



Bioteecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação *in situ* de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios

Biotechnology of reproduction as a complementary strategy for in situ conservation of endangered neotropical primates: perspectives and challenges

S.F.S. Domingues^{1,2,4}, J.S. Lima, K.G. Oliveira, R.R. Santos^{1,2,3}

¹BIOMEDAM – Laboratório de Biologia e Medicina de Animais da Amazônia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Castanhal, PA, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, PA, Brasil.

³Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Utrecht, Utrecht, Holanda

⁴Autor para correspondência: shfarha@ufpa.br

Resumo

A conservação da variabilidade genética de animais silvestres pode ser garantida pela proteção dos animais em seus *habitats* naturais (*in situ*), pela manutenção destes em cativeiro, em criatórios conservacionistas ou de pesquisa (*ex situ* vivos), bem como pela formação de bancos de germoplasma animal, nos quais gametas, embriões e células somáticas podem ser utilizados em programas de biotecnologia da reprodução. A conservação *in situ* consiste em uma estratégia de conservação elementar. Entretanto, é necessário considerar que a perda de material genético ocorre diariamente de forma acelerada, fazendo-se necessário lançar mão de técnicas para recuperar e preservar o potencial genético de animais mesmo após a sua morte. Desta forma, as biotecnologias de reprodução consistem em auxílio para projetos de conservação *in situ*.

Palavras-chave: banco de germoplasma, biotécnicas de reprodução, *Callithrix jacchus*, *Cebus apella*, *Saimiri sciureus*, produção *in vitro* de embriões

Abstract

Conservation of genetic material can be guaranteed by animal and natural habitat protection, i.e. *in situ*, by animal captivity in conservationists or research centers, i.e. *ex situ in life*, or by germplasm bank formation. Such a genetic bank can preserve gametes, embryos or somatic cells, which can be applied in reproductive programs. Conservation *in situ* consists in an elementary strategy to preserve biodiversity. However, we must bear in mind that genetic material losses occurs rapid and daily, which demands the urgent application of techniques to recover and preserve genetic material even after animal death. Consequently, reproductive biotechnologies will help to conserve genetic material from endangered non-domestic mammals *in situ*.

Keywords: *Callithrix jacchus*, *Cebus apella*, germplasm bank, *in vitro* embryo production, reproductive biotechnology, *Saimiri sciureus*.

Introdução

O aquecimento global, a destruição ou fragmentação de *habitats*, a introdução de espécies exóticas nos ecossistemas, a caça ou outras pressões antrópicas têm causado a extinção de muitas espécies animais (Fickel et al., 2007). Atualmente todos os primatas do Novo Mundo são listados na *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES) como vulneráveis à extinção (Cubas et al., 2007).

Para a sobrevivência e perpetuação de uma espécie, é necessário que se mantenham populações mínimas viáveis (Shaffer, 1981), sendo muitas vezes necessárias medidas de proteção de seus *habitats* naturais (*in situ*), manejo das populações na natureza ou em cativeiro, para que seja proporcionada a garantia mínima de variabilidade genética, demográfica e ecológica (Cullen Jr et al., 2003). A conservação *in situ* consiste em uma das mais eficazes estratégias de conservação, no entanto, dependendo da quantidade de áreas naturais disponíveis para uma determinada espécie, a conservação *in situ* pode se tornar inviável em curto prazo. Por isso, atualmente, é de suma importância lançar mão de biotécnicas de reprodução como estratégia complementar às ações de conservação *in situ*, uma vez que essas podem auxiliar na recuperação e preservação do potencial genético de animais mesmo após a sua morte.

