



**Universidade Federal do Pará  
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental  
Universidade Federal Rural da Amazônia  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Danuza Leite Leão**

**Criopreservação do sêmen de macaco-prego (*Sapajus apella* Linnaeus, 1758):  
avaliação de diferentes diluidores, concentração de glicerol e antioxidante catalase**

**Belém  
2015**

**Danuza Leite Leão**

**Criopreservação do sêmen de macaco-prego (*Sapajus apella* Linnaeus, 1758):  
avaliação de diferentes diluidores, concentração de glicerol e antioxidante catalase**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheyla F. S. Domingues.

**Belém  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Leão, Danuza Leite, 1988-

Criopreservação do sêmen de macaco-prego (*Sapajus apella* Linnaeus, 1758): avaliação de diferentes diluidores, concentração de glicerol e antioxidante catalase / Danuza Leite Leão - 2015.

Orientadora: Sheyla F. S. Domingues

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2015.

1. Macaco-prego - Reprodução. 2. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. 3. Reprodução animal. 4. Sêmen I. Título.

CDD 22. ed. 636.089

---

**Danuza Leite Leão**

**Criopreservação do sêmen de macaco-prego (*Sapajus apella* Linnaeus, 1758):  
avaliação de diferentes diluidores, concentração de glicerol e antioxidante catalase**

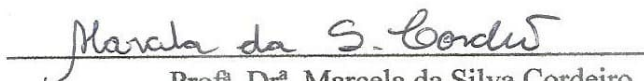
Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.  
Área de concentração: Produção Animal

Data da aprovação. Castanhal - PA: 24/02/2015

Banca Examinadora



Pro<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheyla Farhayldes Souza Domingues  
(Orientadora)  
Instituição: Universidade Federal do Pará



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcela da Silva Cordeiro  
Instituição: Instituto Federal do Pará



Prof. Dr. Moyses dos Santos Miranda  
Instituição: Universidade Federal do Pará

Aos meus pais, Jerceu e Ione, minha  
irmã Danuta, minha avó Benedita e ao  
Diego.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me dar força para vencer os obstáculos e chegar até aqui.

Em especial aos meus pais, Jerceu e Ione, minha avó Benedita e minha irmã Danuta, por serem meu maior exemplo, por todas as orações em meu favor, por todos os incentivos e vibrações positivas. À Pérola, minha paixão, por toda a alegria e carinho, por ficar ao meu lado durante os momentos de estudo, e por me mostrar todos os dias a sinceridade no olhar dos animais. Ao Diego, por todos esses anos que está ao meu lado, acompanhando cada amadurecimento pessoal e profissional, por todo amor, carinho, incentivo, e por ser compreensivo com todas as ausências. Amo vocês!

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheyla F. S. Domingues, por toda a paciência, orientação, sabedoria, incentivo e disposição que conduziu a realização desse trabalho. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia da UFPA, em especial à Karol Oliveira, Adriel Brito, Débora Almeida, Julianne Lima pela amizade, estímulos e ensinamentos, sem o nosso trabalho em equipe não seria possível a realização desse projeto.

A toda equipe do Centro Nacional de Primatas, por disponibilizar infraestrutura necessária, conceder material de consumo e apoio para execução desse experimento. Em especial ao técnico de manejo Obadias, à Dra. Aline Imbeloni, Seu Miguel, Dona Rosa, por toda a paciência e disposição em ajudar; ao Seu Osvaldo e Wellington pela ajuda no laboratório; ao Dr. Muniz pela agilidade em resolver os problemas; ao Dr. Paulo Castro e Dra. Gilmara Abreu pelo apoio no manejo.

Aos animais do experimento, que mesmo sem saber estão ajudando nos avanços das pesquisas científicas e na conservação de outras espécies de primatas não-humanos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

À UFPA e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Em especial ao Rodrigo Rodrigues, funcionário do PPGCA, pela paciência e profissionalismo.

Ao Laboratório de Fecundação *in vitro* da UFPA.

Aos meus amigos, Laura, Alessandra, Talita, Henrique, Nayra, Lorena, Karla, Júlio e Madson por todas as ligações/Whatsapp, convites e momentos de rizadas, que me tiraram a tensão e me deram força para continuar, porque mesmo quando distantes vocês estavam presentes na minha vida.

A todos os amigos que não citei, mas que de alguma forma contribuíram na conclusão dessa grande etapa.

Muito Obrigada!

“Apenas uma guerra é permitida à  
espécie humana: a guerra contra a  
extinção.”

Isaac Asimov

## RESUMO

O objetivo principal do presente estudo foi estabelecer um protocolo eficiente de criopreservação seminal em *Sapajus apella* para a manutenção da viabilidade espermática. Para isso, foi comparado o desempenho dos diluidores TES-TRIS, ACIN e ACP-118® para escolher do melhor diluidor durante a dissolução do coágulo seminal e resfriamento, para posteriormente ser estabelecido a melhor concentração de glicerol (3; 5 e 7%) a ser adicionado no diluidor, bem como avaliar a suplementação do antioxidante catalase (10 µg e 50 µg) no meio de congelação seminal, no intuito de melhorar os parâmetros espermáticos. Foram utilizados seis machos adultos de *S. apella* oriundos do Centro Nacional de Primatas. As coletas do sêmen foram realizadas por eletroejaculação com probe retal, após a contenção química dos animais com Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina. Na primeira fase do projeto, o sêmen obtido foi diluído em TES-TRIS, ACIN e ACP®-118, mantido em banho-maria a 37 °C. Após dissolução do coágulo, o sêmen foi resfriado em geladeira a 4°C por 90 minutos, e avaliadas após 28h quanto a motilidade, o vigor, e o percentual de integridade de membrana antes e após o resfriamento. ACP®-118 foi o melhor diluidor para preservar a motilidade dos espermatozoides e integridade de membrana plasmática após 28 horas de incubação. A partir desse resultado, foi realizada a criopreservação avaliando diferentes concentrações de glicerol (3, 5 e 7%). Os espermatozoides criopreservados a 3% de glicerol apresentaram melhores resultados. Na segunda fase do projeto, foi realizada a criopreservação do sêmen de *S. apella* em diluidor ACP®-118 suplementado ou não com antioxidante catalase (10µg/mL e 50µg/mL). Todos os tratamentos foram eficazes na manutenção de parâmetros espermáticos, sendo possível a recuperação da motilidade pós-descongelamento. O tratamento catalase 50 foi o melhor de manutenção do vigor durante após resfriamento, e na integridade de membrana plasmática após a descongelação espermática. Em conclusão, ACP-118® pode ser usado de forma eficiente como diluidor para a criopreservação de sêmen *S. apella* adicionado de 3% de glicerol, além de que a adição do antioxidante catalase mostrou efeito benéfico durante esse processo.

**Palavras-chave:** Resfriamento, Congelação, *Sapajus apella*, TES-TRIS, ACIN, ACP-118®, glicerol, catalase.



## ABSTRACT

The main objective of the present study was to establish an efficient semen cryopreservation protocol in *Sapajus apella* for maintaining sperm viability. For this, we compared the performance of TES-TRIS, CWS and ACP-118® extenders during the seminal coagulum dissolution and cooling. Then, in order to improve the sperm parameters, we also determined the glycerol concentration (3; 5 and 7%) as well as to evaluate the effect of catalase antioxidant (10 µg and 50 µg). Therefore, six adult males of *S. apella* from the National Primate Center were used. Semen was collected by electro-ejaculation with rectal probe after chemical restraint of animals with ketamine and xylazine hydrochloride. In the first phase of the project, the semen obtained was diluted in TES-TRIS, CWS and ACP®-118 extenders, kept in a water bath at 37 °C. After coagulum dissolution, the semen was cooled in the refrigerator at 4 °C for 90 minutes and evaluated after 28h for motility, vigor and plasma membrane integrity percentage before and after the cooling. ACP®-118 was the best extender to preserve the motility sperm and plasma membrane integrity after 28 hours of incubation. Based on these results, cryopreservation was performed by evaluation of different concentrations of glycerol (3, 5, and 7%). The cryopreserved sperm to 3% glycerol had better results. In the second project phase was performed *S. apella* semen cryopreservation in ACP®-118 extender supplemented or not with catalase antioxidant (10 µg/mL and 50 µg /mL). All treatments were effective in maintaining sperm parameters and was possible to recovery the post-thaw motility. The catalase 50 treatment was the best for maintenance of the vigor after cooling and plasma membrane integrity in post-thaw sperm. So, we concluded that ACP-118® extender can be efficiently used for *S. apella* semen cryopreservation added 3% glycerol, moreover, the addition of the catalase antioxidant showed beneficial effect during this process.

