

## AVALIAÇÃO DO SÊMEN DE BUGIOS (ALOUATTA CARAYA - HUMBOLDT, 1812) SOB REFRIGERAÇÃO À 40C.

Rodrigo del Rio do Valle<sup>1</sup>, Fernando Cezar Zacarias<sup>2</sup>, Rosana Pantoja de Miranda<sup>2</sup>, José Augusto Pereira Carneiro Muniz<sup>3</sup>, Reinaldo de Amorim Carvalho<sup>3</sup>, Haroldo Francisco Lobato Ribeiro<sup>4</sup>

1- Doutorando Depto. de Reprodução Animal – FMVZ/USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo – SP, Brasil - [rovalle@usp.br](mailto:rovalle@usp.br); 2- Curso de Medicina Veterinária, UFRA, Belém - PA, Brasil.; 3- Médico Veterinário, CENP/SVS/MS, Ananindeua - PA, Brasil.; 4- Setor Rep. Animal, DPMVP/UFRA, Belém – PA, Brasil.

1. INTRODUÇÃO Estudos sobre reprodução de primatas não humanos (PNH) neotropicais em cativeiro e aperfeiçoamento de novas técnicas de reprodução assistida são de grande valia para sua aplicação na preservação de espécies ameaçadas ou utilizadas como modelos experimentais em pesquisas biomédicas. A espécie *Alouatta caraya*, além de ser utilizada em pesquisas biomédicas, serve de modelo em estudos reprodutivos para que possa ser utilizada como referência para espécies ameaçadas de extinção. O *Alouatta caraya* é uma espécie de PNH Neotropical do Gênero *Alouatta*, da Família *Atelidae*, que abrange os gêneros dos maiores *Platyrrhini*. Usualmente são chamados de guaribas ou bugios, apresentam dimorfismo sexual relacionado à coloração, os machos são pretos e as fêmeas castanho-amareladas, são animais poligâmicos e não apresentam sazonalidade 1. Um dos problemas que dificultam o desenvolvimento de técnicas para a reprodução artificial é a conservação do sêmen. Além disto, o sêmen da maioria dos primatas neotropicais coagula durante ou logo após a ejaculação, prejudicando, ou até mesmo impedindo a análise e criopreservação, além de dificultar a sua posterior utilização para a fecundação 3,7-10. Desta forma, deve-se procurar diminuir a atividade dos espermatozoides, a fim de impedir que os elementos fecundantes esgotem a reserva natural encontrada em todo sêmen e venham a sofrer uma auto-intoxicação conseqüente de seu trabalho metabólico. Esta redução de atividade se obtém, essencialmente, na prática da conservação pelo resfriamento do sêmen. Neste processo, o choque térmico deve ser evitado, devendo o sêmen ser mantido nas temperaturas de conservação indicadas, após haver sido submetido ao resfriamento gradativo 4.

2. MATERIAL E MÉTODOS Foram utilizados 5 animais machos da espécie *Alouatta caraya*, mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas – CENP/SVS/MS, localizado no município de Ananindeua, no Estado do Pará, Brasil. Foram colhidas 31 amostras de sêmen pela técnica de eletroejaculação por via retal previamente descrita em outros estudos 5,10, com o animal anestesiado e contido sobre um suporte de madeira<sup>10</sup>. Após pré-diluição em solução de Ringer Lactato (100mL), no intuito de evitar a coagulação<sup>10</sup>, foram confeccionadas lâminas para as avaliações. Para ser feita a análise, foi utilizada uma gota de sêmen em uma lâmina pré-aquecida por uma mesa térmica à 37°C, sendo usada uma lamínula, também pré-aquecida, para recobrir a gota de sêmen. Foram realizadas análises iniciais (T0) de motilidade (MT) e movimentos progressivos (MP) em microscopia ótica com objetiva de 40x. Depois da diluição e análise inicial, as amostras colhidas foram divididas em duas porções, na primeira adicionou-se o diluente TES, e na segunda utilizou-se diluente RINGER 6 na proporção de 1:1. As amostras permaneceram por 30 min. à temperatura ambiente (26oC) até que fossem levadas para o refrigerador. Neste experimento, houve uma adaptação do TTR Resfriado aplicado para sêmen de eqüinos<sup>2</sup>, alterando a temperatura de resfriamento de 5oC para 4oC, pois o aparelho refrigerador utilizado no Laboratório de Reprodução do CENP estabiliza-se nesta temperatura, e a avaliação, que foi realizada a cada 30 minutos ao invés de 60 minutos como no teste de sêmen equino.

