o conhecimento relativo ao controle de androgênio na fisiologia erétil dos primatas não humanos ainda é incerto.

Traish *et al.* (2003) afirmam que a privação de andrógeno pela orquiectomia altera a estrutura e função do tecido erétil do pênis em coelhos por, no entanto, neste estudo as taxas de ereção entre os grupos ORQ e VAS foram semelhantes.

Setchell e Breed (2006), observaram que, quando os animais estão em repouso sexual (ou seja, 7 ou mais dias sem ejaculação), o número de espermatozóides armazenados eram três a cinco vezes maior que a taxa diária de produção. Da mesma forma, o Manual WHO (2010) para análise de sêmen humano indica um período de abstinência sexual mínimo de dois dias e máximo de sete dias entre colheitas do mesmo indivíduo. Entretanto, considerando a logística de manejo, optou-se por um intervalo de 7 dias entre as colheitas. O período de abstinência também não foi observado neste estudo por dificuldades no manejo que impede a separação por períodos prolongados e, desta forma, não é possível afirmar que não houve cópula no intervalo entre as colheitas. Desta forma, os machos foram separados das fêmeas apenas no dia da colheita.

As ejaculações foram repetidamente obtidas em animais orquiectomizados, demonstrando que os mecanismos glandulares da produção de fluido seminal e os mecanismos neurológicos da emissão de sêmen permaneceram funcionais, uma vez que o sêmen é composto predominantemente por secreções da glândula prostática e vesículas seminais (PENG *et al.*, 2002).

Na primeira colheita após vasectomia, 20% dos animais submetidos a orquiectomia apresentavam espermatozóides no sêmen, enquanto que dos animais vasectomizados 40% possuíam espermatozóides na amostra. Em ambos os grupos os espermatozóides apresentaram motilidade e vigor iguais a zero. No entanto, a partir da segunda colheita, foi constatada ausência de espermatozóides em 100% das amostras dos 2 grupos. Este resultado difere do que foi observado por Paz *et al.* (2005) em macacos pregos (*Cebus apella*), onde todos os animais apresentaram espermatozóides com motilidade e vigor iguais a zero na primeira colheita após vasectomia e somente após a terceira colheita pode-se constatar a ausência completa de espermatozóides no líquido seminal de todos os machos vasectomizados. Entretanto, Paula (2010) obteve azoospermia na primeira colheita pós-cirúrgica, realizada sete dias após a intervenção em cães submetidos à vasectomia e orquiectomia.

Não foram observadas quaisquer reações adversas nos machos durante todo o período experimental e nem mesmo nos cinco meses subsequentes ao estudo. Assim, todos os procedimentos de contenção física e farmacológica, assim como a colheita de sêmen, aparentemente, não produziram maiores transtornos à saúde dos animais.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo comparou o tempo ou o período de ocorrência de azoospermia em calitriquídeos, utilizando duas técnicas de esterilização cirúrgica, orquiectomia e vasectomia. Com base nos resultados obtidos com o desenvolvimento do presente estudo é possível concluir:

- ambas as técnicas de esterilização cirúrgica são uma opção eficaz para se obter azoospermia na terceira ejaculação pós-cirúrgica. Desta forma, nossos resultados sugerem que os machos de *Callithrix* devam voltar ao grupo, sem risco de fecundação acidental, 21 dias após os procedimentos cirúrgicos.

- a técnica de vibroestimulação peniana (PVS) utilizando um microtubo plástico adaptado em escova de dentes elétrica, combinado ao protocolo de estimulação sem pausas ou intervalos, é um método inovador, replicável, viável e seguro para a obtenção de sêmen nas espécies aqui estudadas. O aprimoramento de técnicas não invasivas para colheita de sêmen pode apresentar potencial para aplicação em biotécnicas reprodutivas para fins de pesquisa biomédica ou de conservação.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, D.H. *et al.* Aspects of Common Marmoset Basic Biology and Life History Important for Biomedical Research. **American Association for Laboratory Animal Science**, v.53, n.4, p.339-350, 2003.