**Keywords:** Cooling, freezing, *Sapajus apella*, TES-TRIS, CWS, ACP-118®, glycerol, catalase.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Água de coco em pó
CEPAN	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto Evandro Chagas
DBACIN	Diluidor a base de água de coco <i>in natura</i>
DACP	Diluidor a base de água de coco em pó
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EEJ	Eletroejaculação
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IEC	Instituto Evandro Chagas
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
MS	Ministério da Saúde
PMSG	Proteína Sérica da Égua Prenhe
PNH	Primatas não-humanos
O <sup>-</sup>	Ânio superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxil
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TCM 199	<i>Tissue Culture Medium 199</i>
TES	Ácido N-Trishidroximetil-metil-2- aminometanosulfônico
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano

## LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico
g	Gramma
g	Gravidade
U	Unidade Internacionais
Kg	Quilograma
mA	Miliampere
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
μL	Microlitros
μg	Micrograma
>	Maior
<	Menor
V	Volts
%	Porcentagem
±	Mais ou menos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1	A ESPÉCIE <i>Sapajus apella</i> .....	17
3.2	O MACHO DE <i>Sapajus</i> sp. ....	18
3.3	O SÊMEN DE <i>Sapajus apella</i> .....	19
3.4	CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL .....	20
3.5	MEIOS DILUIDORES.....	21
<b>3.5.1</b>	<b>TES-TRIS</b> .....	21
<b>3.5.2</b>	<b>Diluidor a base de água de coco <i>in natura</i></b> .....	22
<b>3.5.3</b>	<b>Diluidor a base de água de coco em pó (ACP®)</b> .....	22
3.6	RESFRIMENTO .....	23
3.7	CRIOPROTETORES.....	24
3.8	ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO.....	25
3.9	FONTES DE ROS SEMINAL.....	27
3.10	AGENTES ANTIOXIDANTES.....	27
<b>3.10.1</b>	<b>Catalase</b> .....	29
	<b>REFERÊNCIA</b>	
<b>4</b>	<b>EFFICACIOUS LONG-TERM COOLING AND FREEZING OF <i>Sapaju paella</i> SEMEN IN ACP-118®</b> (Artigo publicado na revista <i>Animal Reproduction Science</i> ) .....	40
<b>5</b>	<b>EXTENDER SUPPLEMENTATION WITH CATALASE MAINTAINS THE INTEGRITY OF SPERM PLASMA MEMBRANE AFTER FREEZING-THAWING OF SEMEN FROM CAPUCHIN MONKEY</b> (Artigo submetido na revista <i>Zygote</i> ).....	61
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	72

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, de acordo com o relatório divulgado pela União Internacional para a Conservação da Natureza (do inglês *International Union for Conservation of Nature - IUCN*), 49% de todas as espécies de primatas não-humanos (PNH) está ameaçada de extinção, sendo que duas espécies brasileiras: o macaco-caiarara (*Cebus kaapori*) e o bugio-marrom (*Alouatta guariba guariba*) estão listadas entre os 25 primatas mais ameaçados do mundo (IUCN, 2012). Nesse contexto, tecnologia de reprodução assistida (ARTs – do inglês *Assisted Reproductive Technology*) como a criopreservação seminal aliada à fecundação *in vitro* (FIV), vem sendo utilizada visando a conservação de espécies em risco de extinção e com linhagens de alto valor para pesquisa biomédica (WOLF, D.P., 2009).

Em PNH, a criopreservação seminal já foi descrita em diversas espécies como: *Pan troglodytes* (KUSUNOKI et al., 2001), *Saimiri sciureus* (DENIS et al., 1976), *S. collinsi*, *S. vanzolinii*, *S. cassiquiarenses* e *Saimiri boliviensis* (OLIVEIRA, K.G., 2014), *Macaca assamensis* (LI et al., 2004), *Macaca fascicularis* (LI et al., 2005, 2006), *Macaca mulatta* (YANG et al., 2011), *Callithrix jacchus* (O'BRIEN et al., 2003; VALLE, R.R., 2007), *Ateles paniscus* e *Ateles marginatus* (SILVA et al., 2013), e *Sapajus apella* (OLIVEIRA et al., 2011).

Entretanto, uma barreira na criopreservação seminal em *S. apella* é a consistência coagulada do ejaculado (OLIVEIRA et al., 2011), que é de difícil manipulação, não se liquefaz espontaneamente, sendo necessário a fragmentação mecânica do mesmo em soluções tampões para a recuperação dos espermatozoides (NAGLE; DENARI, 1983; ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Logo, para que se tenha sucesso no desenvolvimento de biotécnicas de criopreservação seminal nesta espécie, é necessário o uso de diluidores que mantenham a viabilidade da célula espermática durante a liquefação do coágulo seminal, assim como o estabelecimento das etapas seguintes: o resfriamento e a adição do crioprotetor permeável.

Os diluidores comumente utilizado em PNH são à base dos tampões TES e TRIS (O'Brien et al., 2003; LI et al., 2004; DONG et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; YANG et al., 2011). Mais recentemente, diluidores a base de água de coco *in natura* (ACIN; ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011) e em pó (ACP-118®; OLIVEIRA et al., 2010; LIMA et al., 2013; OLIVEIRA, K.G., 2014) vem sendo empregados em *S. apella* apresentando bons resultados na dissolução do coágulo

seminal. Sabe-se que o efeito do diluidor pode ser determinante sobre qualidade espermática já durante o resfriamento (DONG et al., 2009b), sendo importante a avaliação acurada dessa etapa, antes mesmo de proceder com a congelação propriamente. Em NHP, são poucas as informações acerca dos resultados pós-resfriamento de sêmen, sendo esses dados apresentados apenas em estudos realizados em *Macaca mulatta* (DONG et al., 2008; SI et al., 2010) e *S. apella* (LIMA et al., 2013).

O glicerol é o crioprotetor penetrante mais utilizado em PNH (LI et al., 2005), sendo descrito o uso de concentrações que variam de 2,5% (KUSUNOKI et al. 2001; LI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011) até 15% (LI et al., 2005b). Entretanto, em *S. apella*, as concentrações empregadas foram apenas 2,5% e 3,5% de glicerol em diluidor ACIN e TES-TRIS, respectivamente, não havendo a recuperação da motilidade após a descongelação (OLIVEIRA et al., 2011). Desta forma, mais pesquisas são necessárias acerca da melhor concentração de glicerol a ser adicionado ao meio diluidor para a espécie, no intuito de recuperar a motilidade espermática pós-descongelação.

Estudos têm demonstrado que a adição de antioxidantes no diluidor durante a criopreservação têm melhorado esses parâmetros espermática em bovinos (BILODEAU et al., 2000), equinos (BAUMBER et al., 2002) e ovinos (MAIA et al., 2007), visto que durante esse processo há um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (ROS - do inglês *reactive oxygen species*) (MICHAEL et al., 2007) e diminuição da concentração de antioxidante no sêmen, os quais podem afetar a motilidade e viabilidade espermática pós-criopreservação seminal devido estresse oxidativo e lipoperoxidação lipídica (MARTI et al., 2008).

Recentemente o antioxidante catalase (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2009) foi utilizado no intuito de aumentar a motilidade espermática e reduzir a peroxidação lipídica de espermatozóides submetidos à criopreservação. Contudo, apesar de antioxidantes já terem sido testados em diferentes concentrações nas espécies de mamíferos visando o melhor resultado da ação antioxidativa, somente um trabalho relata o uso em primatas não-humanos visando a sobrevivência dos espermatozóides com baixa criosobrevivência (DONG et al., 2010). Logo, a adição de antioxidantes no meio diluidor pode ser mais uma alternativa para transpor a baixa vitalidade espermática após a criopreservação seminal em *S. apella*, e com isso, posteriormente o uso desta espécie em outras biotecnologias da reprodução animal.

Nesse contexto, propõe-se as seguintes hipóteses científicas:

O uso do crioprotetor glicerol na criopreservação seminal em *Sapajus apella* irá promover a recuperação de motilidade espermática após a descongelação.

A adição de antioxidante no meio diluidor de sêmen de *Sapajus apella* permitirá maior viabilidade dos espermatozoides durante a dissolução do coágulo seminal e durante as etapas que compõem a criopreservação (resfriamento, congelação e descongelação).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Aprimorar a biotecnologia de criopreservação de sêmen para a espécie *Sapajus apella*, estabelecendo um protocolo eficiente para a manutenção da viabilidade espermática.