O teste de termo resistência (TTR) consistiu no seguinte protocolo: sujeição do sêmen sob resfriamento à 4°C, verificando-se a manutenção da MT e MP pós-colheita, a cada 30 minutos, nos dois diluidores por um período de 5 horas ou até que se extinguissem os movimentos. O estudo estatístico para comparação da MT e dos MP entre os diluidores TES e RINGER foi realizado com os cálculos das médias, desvios padrão, Teste “t” e Correlação Linear de Pearson por meio do software Bioestat 2.0.

3. RESULTADOS Entre a análise inicial (T0), quando o sêmen se encontrava na temperatura ambiente à 26°C e T30 onde o sêmen se encontrava no refrigerador à 4°C foi decorrido 1 hora de intervalo. A diminuição verificada na motilidade, de 81% na análise inicial (T0) para 74% e 71% em T30 para TES e RINGER, respectivamente e de 74% em T0 para 65% e 63% nos movimentos progressivos também para TES e RINGER, respectivamente (Tab. 1), pode ter ocorrido em função da diluição do sêmen nos dois crioprotetores. Após esta queda inicial, não se verificou queda brusca nos movimentos espermáticos, o que pode ter ocorrido em decorrência do período de 30 minutos que o sêmen ficou nos diluidores à temperatura ambiente possivelmente ocasionando uma estabilização gradual do espermatozoide. Estes resultados podem ser considerados superiores se comparados aos valores encontrados por Weber<sup>11</sup>, em suínos, que verificou que o resfriamento direto de 37°C para 5°C diminui de 81,7 para 12,0% os movimentos espermáticos e quando o resfriamento foi gradual estes se mantiveram em 48,3%. A manutenção da viabilidade espermática pôde ser observada na análise da motilidade, que apresentou uma média de 74% no TES e 71% no RINGER após 30 minutos sob refrigeração à 4°C e 43% no TES e 39% no RINGER após 5 horas nas mesmas condições (Tab. 1). Na avaliação dos movimentos progressivos dos espermatozoides em cada uma das amostras, a manutenção da viabilidade espermática foi constatada pela média de 65% no TES e 63% no RINGER após 30 minutos sob refrigeração à 4°C e 36% no TES e 33% no RINGER após 5 horas nas mesmas condições (Tab. 1). Tabela 1. Médias e desvios padrão para o parâmetro motilidade espermática, nos diluidores TES e RINGER, de 31 amostras de sêmen de *Alouatta caraya* analisadas a cada 30 minutos por um período de 5 horas.

TEMPO (minutos)	MOTILIDADE (%)				MOVIMENTOS PROGRESSIVOS (%)			
	TES		RINGER		TES		RINGER	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0*	81	±15	81	±15	74	±19	74	±19
30**	74	±20	71	±20	65	±24	63	±23
60**	69	±21	65	±23	61	±25	58	±25
90**	65	±24	61	±25	57	±26	54	±27
120**	60	±25	58	±25	52	±26	50	±26
150**	57	±25	54	±26	50	±26	47	±26
180**	54	±25	50	±26	47	±26	44	±27
210**	51	±25	47	±26	44	±26	40	±25
240**	47	±26	44	±27	40	±25	37	±26
270**	45	±26	42	±26	38	±25	35	±25
300**	43	±26	39	±27	36	±24	33	±25

\* Análise do sêmen pré-diluído e 30 minutos antes do resfriamento.

\*\* Tempo de análise das amostras após o início da refrigeração.

DP = Desvio Padrão

Durante o período de 5h usados na avaliação, o TTR demonstrou uma capacidade de manutenção da viabilidade espermática satisfatória tanto para o TES quanto para o RINGER. Ao final das avaliações, em T300, obteve-se 43% de MT no TES e 39% no RINGER e 36% de MP no TES e 33% no RINGER. Embora numericamente diferentes, o Teste “t” demonstrou que os diluentes TES e RINGER não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). A análise pela Correlação Linear de Pearson demonstrou que existe uma correlação altamente significativa entre os dois parâmetros, motilidade e movimentos progressivos. A longevidade das amostras foi avaliada a cada 30 min., contra o intervalo de 1 hora aplicado ao sêmen de eqüinos<sup>2</sup>, a fim de se verificar possíveis alterações bruscas nos parâmetros avaliados, obtendo com melhor precisão o momento em que estas poderiam ocorrer, porém não foram constatadas alterações bruscas, como pode ser verificado nas Figuras 1 e 2.