Nos primatas, uma notável progressão na aplicação dessas biotécnicas tem sido realizada nos últimos 20 anos (Wolf et al., 2004), promovendo, a partir da inseminação artificial (IA), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) por meio da fecundação *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e transferência nuclear por células somáticas (TNCS) ou embrionárias (Zheng, 2007). Apesar da crescente



aplicação de biotécnicas de reprodução em primatas, diferenças relativas à fisiologia podem retardar sua utilização e, nesse intervalo, o material genético de várias espécies pode ser perdido irreversivelmente. Dessa forma, a criopreservação de gametas consiste em uma forma de manter bancos de animais em extinção.

O presente trabalho tem como objetivo refletir, em linhas gerais, quais as perspectivas da aplicação de biotecnologias de reprodução como ferramenta nos programas de conservação de material genético oriundo de animais ameaçados de extinção como uma estratégia auxiliar aos planos de conservação *in situ*. A presente abordagem baseia-se no que se tem desenvolvido em primatas neotropicais não ameaçados de extinção, como modelo de extrapolação para espécies em risco de extinção.

Perspectivas do uso de biotécnicas de reprodução para a conservação de viabilidade genética de animais ameaçados de extinção

Devido à perda de ecossistemas, assim como à limitada disponibilidade de espaço em zoológicos, criatórios conservacionistas e de pesquisa, tem-se tornado cada vez mais difícil instalar um grande número de animais de uma mesma espécie em cativeiro ou até mesmo em seus *habitats* naturais. Para tanto, uma alternativa é a criopreservação de gametas, embriões e células somáticas em botijões criogênicos, no nitrogênio líquido a -196°C, ou em sua fase de vapor a -150°C. A congelação (lenta ou rápida) possibilita a manutenção dessas células, por um longo período, em condições viáveis de uso (Wilson, 1997). A capacidade do material biológico de sobreviver ao processo de criopreservação depende de sua tolerância ao método de criopreservação (congelação lenta ou vitrificação), aos agentes crioprotetores, desidratação e velocidade de redução da temperatura (Santos et al., 2010).

Aliados a programas de conservação, esses bancos de genes podem fornecer e receber material genético (Wildt, 1997). No entanto, para que um banco de germoplasma seja concretamente eficiente, os gametas preservados devem estar aptos a serem utilizados em programas reprodutivos, tais como a maturação oocitária, fecundação *in vitro* ou produção de embriões *in vitro* após descongelação/devitrificação.

Obtenção e manipulação de gametas masculinos

O sêmen dos primatas não humanos pode assumir consistências variadas (desde fluido até *plug* copulatório) conforme o tipo de acasalamento da espécie, sendo assim, em regimes monogâmicos ou poliginios, ambos em que a fêmea tem somente um parceiro sexual, o *plug* tende a ser menos consistente ou até mesmo ausente, em contraste com regimes poligâmicos, quando atinge consistência quase sólida. 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, agindo, desse modo, como um mecanismo de seleção sexual. Também pode servir como um veículo dos espermatozoides para o interior da cérvix da fêmea, constituindo uma barreira físico-química (Dixson e Anderson, 2002). Devido ao fato de o coágulo ser a porção de maior concentração espermática do sêmen (Bush et al., 1975), o principal desafio é estabelecer um diluidor que possua a propriedade de promover a dissolução do coágulo seminal e manter a viabilidade espermática.

Algumas técnicas para dissolução do coágulo foram descritas: liquefação enzimática em pronase e quimotripsina (Morrell e Hodges, 1998) ou em soluções contendo tripsina e hialuronidase (Paz et al., 2006). Contudo, observa-se uma redução significativa da motilidade e do vigor espermático, além de não haver a completa dissolução do coágulo. Os melhores resultados têm sido alcançados sem o uso de enzimas proteolíticas, apenas com o uso de solução salina a 0,9% (Nagle e Denari, 1983), diluidor a base de água de coco *in natura* (Araújo et al., 2009), à base de água de coco em pó (ACP-118®; Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2011) ou TES-TRIS (Oliveira et al., 2011), todos associados à fragmentação do coágulo com pipeta e à incubação em banho-maria.