### 2.2 ESPECÍFICO

- Estabelecer o melhor diluidor a ser utilizado no resfriamento de sêmen da espécie *Sapajus apella*, comparando o desempenho dos diluentes TES-TRIS, a base de água de coco *in natura* (ACN) e em pó (ACP-118®) a 4 °C, com uma curva de -0,4 °C/mi.
- Estabelecer a melhor concentração de glicerol (3; 5 e 7%) a ser adicionado no meio diluente, visando a recuperação da motilidade espermática pós-descongelação.
- Testar a melhor concentração dos antioxidante catalase (10 µg e 50 µg) no meio de congelamento do sêmen, para melhorar a motilidade e manter a viabilidade espermática.

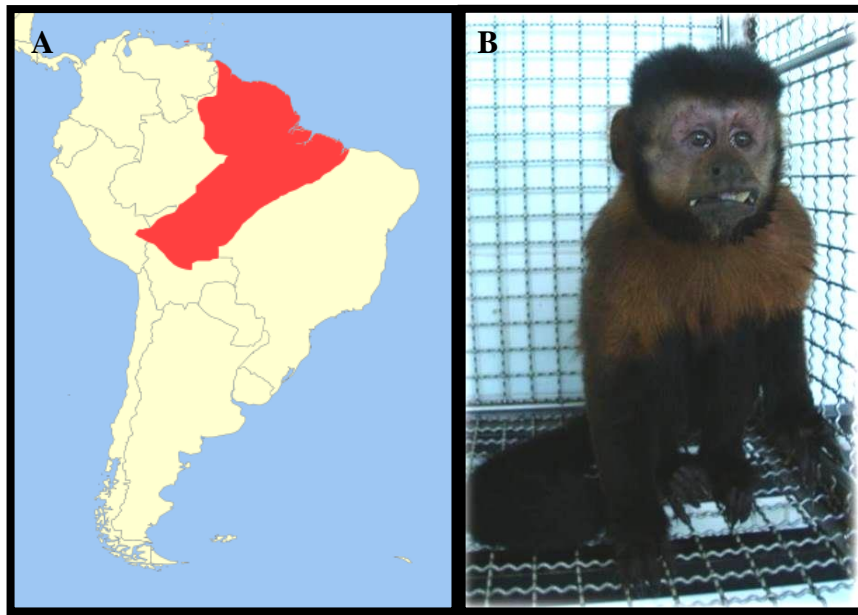


### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A ESPÉCIE *Sapajus apella*

A classificação taxonômica das espécies de primatas neotropicais do gênero *Cebus*, popularmente conhecidas como macaco-prego (*capuchin monkey*), sofreram uma revisão e reorganização (SILVA, JR., 2002; ALFARO et al., 2012a; 2012b;). Hershkovitz (1949), Hershkovitz (1955) e Hill (1960) propuseram uma divisão baseada na presença ou ausência de tufo, a qual atualmente foi substituída pela classificação morfológica (grácil e robusto), de acordo com a morfologia craniana e pós-craniana desses animais (SILVA, J.R., 2001; 2002; ALFARO et al., 2012b) e características moleculares (CASADO et al., 2010). Desta forma, as espécies pertencentes ao gênero *Cebus* - *C. libidinosus*, *C. xanthosternos*, *C. nigrinus*, *C. apella*, *C. robustus*, *C. macrocephalus*, *C. cay* e *C. flavius* foram reagrupadas no gênero *Sapajus* (SILVA, JR., 2001)

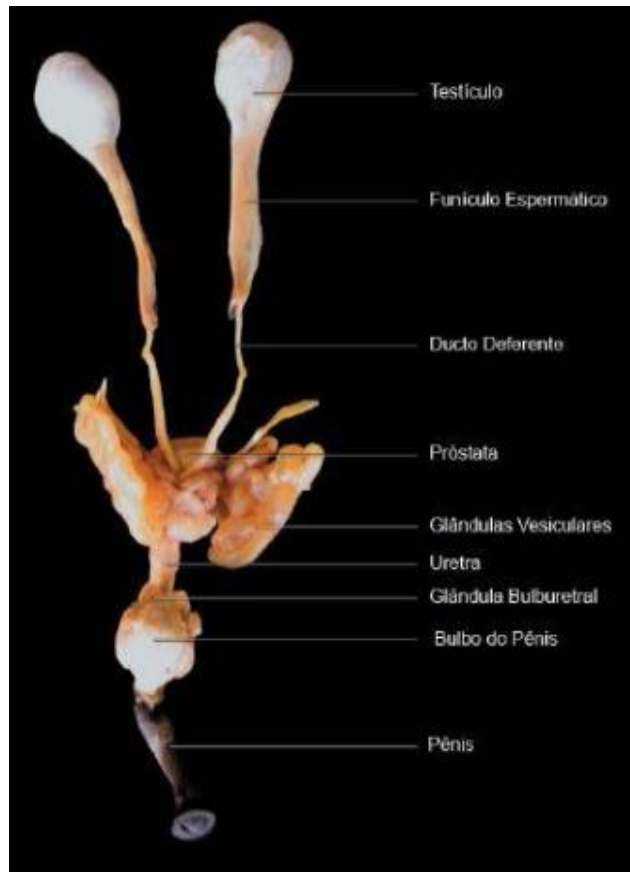
No tocante à distribuição geográfica, a espécie *S. apella* ocorre no centro-leste da Colômbia, sul da Venezuela, Guianas e norte do Brasil (ALFARO et al., 2012a) (Figura 1A). São animais de porte médio, os machos possuem entre 0,32 a 0,56 m de comprimento, e a cauda tem entre 0,30 a 0,55 m; pesam em média 4 kg quando alcançam a maturidade sexual, por volta dos 8 anos de idade (KINDLOVITS; KINDLOVITS, 2009), possuem um sistema poligâmico de acasalamento e as fêmeas reproduzem-se preferencialmente com o macho dominante (ROWE, N., 1996). A pelagem destes animais é comprida e densa, com o dorso apresentando uma faixa de coloração marrom escura, sendo que os membros, o topete e a cauda são pretos (KINDLOVITS; KINDLOVITS, 2009) (Figura 1B).



**Figura 1:** (A) Distribuição geográfica da espécie *S. apella* segundo Alfaro et al. (2012). ([http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Sapajus\\_apella](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Sapajus_apella)) e (B) exemplar macho oriundo do Centro Nacional de -Pa.

### 3.2 O MACHO DE *Sapajus* sp.

O sistema reprodutor do macho de *Sapajus sp.* é constituído por dois testículos, dois epidídimos, dois ductos deferentes, duas vesículas seminais, próstata, duas glândulas bulbo-uretrais (TEIXEIRA, D.G., 2005), possui um pênis dotado de um vestígio de osso peniano (báculo) e uma glândula muito desenvolvida em formato de prego, o que lhe conferiu o nome popular: “macaco-prego” (NAPIER; NAPIER, 1986; HONEYSETT, 2006) (Figura 2).



**Figura 2:** Trato reprodutor masculino de *Sapajus apella*. Fonte: Teixeira, D.G (2005).

### 3.3 O SÊMEN DE *Sapajus apella*

De acordo com alguns autores, o sêmen de *S. apella* é constituído de duas frações, uma líquida e outra coagulada (NAGLE; DENARI, 1983; PAZ et al., 2006; ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA, K.G., 2010).

A fração coagulada (Figura 3) é caracterizada por ter um aspecto gelatinoso de difícil dissolução (NAGLE; DENARI, 1983; VANDERVOORT, C.A., 2004; HERNANDEZ-LOPEZ et al., 2008, ARAÚJO, L.L., 2009, OLIVEIRA, K.G., 2010), sendo descrita como a fração que apresenta a maior concentração de espermatozoides com média de:  $1.6 \times 10^8 \pm 9 \times 10^8$  (ARAÚJO et al., 2009);  $1,1 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$  (OLIVEIRA et al., 2010) e  $1.806 \pm 367 \times 10^6$  (OLIVEIRA et al., 2011) espermatozóides/ml.