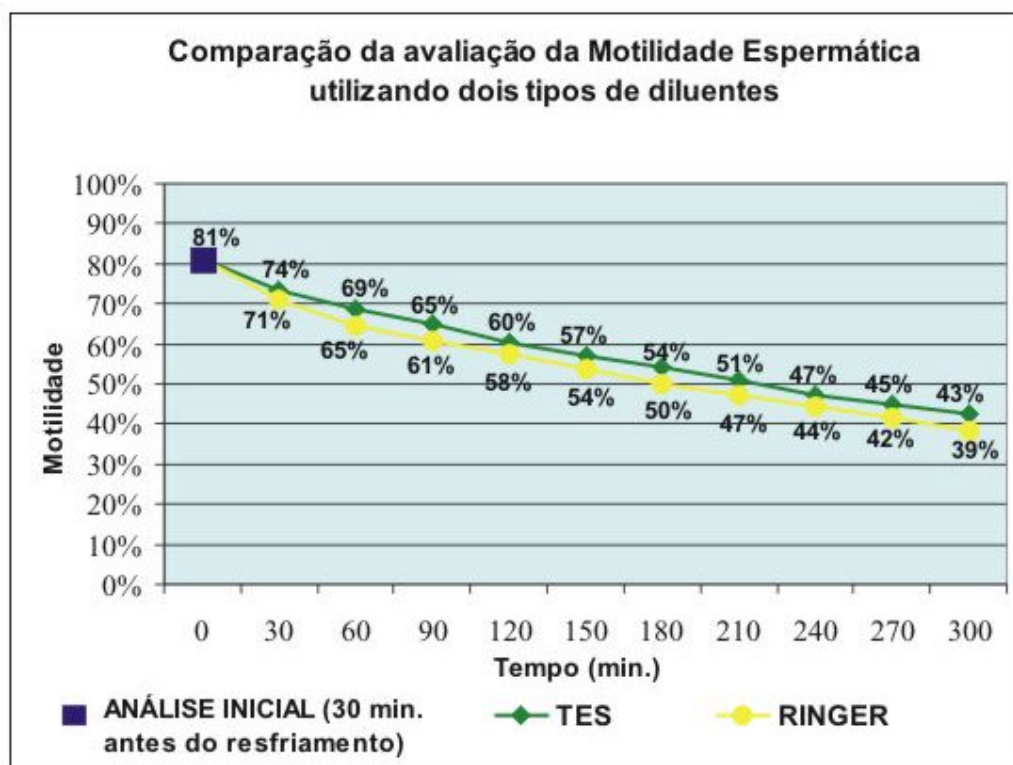


Figura 1. Médias da motilidade espermática inicial e a cada 30 minutos após o resfriamento por um período de 5 horas.

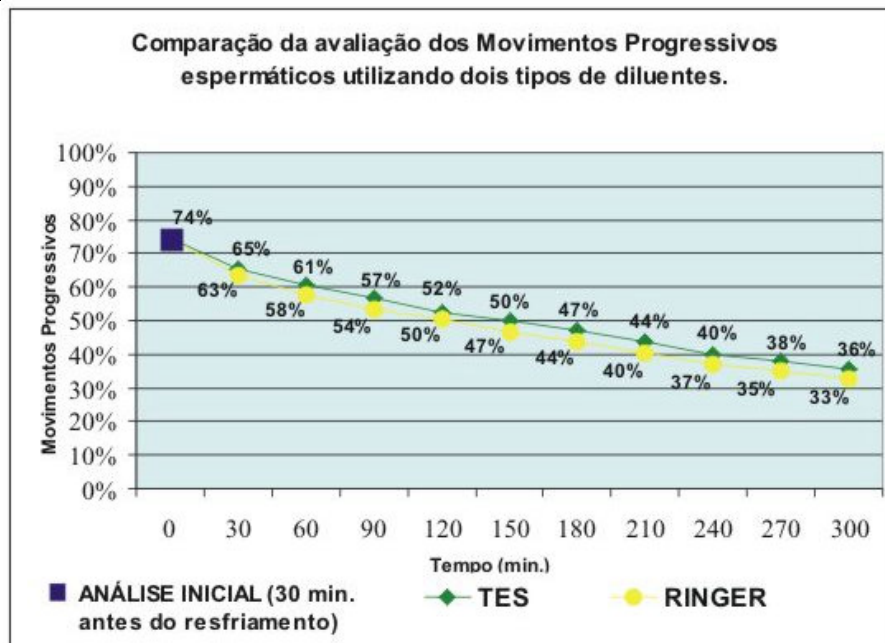


Figura 2. Médias dos movimentos progressivos espermáticos inicial e a cada 30 minutos após o resfriamento por um período de 5 horas.