Diversos métodos de coleta seminal são reportados para primatas não humanos, dentre eles pode-se destacar o uso de vagina artificial (Young et al., 1995), lavagem vaginal após a cópula (Kuederling et al., 1996), manipulação digital do pênis (Marson et al., 1988), estimulação vibratória peniana (Schneiders et al., 2004) e eletroejaculação (Araújo et al., 2009).

A eletroejaculação é o método de escolha quando a manipulação do animal envolve riscos que justificam a contenção química do indivíduo. A técnica consiste na estimulação elétrica do reflexo ejaculatório, por meio da introdução de um eletrodo transretal. As outras técnicas de obtenção de espermatozoides necessitam do condicionamento dos animais, de forma que estes permitam a sua manipulação até que a ejaculação seja alcançada, sem que haja a necessidade de nenhum tipo de contenção química. Para os animais impossibilitados de ejacular ou imediatamente *post-mortem*, uma possibilidade é a obtenção de espermatozoides epididimários ou de espermatogônias, as quais podem ser cultivadas e criopreservadas. Foi descrita a obtenção de espermatozoides epididimários viáveis em períodos de até 20 horas após a morte dos animais (Garde et al., 1998).

Além das técnicas de coleta e dissolução seminal, em muitas espécies também foram descritos diversos

protocolos de criopreservação de sêmen. Os diluentes comumente utilizados na criopreservação contêm gema de ovo, açúcares, glicerol ou DMSO em proporções variadas (consultar Oliveira et al., 2011). Em primatas neotropicais, existem protocolos de congelamento de sêmen descritos apenas para macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*; Denis et al., 1976), saguis-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*; O'Brien et al., 2003) e macacos-prego (*Cebus apella*; Oliveira et al., 2011), sendo este último o primeiro protocolo de congelamento e ativação espermática com cafeína, em primata, totalmente desenvolvido no Brasil.

Obtenção e manipulação de gametas femininos

A recuperação de oócitos pode ser conduzida por meio de biópsias de tecido ovariano, punções foliculares, ovariectomias ou imediatamente *post-mortem*, sendo que as duas primeiras técnicas de obtenção de oócitos provenientes de folículos ovarianos pré-antrais e antrais podem ser conduzidas com o emprego de ultrassonografia, laparoscopia e laparotomia, não sendo necessária a remoção do ovário (Domingues et al., 2007). Os oócitos provenientes de folículos antrais podem ser congelados ou utilizados imediatamente em protocolos de maturação e fecundação *in vitro*.

Quando a recuperação de oócitos de folículos antrais não é possível ou quando se deseja aumentar a quantidade destes, a manipulação de folículos ovarianos pré-antrais é uma possibilidade. Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) representam cerca de 90% da população folicular (Domingues et al., 2003). Estes podem ser obtidos de animais convalescentes ou que não estão participando de programas de reprodução assistida, por meio de biópsias de córtex ovariano, ovariectomias ou *post-mortem*. Dessa forma, os folículos ovarianos podem ser cultivados *in vitro* até que o oócito esteja capacitado para a fecundação, ou, ainda, os FOPAS podem ser criopreservados ou transplantados para animais receptores. Uma característica positiva dos oócitos imaturos incluídos nos folículos pré-antrais consiste em sua habilidade para sobreviver por várias horas fora do animal (Santos et al., 2006). Ou seja, mesmo após a morte da fêmea, os ovários podem ser coletados e destinados às biotecnologias de reprodução. Enquanto os métodos de crescimento e maturação folicular são desenvolvidos e aperfeiçoados, os folículos pré-antrais podem ficar estocados em nitrogênio líquido por um período indeterminado. Contudo, é necessário o desenvolvimento de um protocolo eficiente de congelamento e descongelamento de tecido ovariano.