Em *S. apella*, protocolos visando a dissolução desse coágulo seminal já foram desenvolvidos utilizando solução salina a 0,9% (NAGLE; DENARI, 1983); TCM 199 acrescido de hialuronidase e tripsina (PAZ et al., 2006), diluidores à base de água de

coco *in natura* (ARAÚJO et al., 2009) e água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>-118; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; LIMA et al., 2013), bem como TES-TRIS (OLIVEIRA et al., 2011). Porém, esses autores relatam a presença de espermatozoides imóveis (NAGLE; DENARI, 1983; ARAÚJO et al., 2009) ou com baixa viabilidade espermática (OLIVEIRA et al., 2010) após a dissolução total do coágulo seminal.



**Figura 3:** Fração coagulada do sêmen de *S. apella* coletado por eletroejaculação.

### 3.4. CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL

A criopreservação seminal possui como princípio congelar o espermatozoide, reduzindo reversivelmente a sua atividade metabólica por meio do frio (THURSTON et al., 2002). Essa biotécnica envolve uma série de etapas sequenciais (diluição, resfriamento, adição de crioprotetor e congelamento/descongelamento), que iram determinar o sucesso desse processo (DONG et al., 200b).

Em primatas não-humanos (PNH), diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de se obter o melhor protocolo de criopreservação seminal para a espécie em estudo, dentre elas temos: *Cercopithecus aethiops*, *Erythrocebus patas*, *Macaca speciosa*, *Macaca mulata* (ROUSSEL; AUSTIN, 1967), *Pan troglodytes* (ROUSSEL; AUSTIN, 19677; KUSUNOKI et al., 2001), *Papio anubis* (KRAEMER; VERA CRUZ, 1969), *Saimiri sciureus* (DENIS et al., 1976) e *S. collinsi*, *S. vanzolinii*, *S. cassiquiarenses* (OLIVEIRA, K.G., 2015), *Macaca assamensis* (LI et al., 2004); *Macaca fascicularis* (LI et al., 2005, 2006), *Gorilla gorilla* (LAMBERT et al., 1991), *Macaca thibetana* (CHEN et al., 1994), *Callithrix jacchus* (O'BRIEN et al., 2003; VALLE, R.R., 2007), *Macaca fuscata* (SANKAI et al., 1997; LI et al., 2005), *Macaca*

*mulatta* (DONG et al., 2009a; SI et al., 2010; YANG et al., 2011); *S. apella* (OLIVEIRA, et al., 2011); *Alouatta caraya* (CARVALHO, F.M., 2012); *Ateles paniscus* e *A. marginatus* (SILVA et al., 2013)

### 3.5. MEIOS DILUIDORES

Segundo Holt (2000), a existência de diferenças na composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides entre as espécies, raças e ainda entre indivíduos da mesma espécie, pode explicar o maior ou menor efeito protetor de um diluente aos espermatozoides de um determinado indivíduo. Logo, a composição do diluente é de suma importância e deve ser específica para cada espécie.

Um diluidor desejável caracteriza-se por apresentar pressão osmótica compatível com o plasma seminal, fornecer energia e nutrientes, e ter a capacidade de neutralizar produtos tóxicos originados do metabolismo espermático, bem como possuir ação tamponante para compensar as alterações de pH resultado da formação de íons hidrogênio, que tornam o meio ácido, e são oriundos da atividade metabólica dos espermatozoides, proteger a célula contra os danos causados pelas mudanças de temperatura, proporcionar a estabilidade da integridade da membrana plasmática, além de inibir o crescimento bacteriano, proporcionando desta forma o aumento da longevidade espermática (VISHWANATH; SHANNON, 2000; ALBERTI, K., 2004).

#### 3.5.1 TES-TRIS

O diluidor TES-TRIS é composto pelos tampões TES (ácido N-Trishidroximetilmetil-2 aminometanosulfônico) e TRIS (hidroximetil aminometano) adicionado de uma fonte de energia e antibiótico (OLIVEIRA et al., 2011).

Contudo, apesar de apresentar ação tamponante, foi demonstrado que o TRIS também atua na redução do metabolismo da frutose pelos espermatozoides, contribuindo assim para a preservação de energia pela célula espermática (RODRIGUES, B.A.,1997).

O TES-TRIS tem sido utilizado em diferentes espécies de PNH, tanto do Velho Mundo: *Macaca assamensis* (LI et al., 2005), *M. fascicularis* (LI et al., 2000), *Macaca fuscata* (SANKAI et al., 1997), *M. mulatta* (SANCHEZ-PARTIDA et al., 2000. DONG et al., 2009a), *Papio anubis* (O'BRIEN et al., 2003) e *Pan troglodytes* (KUSUNOKI et al., 2001; O'BRIEN et al., 2003), quanto do Novo Mundo: *Callithrix jacchus*

(O'BRIEN et al., 2003), *Ateles paniscus* e *A. marginatus* (SILVA, K.S.M, 2005) e *S. apella* (OLIVEIRA et al., 2011).

### **3.5.2 Diluidor a base de água de coco *in natura***

A água de coco é o endosperma líquido encontrada dentro da cavidade do fruto (*Cocos nucifera*), que ganhou popularidade na indústria em diferentes áreas devido ao seu alto valor nutricional e potencial terapêutico (CAMPBELL-FALCK, 2000).

No tocante à tecnologia do sêmen, a água de coco *in natura* (ACIN) possui em sua composição físico-química substâncias importantes para a conservação da célula espermática, tais como sais (potássio, sódio, cálcio, magnésio), glicose e sacarose (TAN et al., 2014) que agem estabilizando as membranas fosfolipídicas (HINCHA et al., 2006); além de vitaminas (A, C e complexo B) (YONG et al., 2009) e do hormônio vegetal, o ácido-3-indol-acético (TONIOLLI et al., 1996; YAN et al., 2014). Chang e Wu (2011) também relatam a presença dos fitonutrientes (+)-catequina e (-)-epicatequina que possuem atividades antimicrobianas e antioxidantes.

O uso de diluidores a base de água de coco *in natura* (DBACIN) tem proporcionado bons resultados na manutenção dos parâmetros espermáticos em: porco (TONIOLLI, R., 1989), carneiro e bode (NUNES; SALGUEIRO, 1999), cães (UCHOA et al., 2002; CARDOSO et al., 2006), macaco-prego (OLIVEIRA et al., 2011) e no homem (NUNES, J.F., 1998).

### **3.5.3 Diluidor a base de água de coco em pó (ACP®)**

Os excelentes resultados obtidos nos primeiros estudos, em diversas espécies, com a água de coco *in natura* para a conservação da célula espermática, levaram à elaboração de um meio diluidor à base de água de coco em pó (DBACP), visando transpor barreiras que o DBACIN possui, como: a diferença na composição e a indisponibilidade do fruto *C. nucifera* em algumas regiões ou países; e o período da colheita, ou seja, a idade do fruto que é utilizado no preparo do diluidor (CARDOSO et al., 2007).

A água de coco em pó (ACP®) é produzida a partir da extração do líquido endospermico do coco (água de coco) (CARDOSO et al., 2007) por meio do processo de atomização pela técnica de *spray dryer* (SILVA et al., 2011). Essa tecnologia permite

que as características bioquímicas encontradas no fruto *in natura* sejam mantidas, não havendo também perdas durante o período de estocagem.

A ACP® possui como vantagem o fato de ser fabricada de acordo com as características seminais de cada espécie estudada (SILVA et al., 2011) e a praticidade de uso a campo, pois o preparo é realizado apenas com a diluição já estabelecida pelo fabricante em água destilada ou ultrapura (ACP® Biotecnologia) (Figura 4).

O DBACP já foi utilizado como meio diluidor na criopreservação de espermatozoides de diferentes animais domésticos, como: cão (CARDOSO et al., 2005; BARBOSA et al., 2007; UCHOA et al., 2012), gato (SILVA et al., 2007), carneiro (CAVALCANTE et al., 2012), bode (OLIVEIRA et al., 2011), garanhão (SAMPAIO-NETO et al., 2002), e em animais silvestres como: cutia (SILVA et al., 2011), catetos (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2013; CAMPOS et al., 2014) e macaco-de-cheiro (OLIVEIRA, K.G., 2015).



**Figura 4:** (A) Pacote contendo água de coco em pó específica para primatas (Número de Registro: ACP® 118) fornecida pela empresa ACP® Biotecnologia, (B) e após a diluição em água ultrapura.