ALEXANDER, N.J. Vasectomy: long-term effects in the rhesus monkey. **J. Reprod. Fert.**, v.31, p. 399-406, 1972.

ALEXANDER, N.J. Primates: Their Use in Research on Vasectomy. **American Journal of Primatology**, vol.1, p.167-173, 1981.

ALONSO, C. *et al.* Variação da pelagem na área de intergradação entre *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 47, n. 4, p. 465-470, 1987.

ANDRADE, A. *et al.* **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica**, Rio de Janeiro, ed. Fiocruz, 475p, 2010.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**, São Paulo, ed. Terra Brasilis, 168p, 1995.

BARBOSA, M.F.P.P. *et al.* Correlação entre os níveis de hormônios esteroidais e o comportamento sócio-sexual de pares reprodutores de sagüi comum (*Callithrix jacchus*) durante a gravidez. In: MARQUES, J.C.B. **A Primatologia no Brasil**. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Primatologia, v.10, p. 101-118, 2007.

BARINO, G.T.M. *et al.* Perfil reprodutivo de *Callithrix penicillata* em cativeiro. In: MARQUES, J.C.B. **A Primatologia no Brasil**. Sociedade Brasileira de Primatologia: Porto Alegre, v.10, p 511-519, 2007.

BERCOVITCH, F.B. Dominance rank and reproductive maturation in male rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **J. Reprod. Fertil.** vol. 99 n.1, p.113-20, 1993.

BICCA-MARQUES, J.C.; SILVA, V.M.; GOMES, D.F. Ordem Primates. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina:

Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, 2ed., 441p., 2011.

CASTRO, D.C; SOUSA, M.B.C. Fecal androgen levels in common marmoset (*Callithrix jacchus*) males living in captive family groups. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 65-72, 2005.

COIMBRA-FILHO, A. F. Sobre um caso de triplo-hibridismo em *Callithrix* (Callitrichidae, Primates). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n. 1, p. 61-71, 1978.

COLVILLE, T. O Sistema Reprodutivo. In: COLVILLE, T.; BASSERT, J.M. **Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, p. 387- 404, 2010.

COSTA, D.S.; SILVA, J.F.S. Wild Boars (*Sus scrofa scrofa*) Seminiferous Tubules Morphometry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.49, n.5, p. 739-745, 2006.

DOMINGUES, S.F.S. *et al.* Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação *in situ* de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, n.2, p.124-129, 2011.

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.

EVANS, L.K.M. *et al.* The efficacy of chlorhexidine gluconate in canine skin preparation – practice survey and clinical trials. **Journal of Small Animal Practice**, v. 50, 2009.

FERRAZ, F.S. **Morfofisiologia testicular de saguis híbridos de vida livre (Callitrichidae: Primatas)**, Rio de Janeiro - RJ, Brasil. 2015. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) -Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-graduação em Medicina, Minas Gerais.

FORD, S.M.; PORTER, L.M.; DAVIS, L.C. **The Smallest Anthropoids: The Marmoset/ Callimico Radiation**. Springer, p. 25-61, 2009.

FRENCH, J.A. *et al.* Urinary and plasma gonadotropin concentration in Golden Lion Tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **American Journal of Primatology**, v. 26, p.53-59, 1992.

GIANNICO, A.T. *et al.* Valores eletrocardiográficos em saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*). **Pesq. Vet. Bras.** v.33, n.7, p. 937-941, 2013.

GUIMARÃES, M.A.B.V. Reprodução de primatas não-humanos. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, n.3, p.339-343, 2007.

GUIMARÃES, M.A.B.V. Reprodução em primatas neotropicais. IN: CUBAS, Z.S.; SILVA, J. C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2ed., p. 2270- 2275, 2014.