Em *Cebus apella*, foi descrito o isolamento de folículos pré-antrais (FOPA) utilizando-se um *tissue chopper*. A partir desta técnica, foi possível obter 500.000 folículos pré-antrais com diâmetro variando de 11,6 a 27,8 μm . Estes folículos pré-antrais se forem devidamente cultivados *in vitro*, podem disponibilizar uma grande quantidade de oócitos para estudos de MIV e FIV (Domingues et al., 2003), evitando-se o uso de técnicas invasivas como a laparotomia e laparoscopia.

Nayudu et al. (2003) relataram pela primeira vez protocolos de cultivo de folículos pré-antrais em primatas neotropicais, a partir de fragmentos de córtex ovariano e folículos isolados de *C. jacchus*. Após o cultivo dos folículos pré-antrais, os que formaram antro *in vitro* foram puncionados, e os oócitos recuperados foram submetidos à MIV. Nos oócitos obtidos após o cultivo dos folículos pré-antrais isolados, ocorreu o rompimento da vesícula germinativa e extrusão do primeiro corpúsculo polar.

A produção *in vitro* de embriões de primatas: estado da arte

A PIVE tem grande potencial para a conservação *ex situ*, pois, uma vez que os embriões sejam produzidos *in vitro*, eles podem ser transferidos para fêmeas doadoras ou criopreservados para posterior transferência, de acordo com as possibilidades da equipe.

O primeiro trabalho descrevendo a FIV em uma espécie de primata ocorreu na espécie *Saimiri sciureus* (Kuehl e Dukelow, 1979). Atualmente, essa biotécnica tem sido realizada tanto pela coleta de oócitos maturados *in vivo*, por meio do emprego de tratamentos hormonais que promovem a estimulação folicular ovariana, como pela coleta de oócitos ainda imaturos, submetendo-os logo a cultivo *in vitro* que promovem a maturação oocitária (MIV; Gilchrist e Thompson, 2007).

Os protocolos de maturação *in vivo* visam aumentar a quantidade de oócitos obtidos por punção folicular, sendo o método utilizado com mais frequência para as várias técnicas de produção *in vitro* de embriões de primatas. No entanto, os primatas submetidos a esses tratamentos podem não responder aos estímulos hormonais ou podem sofrer hiperestimulação (Gilchrist e Thompson, 2007), acometendo a fêmea pela síndrome do ovário policístico (SOP). Em virtude da ocorrência de SOP em fêmeas de primatas submetidas à estimulação hormonal ovariana, o procedimento tem se tornado modelo biomédico para o estudo da referida síndrome (SOP) em mulheres (Jurema e Nogueira, 2006).

Dessa forma, o estudo da maturação oocitária *in vitro* (MIV) é de grande importância para a compreensão da biologia dos oócitos e, muitas vezes, pode ser a única alternativa para fêmeas de primatas que não respondem a tratamentos hormonais ou desenvolvem SOP (Zheng, 2007). Além desses fatores, a MIV pode ser ainda uma possibilidade para oócitos imaturos submetidos à criopreservação, que poderão ser utilizados

mesmo após a morte da fêmea doadora para a produção *in vitro* de embriões.

A grande vantagem da FIV é a diminuição do descarte precoce das fêmeas que possuem alguma alteração e que, por este motivo, são impedidas de se reproduzir por meio natural (Andrabi e Maxwell, 2007). A sua aplicação ocorre principalmente em situações de infertilidade (principalmente nos humanos; Jurema e Nogueira, 2006), nos animais com valor produtivo e nas espécies em via de extinção (Andrabi e Maxwell, 2007), sendo que um dos fatores que limitam a sua aplicação é a dificuldade de obtenção e manuseio do sêmen de primatas (Durrant, 2009).