### 3.6 RESFRIAMENTO

Sabe-se que os efeitos do diluidor sobre a qualidade espermática desde a etapa de resfriamento, podem determinar a capacidade fecundante do espermatozoide pós-descongelação (DONG et al., 2009b). O que possivelmente pode ser devido ao fato de que, quando o resfriamento é efetuado de modo inadequado ocorre um choque térmico na célula espermática, o qual induz a danos ao espermatozóide, que se caracteriza por padrão anormal de movimento (movimento circular ou retrógrado), rápida perda da

motilidade, lesão acrossomal, dano à membrana plasmática e redução da atividade metabólica dos espermatozoides (GRAHAM, J.K, 1996).

Em PNH, o resfriamento tem sido comumente realizado com uma curva de temperatura que vai da ambiente a 4 °C em um refrigerador por duas horas (LI et al., 2005 b; DONG et al., 2008; SI et al., 2010). Esse protocolo também foi realizado na criopreservação seminal em *S. apella* por Oliveira et al. (2011), entretanto dados referentes aos parâmetros espermáticos pós-resfriamento não foram relatados pelos autores, os quais já poderiam indicar baixa eficiência do diluidor para a espécie.

### 3.7 CRIOPROTETORES

Os crioprotetores são utilizados no meio diluidor para proteger os espermatozoides contra a formação de cristais de gelo intracelular, que resultam em lesões na membrana plasmática e inviabilizam a célula espermática (WATSON, P.F., 2000). Sabe-se que a integridade da membrana plasmática possui papel fundamental na motilidade espermática, assim como na viabilidade dos espermatozoides para eventos futuros importantes na fecundação, tais como: capacitação, reação acrossômica e penetração na membrana plasmática oocitária (SALAMON; MAXWELL, 2007; SAID et al., 2010).

As substâncias crioprotetoras são divididas em dois grupos: os permeáveis ou intracelulares, e impermeáveis ou extracelulares. Essa classificação é realizada de acordo com o peso molecular e a consequente propriedade de atravessar ou não a membrana plasmática dos espermatozoides. Os crioprotetores permeáveis são essenciais no meio diluidor para minimizar ou prevenir a formação de cristais de gelo intracelular, sendo que o glicerol, o etilenoglicol e dimetilsulfóxido são os mais utilizados. Enquanto que os crioprotetores impermeáveis, como as lipoproteínas da gema do ovo e as proteínas do leite, auxiliam na estabilização da membrana plasmática durante o processo de congelação/descongelação (MORRELL; HODGES, 1998).

O glicerol ou propano- 1,2,3 triol é o crioprotetor intracelular mais empregado na congelação do sêmen de diferentes espécies e possui a capacidade de penetrar através das membranas celulares, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma, impedindo, dessa forma, a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (WATSON, P.F., 2000). Em PNH, as concentrações desse crioprotetor utilizadas no meio diluente variam de 2,5% (KUSUNOKI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2011) a



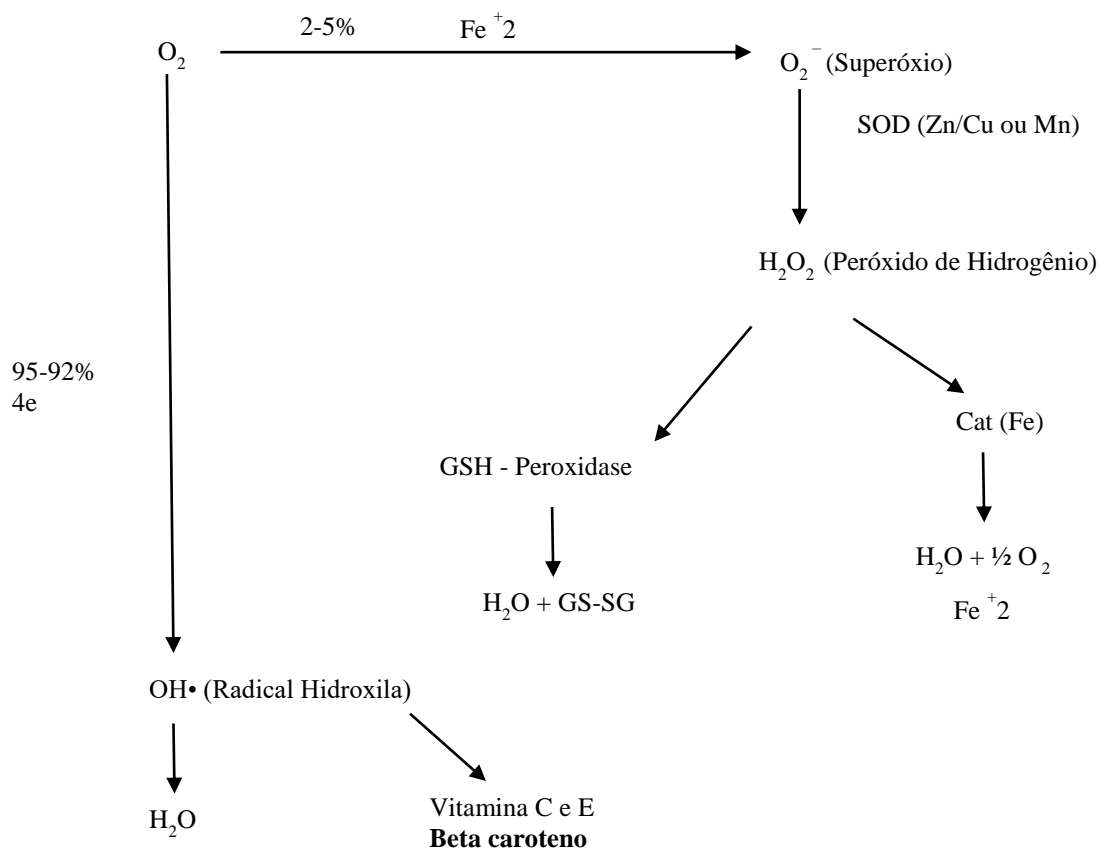
15% (LI et al., 2005), porém na espécie em estudo *S. apella*, somente um trabalho relatou a congelamento de sêmen em água de coco *in natura* (ACIN) e TES-TRIS (OLIVEIRA et al., 2011) a 2,5% e 3,5% de glicerol, respectivamente.

A escolha da concentração de glicerol é determinada de acordo com as características seminais que se quer criopreservar, visto que em altas concentrações, esse crioprotetor exerce efeitos tóxicos sobre os espermatozoides, como desnaturação das proteínas, alteração nas interações de actina, em eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade intracelular pela presença do glicerol, na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos atuando diretamente na membrana plasmática, além de alterações no glicocálix e nas proteínas da superfície celular (ALVARENGA et al., 2000; HOLT, W.V., 2000). Esses eventos resultam na desorganização e lesão da membrana plasmática e conseqüentemente (BUHR et al., 2001) perda da motilidade e capacidade fecundante dos espermatozoides (LI et al., 2005).

Outro fator que pode implicar no sucesso da criopreservação seminal é o momento em que o glicerol é adicionado no meio diluidor (glicerolização), o qual pode ocorrer de duas maneiras: no momento da diluição inicial, a temperatura ambiente, ou após a etapa do resfriamento, a cerca de 4° C, protocolo este que visa reduzir o efeito tóxico do glicerol por diminuir o período de exposição dos espermatozoides (KUMAR et al., 2003). A adição do glicerol após o resfriamento, já tem sido utilizado com bons resultados em cães (CARDOSO et al., 2007; UCHOA et al., 2012), cateto (SILVA et al., 2012) e em macaco cinomolgo (LI et al., 2005).

### 3.8 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Nos organismos aeróbios a maior parte do oxigênio (O<sub>2</sub>) utilizado para a produção de energia é reduzido em água pelas mitocôndrias por meio da ação da enzima citocromo oxidase (transferência de quatro elétrons para o oxigênio), e cerca de 2-5% do O<sub>2</sub> é reduzido enzimaticamente, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen species*) (GRISSA et al., 2007) (Figura 5). As ROS são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Dentre elas temos: ânio superóxido (O<sup>-</sup>), radical hidroxil (OH<sup>-</sup>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (AGARWAL et al., 2003).



**Figura 5:** Formação das ROS (SOD – Superóxido dismutase, Cat – Catalase,  $O_2^{\bullet-}$  – Superóxido,  $O_2$  – Oxigênio, GSSH – Glutaciona Oxidada, GSH – Glutaciona Peroxidase,  $H_2O$  – Água,  $OH^{\bullet}$  – Radical Hidroxila, GSH – Glutaciona Reduzida,  $H_2O_2$  – Peróxido de Hidrogênio).