HARRISON, R. M.; KUBISCH, H.M. Male reproduction and fertilization, definition of the primate model: In: Wolfe-Coote, S. **The laboratory primate**, New York: Academic Press, p. 119-132. 2005.

HAYES, J. *et al.* Assessment of penile erection methods in rhesus macaques to model pharmacokinetics of antiretroviral drugs and penile infection with simian immunodeficiency virus. **J Med Primatol**, v. 45, p. 34–41, 2016.

HEDLUND, D.A. Cirurgia dos sistemas reprodutivo e genital, In: FOSSUM T.W.; HEDLUND, D.A.; JOHNSON, A.L.; et al. **Cirurgia de Pequenos Animais**. Roca: São Paulo, 2ed., p 610 – 672, 2005.

HORST, G. Reproduction: Male. In: COOTE, S.W. **The Laboratory Primate**. Elsevier:California, 2005.

HOWE, L.M. Surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**. v.66, n.3, p. 500-509, 2006.

ISHIBASHI, H., MOTOHASHI, H. Artificial Insemination in Common Marmosets using Sperm Collected by Penile Vibratory Stimulation. **Neotropical Primates**. v. 20, n.1, p.54-

56, 2013.

IUCN (2005) Guidelines for the prevention of biodiversity loss caused by alien species. Disponível em http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/our_work/invasive_species/ Acessado em 26/07/2015.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino, In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, Rio de Janeiro: Guanabara, 7 ed., p. 323-334, 1999.

KRETZER, D.M. Fertility regulation in the male. **Bulletin of the World Health Organization**, v.56, n.3, p.353-360, 1978.

KUEDERLING, A. *et al.* Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. **Am. J. Primatol**, v.52, p.149–154. 2000.

KUMAR V.; RAJ A. No-scalpel vasectomy by electrocauterization in free range rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Open Vet.** v. 2, p.6-9, 2012.

LAFORTUNE, M. *et al.* A vasectomy technique for egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine.** v. 35, n. 1, p. 104–106, 2004.

LEÃO, T.C.C. *et al.* **Espécies Exóticas Invasoras no Nordeste do Brasil: Contextualização, Manejo e Políticas Públicas.** Recife: CEPAN Instituto Hórus, 99p., 2011.

LI, L.H., DONALD, J.M.; GOLUB, M.S. Review on Testicular Development, Structure, Function, and Regulation in Common Marmoset. **Birth Defects Research**, vol.74, p.450–469, 2005.

LIN, Z.Y. *et al.* Molecular signatures to define spermatogenic cells in common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Reproduction**, v.143, p.597-609, 2012.

MANSFIELD, K. Marmoset Models Commonly Used in Biomedical Research. **Compartive Medicine**, v.53, n.4, p.383-392, 2003.

MARSON, J. *et al.* Cellular and biochemical characteristics of semen obtained from pubertal chimpanzees by masturbation. **J. Reprod. Fert**, n.82, p. 199-207,1988.

MATHEW, V.; BANTWAL, G. Male contraception. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 16, n.6, p. 910–917, 2012.

MILLAR, M.R. *et al.* Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human. **international journal of andrology**, vol. 23, p. 266- 277, 2000.

MOLLINEAU, W.M., ADOGWA, A.O., GARCIA, G.W. A preliminary technique for electro-ejaculation of agouti (*Dasyprocta leporina*). **Animal Reproduction Science**, v. 108, p.92-97, 2008.

MORELAND, R.B. *et al.* Characterizing the reproductive physiology of the male southern black howler monkey, *Alouatta caraya*. **Journal of Andrology**. v.22, n.3, 395-403, 2001.

MORRELL, J. M.; KUDERLING, 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, 1996.

MORRIS, T.H.; DAVID, C.L. Illustrated guide to surgical technique for vasectomy of the common marmoset. **Laboratory Animals**. v. 27, p. 381-384, 1993.