Na busca de encontrar alternativas para solucionar alguns casos de infertilidade quando a FIV não é uma possibilidade viável pela dificuldade de obtenção de espermatozoides com vigor alto, surgiu a ICSI (*intracytoplasmatic sperm injection*; Miyara et al., 2003). Esta técnica se fundamenta na inserção mecânica de um espermatozoide inteiro ou do núcleo espermático isolado dentro do ooplasma (Martins et al., 2002). Com relação ao tipo de sêmen utilizado para a ICSI nos primatas, o uso de sêmen a fresco (Sun et al., 2008) ou congelado (Yeoman et al., 2005) vem sendo difundido com sucesso em várias espécies.

A transferência nuclear (clonagem) é definida como o processo no qual o núcleo (DNA) é removido de uma célula doadora (embrionária ou somática) e transferido para outra célula enucleada (oócito maturado), desenvolvendo-se embrionariamente e originando um indivíduo geneticamente igual ao do doador celular (Andrabi e Maxwell, 2007). Da mesma forma como ocorre nos outros mamíferos, a produção de primatas clonados ainda continua bastante limitada, sendo observada uma elevada taxa de mortalidade embrionária e fetal (Mitalipov et al., 2001). Para garantir a eficiência da transferência nuclear nos primatas, é necessário compreender mais detalhadamente as funções nucleares e citoplasmáticas das células utilizadas neste processo em cada espécie (Zhou et al., 2006).

O primata mais estudado no campo das biotecnologias de reprodução é a espécie *Macaca mulatta* (macaco rhesus), já sendo descrita a IA (Settlage et al., 1973), a FIV (Bavister et al., 1983), a ICSI (Hewitson et al., 1996) e a transferência nuclear (Mitalipov et al., 2002), assim como já foi relatado o primeiro nascimento de primatas por transferência nuclear de células embrionárias obtidas a partir dos blastocistos produzidos pela ICSI (Wolf et al., 2004).

Nos primatas neotropicais, a produção *in vitro* de embriões tem sido estudada em *Callithrix jacchus* por meio da FIV (Gruppen et al., 2007), e da ICSI (Gruppen et al., 2007) em *Callithrix jacchus*, *Saimiri sciureus* (Kuehl e Dukelow, 1979). Mais recentemente, a primeira FIV em *Cebus apella* foi descrita (Lima, 2011), sendo esse o primeiro relato de PIVE em uma espécie silvestre e em um primata neotropical no Brasil. Vale ainda ressaltar que em *C. apella* foi desenvolvido um protocolo de maturação oocitária *in vitro* como alternativa ao emprego da estimulação hormonal ovariana (Domingues et al., 2010).

Considerações finais

Atualmente, existem diversas formas de se realizar o resgate de gametas em animais convalescentes ou *post-mortem*. Esses gametas seriam um arsenal valioso na formação de bancos de germoplasma e para a produção *in vitro* de embriões, contribuindo, assim, para a preservação *ex situ* de patrimônio genético, essencial para a manutenção das espécies.

Referências bibliográficas

- Andrabi SMH, Maxwell WMC.** A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.223-243, 2007.
- Araújo LL, Lima JS, Oliveira KG, Muniz JAPC, Valle RR, Domingues SFS.** Avaliação do uso de solução à base de água de coco a 37 °C para diluição de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) mantido em cativeiro. *Cienc Anim Bras*, v.10, p.588-594, 2009.
- Bush DF, Russel LH, Flowers JR AI, Sorensen JR AM.** Semen evaluation in Capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Lab Anim Sci*, v.25, p.588-593, 1975.
- Cubas ZS, Silva JCR, Dias JLC.** Tratado de animais selvagens - medicina veterinária. São Paulo, Roca; 2007. p.358-359.
- Cullen JRL, Rudran R, Valladares-Padua C.** *Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre*. Curitiba; Editora UFPR e Fundação o Boticário de Proteção à Natureza, 2003. 667p.
- Denis LT, Poindexter AN, Ritter MB, Seager SW, Deter RL.** Freeze preservation of squirrel monkey sperm for use in timed fertilization studies. *Fertil Steril*, v.27, p.723-729, 1976.
- Dixon AF, Anderson MJ.** Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates. *Fol Primatol*, v.73, p.63-69, 2002.
- Domingues SFS, Caldas-Bussiere MC, Martins N, Carvalho, RA.** Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). *Theriogenology*, v.68, p.1251-1259, 2007.