O anião  $O_2^{\bullet-}$  é gerado principalmente na membrana mitocondrial, por meio da cadeia respiratória e também por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Apesar de ser o primeiro radical livre a ser formado a partir do oxigênio, é rapidamente catalisado pela superóxido dismutase para formar  $H_2O_2$  (BURNAUGH et al., 2007). É caracterizado por ser pouco reativo e não ter habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido. Contudo, o  $H_2O_2$  possui vida longa e é capaz de atravessar as membranas biológicas (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

O  $\text{OH}\cdot$  é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, podendo desencadear a peroxidação lipídica. É formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais ( $\text{Fe}^{++}$  ou  $\text{Cu}^+$ ), denominada reação de Fenton (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Contudo, em condições fisiológicas, ou seja, em concentrações reduzidas, as ROS mediam funções espermáticas normais, como capacitação, hiperativação, reação acrossômica e fusão do espermatozoide-oócito, diminuindo a capacidade fecundante dos espermatozoides (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). Entretanto, em altas concentrações, podem causar injúrias oxidativas em membranas lipídicas, proteínas trans membranas e nos ácidos nucleicos (OCHSENDORF, F.R., 1999). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é o responsável pela depleção da adenosina trifosfato espermática, com a consequente diminuição da motilidade, ruptura da membrana plasmática, lesões na cromatina, assim como a peroxidação lipídica (PERIS et al., 2007).

### 3.9 FONTES DE ROS SEMINAL

Há duas fontes principais de ROS no sêmen: os leucócitos e os espermatozoides imaturos (GARRIDO et al., 2004).

Os espermatozoides produzem ROS principalmente quando há alterações durante a espermatogênese, os quais resultam na presença de citoplasma residual, como gota citoplasmática proximal e distal, fato este que está relacionado com ao aumento na produção de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) pela célula espermática imatura, o qual é uma fonte de elétrons para a produção de ROS (RODRIGUES, M.P., 2009). Aitken (1995) sugere que a NADPH, seja a principal fonte de elétrons responsáveis pela produção de  $\text{O}_2^-$  pelo espermatozoide humano com o possível envolvimento do sistema NAD(P)H-oxidase presente na membrana plasmática dos espermatozoides, como acontece em outros tipos de células.

Outro sítio de produção de ROS é a mitocôndria presente na peça intermediária dos espermatozoides, devido esta organela ser a principal fonte de respiração e produção de energia celular (KOTHARI et al. 2010).

### 3.10 AGENTES ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são um conjunto de substâncias formadas por vitaminas, minerais, enzimas (STEDMAN et al., 2003) que regulam, removem e suprimem a formação de

ROS ou impedem suas ações (SIKKA, S.C., 2004), sendo classificados como enzimáticos e não enzimáticos.

Os antioxidantes enzimáticos são composto pelas enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e glutathione peroxidase (ANDRADE et al., 2010). Já os antioxidantes não enzimáticos incluem a vitamina E ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ -tocoferol), a vitamina A, o ácido ascórbico (Vitamina C) e selênio (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Com exceção da vitamina E, o qual é um antioxidante estrutural da dupla camada lipídica de membranas celulares, a maioria dos antioxidantes está localizada no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Diferentemente da maioria das células, os espermatozoides perdem a maior parte do seu citoplasma durante a maturação, o que acarreta na diminuição da defesa antioxidante endógena celular, além de possuírem uma membrana plasmática rica em ácidos graxos poli-insaturados, o que os torna vulneráveis a ação das ROS (CARVALHO et al., 2002; ZALATA et al., 2004).

Desta forma, a célula espermática necessita da proteção dos antioxidantes presentes no plasma seminal (SIKKA, S.C., 2004). Entretanto, no processo de criopreservação seminal, a etapa de diluição reduz a concentração dos antioxidantes naturais presentes no plasma seminal, resultando no desequilíbrio do sistema oxidante-antioxidante, e, conseqüentemente, no estresse celular (BILODEAU et al., 2000; AGARWAL et al., 2006). O processo de congelação-descongelação também causa peroxidação lipídica e danos à membrana plasmática, devido ao rápido aumento na utilização de oxigênio pelas células espermáticas, com maior produção de radicais livres e lesão no DNA (BALL; VO, 2001).

A adição de antioxidantes ao diluidor de sêmen tem sido descrito como uma alternativa no intuito de neutralizar os efeitos tóxicos dos ROS, garantindo a proteção e viabilidade da célula espermática (MAIA; BICUDO, 2009), em diferentes mamíferos como cães (KMENTA et al., 2011), gato de cabeça chata (THUWANUT et al., 2011), touro (PAUDEL et al., 2010), carneiro (SILVA et al 2013; MATA-CAMPUZANO et al., 2014), macaco rhesus (DONG et al., 2010) e no homem (TAYLOR et al., 2009, MINAEI et al., 2012).

### 3.10.1 Catalase

A catalase é uma enzima antioxidante intracelular encontrada na maioria dos organismos nos peroxissomos, que são organelas envolvidas por uma membrana vesicular presente no citoplasma, principalmente dos animais, responsável pelo armazenamento das enzimas que estão relacionadas ao metabolismo do  $H_2O_2$ , o qual é tóxico à célula espermática por ser o precursor na formação do radical  $OH^\cdot$  (ORTEGA et al., 2003).

Esse antioxidante pertencente à subclasse das enzimas oxidorredutases, que destroem o  $H_2O_2$ , convertendo-o em água e oxigênio, prevenindo a formação de  $OH^\cdot$  sendo encontrada principalmente no plasma seminal (BARREIROS et al., 2006; SICHERLE et al., 2011). A atividade da catalase é dependente da membrana espermática que contem a enzima nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), o qual é uma enzima de ligação para proteger a catalase da inativação, aumentando conseqüentemente sua atividade (SICHERLE et al., 2011).

Ball et al. (2000) verificaram a presença da catalase no plasma seminal, oriundo principalmente da glândula prostática, e concluíram que práticas que podem remover o plasma seminal acarretam na diminuição da atividade enzimática de remoção do  $H_2O_2$ , o que expõem a célula espermática ao estresse oxidativo. Desta forma, com o uso de catalase no diluidor durante a criopreservação do sêmen diminuem a exposição dos espermatozoides a níveis altos de ROS, evitando assim a peroxidação lipídica e injúrias espermáticas (AWDA et al., 2009), melhorando desta forma a motilidade e viabilidade dos espermatozoides (MOUBASHER et al., 2013).

A catalase tem sido usada na proteção dos espermatozoides contra o estresse oxidativo em garanhão (BAUMBER et al., 2002), touro (KRZYZOSIAK et al., 2000; BILODEAU et al., 2002), carneiro (SILVA et al., 2010) e no homem (MAIA et al., 2009)

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 503-512, 2006.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, p.829–843, 2003.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.
- ALBERTI, K. **Congelação de sêmen Bovino: Novos enfoques em meios diluentes**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Botucatu, 2004.
- ALFARO, J.W.L. et al. Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. **Journal of Biogeography**, v. 39, 272–288, 2012a.
- ALFARO, J.W.L; SILVA JR, J.S.; RYLANDS, A.B. How Different Are Robust and Gracile Capuchin Monkeys? An Argument for the Use of *Sapajus* and *Cebus*. **American Journal of Primatology**, v. 00, p. 1–14, 2012b.
- ALVARENGA, M.A. et al. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 6, p. 541-545, 2000.
- ANDRADE, E.R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.79-85, 2010.
- ARAÚJO, L.L. et al. Uso de solução à base de água de coco a 37°C como diluidor de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) mantido em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira (UFG)**, v. 10, n. 2, p. 588-94, 2009.
- AWDA, B.J., MACKENZIE-BELL, M., BUHR, M.M. Reactive oxygen species and boar sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 81, n.3, p. 553–561. 2009.
- BALL, B.A. et al. Catalase activity in equine semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, p.1026–1030, 2000.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069. 2001.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 10, p 49-62, 2009.
- BARBOSA, C.C. **Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®): Efeito da temperatura de adição do**

**glicerol e da adição de antibiótico.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Extresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29,p.113-123, 2006.

BAUMBER, J. et al. Generation of reactive oxygenspecies by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p. 1025–1033, 2002

BILODEAU, J.F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282–288, 2000.

BILODEAU, J.F. et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk tris extender: protection pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-1122, 2002.

BUHR M.M. et al. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. **Journal of Andrology**, v.22, p. 961–969, 2001.

BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v.67, p.580–589, 2007.

CAMPBELL-FALCK, D. et al. The intravenous use of coconut water. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 18, p.108–111, 2000.