MURTA, D.V.F. A organização celular dos testículos de mamíferos. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA** – disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/rcemv/article/view/28030>, acesso em 15/02/2017.

NEAVES, W.B. The rat testis after vasectomy. **J. Reprod. Fert**. v. 40, p. 39-44, 1974.

OERKE, A.K.; EINSPANIER, A.; HODGES, J.K. Noninvasive monitoring of follicle

development ovulation, and corpus luteum formation in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) by ultrasonography. **American Journal of Primatology**, v. 39, p. 99-113, 1996.

OLIVEIRA, B.A.S. et al. Métodos cirúrgicos e não cirúrgicos de contracepção masculina em cães. **Sinapse Múltipla**. v.1, n.1, p. 1-14, 2012.

OLIVEIRA, K.M. et al. Estudo comparativo entre três técnicas abertas de orquiectomia em gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**. n.38, v.2, p. 177-183, 2010.

OLIVEIRA, M. M. Manejo de populações invasoras: Os diversos aspectos envolvidos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRIMATOLOGIA, **Livro de Resumos...** Porto Alegre: PUC/RS, p. 58, 2005.

OLIVEIRA, P. et al. Técnicas de manejo para a conservação do mico-leão-dourado. In: OLIVEIRA, P., GRATIVOL, A.D., RUIZ-MIRANDA, C.R. **Conservação do Mico-Leão-Dourado: enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense; v. 3, p. 118-135, 2008.

PALESE, M. A; CRONE, J.K.; BURNETT, A.L.A. Castrated Mouse Model of Erectile Dysfunction. **Journal of Andrology**, n. 5, v. 24, 2003.

PAULA, P.M.C. **Estratégias adicionais no controle populacional de cães de rua**. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Curitiba.

PAZ, R.C.R., TEIXEIRA, R.H.F., GUIMARÃES, M.A.B.V. Avaliação das características seminais de macacos pregos (*Cebus apela*) mantidos em cativeiro, antes e após vasectomia bilateral. **Braz. vet. Res. anim. Sci.**, v.43, n.4, p. 561-567, 2005.

PENG, B. et al. Quantitative (stereological) study of the effects of vasectomy on spermatogenesis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Reproduction**, v. 124, p. 847-856, 2002.

PHOENIX, C.H.. Factors influencing sexual performance in male rhesus monkeys.

Journal of Comparative and Physiological Psychology, v. 91, p.697–710, 1977.

PRESTES, N.C. et al. Cesarean sections in marmosets: white-tufted marmoset (*Callithrix jacchus*). **Vet. e Zootec.** v. 21, n. 1, p. 92-97, 2014.

PRIMACK RB, RODRIGUES E. Ameaça á diversidade biológica. In: **Biologia da conservação**, Londrina: Vida, p.69–133, 2001.

REIS, N. R. *et al.* Primatas Brasileiros: guia de campo. Rio de Janeiro: Technical Books, 328 p., 2015.

RODRIGUES, C.R. Ciclo reprodutivo de macacos-prego (*Cebus libidinosus*) em cativeiro: aspectos comportamentais e hormonais. Brasília-DF, Brasil. 2010. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -Universidade de Brasília, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Distrito Federal.

RYLANDS, A.B. *et al.* Order Primates (Primates). In: FOWLER, M.E., CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa: Iowa State University Press,. p.268-291, 2001.

RYLANDS, A.B.; CHIARELLO, A.G. Official list of Brazilian Fauna Threatened With Extinction. **Neotropical Primates**, v. 11, n. 1, p. 43–49, 2003.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R.A.; SILVA JR, J.S. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. **Int. ZooYb**, v. 46, p. 11–24, 2012.

SANTOS, C.V. *et al.* Ecologia, comportamento e manejo de primatas invasores e populações-problema. In: MARQUES, J.C.B. **A Primatologia no Brasil**. v.10, p 101-118, 2007.