- Domingues SFS, Caldas-Bussiere MC, Petretski MDA, Ohashi OM, Lima JS, Santos RR, Cordeiro MS, Castro PHG.** Effects of follicular phase and oocyte-cumulus complexes quality on the protein profile and *in vitro* oocyte meiosis competence in *Cebus apella*. *Fertil Steril*, v.93, p.1662-1667, 2010.
- Domingues SFS, Ferreira HS, Muniz JAPC, Lima AKF, Ohashi OM, Figueiredo JR, Silva LDM.** Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral follicles. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.55, p.301-308, 2003.
- Durrant BS.** The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). *Theriogenology*, v.71, p.113-122, 2009.
- Fickel J, Wagoner A, Ludwig A.** Semen cryopreservation and the conservation of 247 endangered species. *Eur J Wildl Res*, v.53, p.81-89, 2007.
- Garde JJ, Ortiz N, Garcia AJ, Lopez A, Gallego L.** Criopreservación postmortem de material espermático e inceminación artificial en el ciervo ibérico. *Arch Zootec*, v.47, p.351-356, 1998.
- Gilchrist RB, Thompson JG.** Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, v.67, p.6-15, 2007.
- Gruppen CG, Gilchrist RB, Nayudu PL, Barry MF, Schulz SJ, Ritter LJ, Armstrong DT.** Effects of ovarian stimulation, with and without human chorionic gonadotrophin, on oocyte meiotic and developmental competence in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Theriogenology*, v.68, p.861-872, 2007.
- Hewitson LC, Simerly C, Tengowski MW, Sutovsky P, Navara CS, Haavisto AJ, Schatten G.** Microtubule and chromatin configurations during rhesus intracytoplasmic sperm injection: successes and failures. *Biol Reprod*, v.55, p.271-280, 1996.
- Jurema MW, Nogueira D.** *In vitro* maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertil Steril*, v.86, p.1277-1291, 2006.
- Kuederling I, Morrel JM, Nayudu PL.** Collection of semen from marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) for experimental use by vaginal washing. *Lab Anim*, v.30, p.260-266, 1996.
- Kuehl TJ, Dukelow WR.** Maturation and *in vitro* fertilization of follicular oocytes of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Biol Reprod*, v.21, p.545-556, 1979.
- Lima JS.** *Ativação partenogenética de oócitos maturados in vitro de Cebus apella*. 2011. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Belém, PA, 2011.
- Marson J, Meuris S, Moysan F, Gervais D, Cooper RW, Jouannet P.** Cellular and biochemical characteristics of semen obtained from pubertal chimpanzees by masturbation. *J Reprod Fertil*, v.82, p.199-207, 1988.
- Martins CF, Silva AEDF, Rumpf R.** *Injeção intracitoplasmática de células espermáticas e suas aplicações na reprodução dos bovinos*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. (Embrapa Cenargen. Documentos, n.84).
- Mitalipov SM, Nusser KD, Wolf DP.** Parthenogenetic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. *Biol Reprod*, v.65, p.253-259, 2001.
- Mitalipov SM, Yeoman RR, Nusser KD, Wolf DP.** Rhesus monkey embryos produced by nuclear transfer from embryonic blastomeres or somatic cells. *Biol Reprod*, v.66, p.1367-1373, 2002.
- Miyara F, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, Herve F, Dumont-Hassan M, LeMeur A, Cohen-Bacrie P, Debey P.** Multiparameter analysis of human oocytes at metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. *Hum Reprod*, v.18, p.1494-503, 2003.
- Morrell JM, Hodges JK.** Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. *Anim Reprod Sci*, v.53, p.43-63, 1998.
- Nagle CA, Denari JH.** The Cebus Monkey (*Cebus apella*). In: Hearn JP. *Reproduction in New World primates*. Boston: MT Press, 1983. p.41-67.
- Nayudu PL, Wu J, Michelmann HW.** *In vitro* development of marmoset monkeys oocytes by pre-antral follicle culture. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.90-96, 2003.
- O'Brien JK, Hollinshead FK, Evans KM, Evans G, Maxwell WM.** Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. *Reprod Fertil Dev*, v.15, p.367-375, 2003.
- Oliveira KG, Castro PHG, Muniz JAPC, Domingues SFS.** Conservação do sêmen e liquefação do coágulo seminal macaco-prego (*Cebus apella*) em água de coco em pó (ACP-118®), em diferentes temperaturas. *Ciênc Rural*, v.4, p.617-621, 2010.
- Oliveira KG, Miranda SA, Leão DL, Brito AB, Santos RR, Domingues SFS.** Semen coagulum liquefaction; sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. *Anim Reprod Sci*, v.123, p.75-80, 2011.
- Paz RCR, Teixeira RHF, Guimarães MABV.** Avaliação das características seminais de macacos pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, antes e após vasectomia bilateral. *Braz J Vet Anim Sci*, v.43, p.561-567, 2006.
- Santos RR, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage J, Paris M, Schoenfeldt V, Martinez-**