CAMPOS, L.B. et al. Sobrevivência de espermatozoides de catetos (*Pecari tajacu*) após congelação-descongelação no uso de diferentes diluentes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1; p. 1-7.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Use of the powdered coconut water (ACP®-106) for cyopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.2, p.257-262, 2005.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p.384–391, 2006.

CARDOSO, R.C.S. et al. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP®-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p. 11-16, 2007.

CARVALHO, F.M. **Avaliação de diluidores à base de gema de ovo e de lecitina de soja para a congelação de sêmen de *Alouatta caraya*.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Unesp, Campus de Jaboticabal, 2012.

CARVALHO, O.F. et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho.

**Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, 2002.

CASADO, F. et al. Mitochondrial divergence between 2 populations of the hooded capuchin, *Cebus (Sapajus) cay* (Platyrrhini, Primates). **Journal of Heredity**, v. 101, n.3, p.261-269, 2010.

CAVALCANTE, J.M.M. **Proteínas do plasma seminal na criopreservação do sêmen ovino em água de coco em pó (ACP-102c) ou TRIS**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2012.

CHANG, C. L.; WU, R. T. Quantification of (+)-catechin and (-)-epicatechin in coconut water by LC-MS. **Food Chemistry**, v. 126, p.710–717, 2011.

CHEN, J.C. et al. M. Semen cryopreservation in the Tibetan macaque (*Macaca thibetana*)-comparison of different cooling programs and freezing media. **Acta Zoologica Sinica**, v. 40, p. 174-81, 1994.

DENIS, L.T. et al. Freeze preservation of squirrel monkey sperm for use in timed fertilization studies. **Fertility and Sterility**, v. 27, p. 723-729, 1976.

DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A.E. et al. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p.856-870, 2010.

DONG, Q. et al. Cryopreservation of Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Epididymal Spermatozoa Before and After Refrigerated Storage. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 3, p. 61-69, 2008.

DONG, Q. et al. Antioxidants, Oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol improved postthaw survival of rhesus monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival. **Fertility and Sterility**, v. 94, n.6, p. 2359-2361, 2010.

DONG, Q.; CORREA L. M.; VANDEVOORT C. A. Rhesus monkey sperm cryopreservation with TEST-yolk extender in the absence of permeable cryoprotectant. **Cryobiology**. v. 58, p. 20–27, 2009a.

DONG, Q.; HILLA D.; VANDEVOORT, C.A. Interactions among pre-cooling, cryoprotectant, cooling, and thawing for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. **Cryobiology**, v. 59, n.3, p. 268–274, 2009b.

FERNANDEZ-SANTOS, M.R. et al.. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. **International Journal of Andrology**, v. 32, p.353-359, 2009.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, 1997.



GARRIDO, N. et al. Pro-oxidative and antioxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v.6, p.59–65, 2004.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, p.131-145, 1996.

GRISSA, O. et al. Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia. **Translational Research**, v.50, p.164-71, 2007.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L. et al. Seasonal emission of seminal coagulum and *in vivo* sperm dynamics in the Black-handed Spider Monkey (*Ateles geoffroyi*). **Theriogenology**, v. 69, p. 466-472, 2008.

HERSHKOVITZ, P. Mammals of northern Colombia. Preliminary report No. 4: Monkeys (Primates) with taxonomic revisions of some forms. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 98, p. 323–427, 1949.

HERSHKOVITZ, P. Notes on American monkeys of the genus *Cebus*. **Journal of Mammalogy**, v.36, p. 449–452, 1955.

HILL, W.C.O. **Primates: comparative anatomy and taxonomy**. IV. Cebidae, Part A. Edinburgh University Press, Edinburgh, 1960.

HINCHA, D.K.; POPOVA, A.V.; CACELA, C. Effects of sugars on the stability and structure of lipid membranes during drying. In: Leitmannova A, editor. Advances in planar lipid bilayers and liposomes. Academic Press; p. 127–82, 2006.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**. v. 62, p. 3–22. 2000.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 17 out. 2014.

KINDLOVITS, A.; KINDLOVITS, L.M. Primatas em Cativeiro: Classificação, Descrição, Biologia, Comportamento e Distribuição Geográfica. In: \_\_\_\_\_. **Clínica e Terapêutica em Primatas Neotropicais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros, cap. 1, 2009.

KMENTA, I. et al. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, p.1095–1103, 2011.

KOTHARI, S. et al. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, p.425–435, 2010.

KRAEMER, D. C.; VERA CRUZ, N. C. Collection, gross characteristics and freezing of baboon semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 20, p. 345-348, 1969.

- KRZYZOSIAK, J. et al. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction and Fertility**, v.12, p. 251-261, 2000.
- KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v. 46, p.246–253, 2003.
- KUSUNOKI, H. et al. Birth of a Chimpanzee (*Pan troglodytes*) after artificial insemination with cryopreserved epididymal spermatozoa collected postmortem. **Zoo Biology**, v. 20, p. 135–143, 2001.
- LAMBERT, H. et al. Penetration of zona-free hamster oocytes by ejaculated cryopreserved gorilla spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.56, p. 1201-03, 1991.
- LI, X.; DAYONG, G.; WEIZHI, J.I. Cryopreservation of Sperm of an Endangered Species-Assamese Macaque. **Cell Reservations Technology**, v 2, n.1, p. 29-30. 2004.
- LI, Y. et al. Effects of Various Extenders and Permeating Cryoprotectants on Cryopreservation of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.26, n. 3, P. 387-395, 2005a.
- LI, Y. et al. Cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa in a chemically defined extender. **Asian Journal of Andrology**, v. 7, n.2, p. 139–144, 2005b.
- LI, Y. et al. Comparative Studies With Six Extenders for Sperm Cryopreservation in the Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) and Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*). **American Journal of Primatology**, v. 68, p. 39–49. 2006.
- LIMA, J.S. et al. Embryo production by parthenogenetic activation and fertilization of *in vitro* matured oocytes from *Cebus apella*. **Zygote**, v.10, p. 1-5, 2013.
- MAIA, M.S. et al. Effect of Trolox addition on the motility and membrane integrity of ram spermatozoa with high and low freezability. In: Jeungell, J.L., Murray, J.F., Smith, M.F. (Eds.), **Reproduction in Domestic Animals**, v.64, p.467–467, 2007.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais Livres, Antioxidantes e Função espermática em Mamíferos: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V33, p.183-193, 2009.
- MARTI, E. et al. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.29, p.459–467, 2008.

- MATA-CAMPUZANO, M. et al. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidante supplementation and choice of extender. **Theriogenology**, 1-9, 2014.
- MICHAEL, A. et al. Effect of antioxidante supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.68, p.204–212, 2007.
- MINAEI, M.B. et al. Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.10, n.2, p. 99-104, 2012.
- MORRELL, J.M.; HODGES, J.K. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. **Animal Reproduction Science**, v.53, p. 43-63, 1998.
- MOUBASHER, A.E. et al. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. **Andrologia**, v.45, p.135–139, 2013.
- NAGLE, C.A.; DENARI, J.H. The Cebus Monkey (*Cebus apella*). In: HEARN, J.P. **Reproduction in New World Primates**. Boston: MT Press, Lancaster, p. 41-67, 1983.
- NAPIER, J.R.; NAPIER, P.H. **Structure and Function**. The Natural history of the primates. Cambridge: The MITT Press, p. 30-59, 1986.
- NORBERG, J; ÁRNER E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.
- NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, p.109-112, 1998.
- NUNES, J.F.N.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v.1, n.1, p. 17-26, 1999.
- O'BRIEN, J. K. et al. Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 367–375, 2003.
- OCHSENDORF F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v. 5, p.399 -420, 1999.
- OLIVEIRA KG. **Ativação espermática e criopreservação do sêmen de macaco-prego (*Cebus apella*) em diluidores à base de água de coco in natura e TES-TRIS**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, 2010.
- OLIVEIRA, K.G. **Biometria testicular, caracterização e congelamento de sêmen de macacos-de-cheiro de vida livre (*Saimiri vanzolinii*, *S. cassiquiarenses* e *S.***

*macrodon*) e cativoiro (*S. collinsi*) em água d coco em pó (ACP®-118). 2014. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, 2014.

OLIVEIRA, K.G. et al. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES–TRIS. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 75-80, 2011.