Para as diversas espécies animais que se recomenda o uso do TTR, foram estabelecidos valores mínimos para os movimentos espermáticos, que classificam sua viabilidade considerando o sêmen apto ou não para sua posterior utilização<sup>2</sup>. Neste estudo, o valor mínimo encontrado, 33%, é maior que o recomendado para bovinos, que é de 15%, aproximando-se ao de eqüinos e caprinos, que é de 30%, e é menor que o encontrado para ovinos, que necessita de pelo menos 40% dos espermatozóides com motilidade para ser considerado viável<sup>2</sup>.

**4.CONCLUSÃO** Baseados nos resultados podemos considerar que o protocolo de TTR aplicado foi satisfatório para que se avaliasse a viabilidade espermática nas condições do estudo. E também, que apenas um dos parâmetros, MT ou MP possa ser utilizado para determinar a capacidade de movimentação espermática em avaliações e estudos futuros. Os crioprotetores TES e RINGER demonstraram possuir eficácia comprovada na manutenção da viabilidade espermática no sêmen sob refrigeração à 4°C na espécie testada (*Alouatta caraya*), sendo que o diluente RINGER, demonstrou ser uma alternativa eficaz e vantajosa por ser um crioprotetor de menor custo. As avaliações entre TES e RINGER para os parâmetros motilidade e movimentos progressivos, demonstraram que a técnica é viável e permitirá que outros tipos de avaliações sejam realizados. Este estudo inicial demonstrou a necessidade de se avançar nas análises da qualidade espermática e seus crioprotetores, pois apesar dos dados obtidos revelarem a eficiência do protocolo testado, a inclusão de outros parâmetros de avaliação da viabilidade espermática do sêmen de PNH neotropicais como análise da integridade acrossomal, patologias espermáticas pré e após a diluição, são necessárias para o desenvolvimento de outras pesquisas em técnicas de reprodução assistida.

## 5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AURICCHIO, P. Primatas do Brasil. São Paulo: Editora Terra Brasilis, 1995. 168 p.
2. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (Belo Horizonte). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 2.ed.Belo Horizonte,1998.49 p.
3. GOULD, K. G.; MARTIN, D. E.; WARNER, H. Rectal probe eletroejaculation. American journal of Primatology, New York, v. 7, p. 213-222, 1978.
4. MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 4 ed. Porto Alegre: Editora Sulina, 1978, 765p.
5. MORELAND, R. B.; RICHARDSON, M. E.; LAMBERSKI, N.; LONG, J. A. Characterizing the reproductive physiology of the male southern black howler monkey, *Alouatta caraya*. Journal of Andrology, 2001, 22 (3): 395-403.
6. MOTA, A. V. Dados preliminares de uma solução hiperosmótica a base de Ringer Lactato como uma alternativa para criopreservação de sêmen de búfalos. 2002. 15 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém.
7. SANKAI, T.; TERAOKA, K.; YANAGIMACHI, R.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Journal of Reproduction and Fertility, v. 101, p. 273-278, 1994.
8. THOMSON, J. A.; ILLIF-SIZEMORE, S.A.; GLIESSMAN, P. M.; WOLF, D. P. Collection and fertilization potential of sperm from the sulawesi crested black macaque (*Macaca nigra*). American Journal of Primatology, v. 28, p. 289-297, 1992.
9. TOLLNER, T. L.; VANDEVOORT, C. A.; OVERSTREET, J. W.; DROBNIS, E. Z. Criopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Journal of Reproduction and Fertility, v. 90, p. 347-352, 1990.
10. VALLE, R. R. Características Físicas e Morfológicas do Sêmen de *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812) Mantidos em Cativeiro. 2002. 66 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
11. WEBER, H. Zur Kaltes chokempfindlichkeit von eberspermien: Einflub von verdinner medium. Inkubation und abkuhrate. Hannover: Tierarztliche hochschule. 1989. 103p.

Apoio financeiro: Centro Nacional de Primatas – CENP/SVS/MS, PIBIC/UFRA/CNPq