SANTOS, I. F. C. *et al.* Eficácia da abraçadeira e do fio de náilon na deferentectomia e laqueação dos ductus deferentes em cães adultos (estudo comparativo). **ARS VETERINARIA**, v.28, n.2, p.75-84, 2012.

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.

SETCHELL, B.P.; BREED, W.G. Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. In: NEILL, J.D. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, Elsevier, 3. ed., p. 771-825, 2006.

SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders, 3. ed., v.2, 1427p.,2003.

SONKSEN, J.; OHL, D.A. Penile vibratory stimulation and electroejaculation in the treatment of ejaculatory dysfunction. **international journal of andrology**, v. 25, p.324–332, 2002.

SOUZA-ARAÚJO, N.L. Reprodução de primatas neotropicais: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, v.22, n.1, p.296-307, 2012.

STASIENIUK, E.V.Z. Digestibilidade de dietas e avaliação de alimentos protéicos em sagüide- tufo-preto (*Callithrix penicillata*). 2009. 71f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Belo Horizonte.

TEIXEIRA, D.G. Estudo anatômico descritivo dos órgãos genitais masculinos do macaco-prego (*Cebus apella* Linnaeus, 1758). 2005. 189f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade de São Paulo, Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, São Paulo.

TEIXEIRA, R.H.F, PAZ, R.C.R, GUIMARÃES, M.A.B.V. Vasectomia como ferramenta para o manejo reprodutivo em macaco-prego (*Cebus apella*). **Anais VI I Congresso e XI I Encontro da ABRAVAS**, São Pedro/SP, 2003.

TRAISH, A.M. *et al.* Effects of Medical or Surgical Castration on Erectile Function in an Animal Model. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 3, 2003.

VALLE, R.R. Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). 2007. 173f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) -Universidade de São Paulo, Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, São Paulo.

VALLE, R.R. *et al.* Semen characteristics of captive common marmoset (*Callithrix jacchus*): a comparison of a German with a Brazilian colony. **J Med Primatol**, p. 1-6, 2014.

VERONA, C.E.S. *et al.* Colheita e avaliação do sêmen de sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). **Ciência Animal Brasileira**. v. 10, n. 2, p. 544-552, 2009.

VERONA, C.E., PISSINATTI, A. Primates-Primatas do Novo Mundo (Sagui, Macaco-prego, Macaco-aranha, Bugio e Muriqui). In: CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, p. 723-743, 2014.

VIANA, C.F. Características do sêmen, perfil da concentração de testosterona no extrato fecal, variação da massa corporal e volume testicular de micos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*, Linnaeus, 1758) mantidos em cativeiro sob condições ambientais controladas. 2012. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

VIDAL, F.D. *et al.* Coleta de sêmen em mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (Kuhl, 1820) através da eletroejaculação Callitrichidae – primates. **R. bras. Ci. Vet.**, v.14, n.2, p 67-71, 2007.

WALLEN, K. Sex and Context: Hormones and Primate Sexual Motivation. **Hormones and Behavior**, v. 40, p. 339–357, 2001.

WEINBAUER, G.F. *et al.* 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, n. 1, p. 120-126, 2001.

YEOMAN, R. R. *et al.* Vibratory stimulation of ejaculatory yields increased motile spermatozoa, compared with electroejaculation, in squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.**, v. 36, p.62-64,1997.

YEUNG, C.H. *et al.* Maturation of sperm motility in the epididymis of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). **international journal of andrology**. v.19, p.113-121, 1996.

APÊNDICE A**Meio diluidor TALP- HEPES**

Componentes	Concentração g/500ml
NaCl	3,710
KCl	0,118
NaHCO ₃	0,084
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	0,021
Na Lactate	930 µl
MgCl ₂ x6H ₂ O	0,050
Glucose	0,4505
Hepes (Na-salt)	0,651
Hepes (acid)	0,596
Phenolrot	0,0050
Bi-dest. H ₂ O	/500ml
pH	7,33