- Madrid B.** Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Anim Reprod Sci*, v.122, p.151-163, 2010.
- Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, Haeften T, Van den Hurk RVD.** Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue Res*, v.325, p.523-553, 2006.
- Schneiders A, Sonksen J, Hodges JK.** Penile vibratory stimulation in the Marmoset monkey: a practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality. *J Med Primatol*, v.33, p.98-104, 2004.
- Settlage DSF, Swan S, Hendrickx AG.** Comparison of artificial insemination with natural mating technique in rhesus monkey, *Macaca mulatta*. *J Reprod Fertil*, v.32, p.129-32, 1973.
- Shaffer ML.** Minimum population sizes for species conservation. *Bioscience*, v.31, p.131-134, 1981.
- Sun Q, Dong J, Yang W, Jin Y, Yang M, Wang Y, Wang PL, Hu Y, Tsien JZ.** Efficient reproduction of cynomolgus monkey using pronuclear embryo transfer technique. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.105, p.12956-12960, 2008.
- Wildt DE, Rall WF, Critser JK, Monfort SL, Seal US.** Genome resource bank *BioScience*. v.47, p.689-698, 1997.
- Wolf DP, Thormahlen S, Ramsey C, Yeoman RR, Fanton J, Mitalipov S.** Use of assisted reproductive technologies in the propagation of rhesus macaque offspring. *Biol Reprod*, v.71, p.486-493, 2004.
- Wilson EO.** *Biodiversidade*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 657p.
- Yeoman RR, Mitalipov S, Gerami-Nainib B, Nusser KD, Wolf DP.** Low temperature storage of rhesus monkey spermatozoa and fertility evaluation by intracytoplasmic injection. *Theriogenology*, v.63, p.2356-2371, 2005.
- Young LG, Smithwick EB, Gould KG.** Characteristics of Chimpanzee (*Pan troglodytes*) ejaculates collected by rectal probe electrostimulation and by artificial vagina. *Am J Primatol*, v.35, p.293-304, 1995.
- Zheng P.** Effects of in vitro maturation of monkey oocytes on their developmental capacity. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.56-71, 2007.
- Zhou Q, Yang SH, Ding CH, He XC, Xie YH, Hildebrandt TB, Mitalipov SM, Tang XH, Wolf DP, Ji WZ.** A comparative approach to somatic cell nuclear transfer in the rhesus monkey. *Hum Reprod*, v.21, p.2564-2571, 2006.
-