OLIVEIRA, K.G. et al. Conservação do sêmen e liquefação do coágulo seminal macaco-prego (*Cebus apella*) em água de coco em pó (ACP-118®), em diferentes temperaturas. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 4, n. 3, p. 617-621, mar. 2010.

ORTEGA, A.M. et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes em la preservación de sêmen: Una revisión. **Sitio Argentino de Producción Animal**, v. 28, n. 12, 2003.

PAUDEL, K.P. et al. Ascorbic acid, catalase and chlorpromazine reduce cryopreservation-induced damages to crossbred bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.256–262, 2010.

PAZ, R.C.R. et al. O efeito das enzimas hialuronidase e tripsina na liquefação do sêmen de macacos-pregos (*Cebus apella*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 196-201, 2006.

PERIS, S.I. et al. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p. 878–892, 2007.

RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado**. 1997. 176p. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul. 1997.

RODRIGUES, M. P. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical**. 2009. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina e Zootecnia, São Paulo, 2009.

ROUSSEL, J.D.; AUSTIN, C.R. Preservation of primate spermatozoa by freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.13, p. 333-335, 1967.

SAID, M.T.; AARTI GAGLANI, A.; AGARWAL, A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. **Reproductive BioMedicine Online**, v.21, p. 456– 462, 2010.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram sêmen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77–111, 2000.

SAMPAIO-NETO, J.C. et al. Utilization of ACP 105® extender in the refrigeration of stallion semen. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v.5, p.137-139, 2002.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L. G. et al. Live Rhesus Offspring by Artificial Insemination Using Fresh Sperm and Cryopreserved Sperm. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1092–

1097, 2000.

SANKAI, T. et al. In vitro Fertilization of Follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in Japanese Monkeys (*Macaca fuscata*). **Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 58-62, 1997.

SI, W. et al. Directional freezing as an alternative method for cryopreserving rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1431–1438, 2010.

SICHERLE, C.C. et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant Research**, v. 95, p.144–149, 2011.

SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 2, n. 1, p 5-18, 2004.

SILVA, J.S. JR. **Especiação em macacos-prego e caiararas, gênero *Cebus Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae)***. Rio de Janeiro (Brazil): Tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 377, 2001.

SILVA, J.S. JR. Taxonomy of capuchin monkey, *Cebus Erxleben, 1777*. **Neotropical Primates**, v. 10, p. 1-29, 2002.

SILVA, K.S.M. **Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de *Ateles (macaco-aranha) mantidos em cativeiro***. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, 2005.

SILVA, K.S.M. et al. Efeitos do trimetilaminoetano (TES) e ringer lactato em sêmen de macacos-aranha mantidos em cativeiro (*Ateles paniscus* e *A. marginatus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.3, p.934-937, 2013.

SILVA, M.A. et al. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. **Theriogenology**, v. 78, p.605–611, 2012.

SILVA, M.A. et al. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. **Theriogenology**, v.76, p.1084–1089, 2011.

SILVA, R.O.C et al. Treatment of goat sperm with catalase to improve postthaw quality. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, n.1, 151-151, 2010.

SILVA, S.V. et al. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.137, p.37– 44, 2013.

SILVA, T.F.P. et al. Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>.

STEDMAN, T.L. **Dicionário médico**. 27ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 2196p.

TAN, TC. Et al. Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. **Food Chemistry**, v.142, p.121–128, 2014.

TAYLOR, K. et al. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. **Reproductive BioMedicine Online**, v.18, n.2, p. 184-189, 2009.

TEIXEIRA, D.G. **Estudo anatômico descritivo dos órgãos genitais masculinos do macaco-prego (Cebus apella Linnaeus, 1758)**. São Paulo, 2005. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?. **CryoLetters**, v.23, p.255-262, 2002.

THUWANUT, P. et al. The effects of antioxidants on semen traits and in vitro fertilizing ability of sperm from the flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*). **Theriogenology**, v.76, p.115–125, 2011.

TONIOLLI, R. et al. Effect of indole-3-acetic (plant auxin) on the preservation at 15°C of boar semen for artificial insemination. **Reproduction Nutrition Development**, v.36, p.503–11, 1996.

TONIOLLI, R. **Conservação do sêmen suíno em água de coco**. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.8, p.138-142, 1989.

UCHOA, D.C. et al. Conservação do sêmen canino a 37 °C em diluentes à base de água de coco. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.91-95, 2002.

UCHOA, D.C; SILVA, TFP.; MOTA FILHO, AC; SILVA, L.D.M. Intravaginal artificial insemination in bitches using frozen/thawed semen after dilution in powdered coconut water (ACP-106c). **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n. 6, p.289–292, 2012.

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

VANDEVOORT, C.A. High Quality Sperm for nonhuman primate ART: production and assessment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 33, 2004.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine sêmen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.23-53, 2000.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.

WOLF, D.P. Artificial insemination and the assisted reproductive technologies in nonhuman primates. **Theriogenology**, v. 71, p. 123–129. 2009.

YAN, F.X et al. Interference-free determination of indole-3-acetic acid in two real systems using second order calibration method couple with excitation-emission matrix. **Analytical Sciences**, v.30, p. 489-494, 2014.

YANG, S. et al. The positive effects of seminal plasma during the freezing process on cryosurvival of sperm with poor freezability in Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*). **Journal Reproduction and Development**, v. 57 (6), p. 737-743, 2011.

YEOMAN, R. R. et al. Cryopreservation of spermatozoa from squirrel monkeys. **American Journal of Primatology**, v. 42, p. 157, 1997.

YONG, J.W.H. et al. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera l.*) water. **Molecules**, v. 14, p. 5144-5164, 2009.

ZALATA, A.A. et al. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p.313–318, 2004.

#### **4 EFFICACIOUS LONG-TERM COOLING AND FREEZING OF *Sapajus paella* SEMEN IN ACP-118®**

Artigo publicado na revista Animal Reproduction Science, doi:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.005>

(Formatação conforme normas da revista)

D.L. Leão<sup>a</sup>, S.A. Miranda<sup>a</sup>, A.B. Brito<sup>a</sup>, J.S. Lima<sup>a</sup>, R.R. Santos<sup>a,b</sup>, S.F.S. Domingues<sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Wild Animal Biology and Medicine, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil*

<sup>b</sup> *Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands*

<sup>c</sup> *Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pará, Castanhal, Pará, Brazil*

\* Corresponding author: Dr. Regiane Rodrigues dos Santos; E-mail:

R.Rodriguesdossantos@pq.cnpq.br; Faculty of Veterinary Medicine, Yalelaan 104,  
3584 CM, Utrecht, The Netherlands; Fax: +31 30 2534125



## **ABSTRACT**

The objectives of the present study were to test the effect of coconut water solution (CWS), TES–TRIS and ACP-118<sup>®</sup> on the seminal cooling and cryopreservation of semen from capuchin monkeys (*Sapajus apella*). Semen was collected from six males by electro-ejaculation, diluted in TES–TRIS, CWS or ACP-118<sup>®</sup>, and maintained at 4 °C for 28 hours. Semen was subsequently evaluated (Experiment I) or cryopreserved in the presence of different glycerol concentrations (3%, 5% or 7%) (Experiment II). ACP-118<sup>®</sup> was the preferred extender to preserve sperm motility and viability after 28 hours incubation at 4 °C. Cooled sperm were successfully frozen-thawed in a medium containing 3% glycerol. After thawing, sperm retained the capacity to fertilize oocytes and zygotes were obtained. In conclusion, ACP-118<sup>®</sup> can be effectively and efficiently used as extender for the cooling of *S. Apella* semen. Furthermore, cryopreservation using ACP-118<sup>®</sup> by adding 3% glycerol is suitable to maintain sperm morphology and the capacity of these cells to fertilize *in vitro*.

*Keywords:* Coconut; TES-TRIS; glycerol; capuchin monkey

## 1. Introduction

Handling and preservation of semen from the Neotropical Non-Human Primate (NHP) *Sapajus apella* is challenging due to characteristics of the coagulated ejaculated semen that is collected (Oliveira et al., 2011). The seminal coagulum does not liquefy spontaneously for harvesting sperm, but only under mechanical or enzymatic fragmentation (Nagle and Denari, 1983; Oliveira et al., 2011). Hence, success with use of the freezing protocol developed for this species depends on the use of extenders that are able to promote seminal coagulum liquefaction without impairing sperm viability.

Most extenders used for NHP semen are based on TES-TRIS buffers (Si et al., 2000; Li et al., 2004; 2005a; Dong et al., 2009a,b; Oliveira et al., 2011; Yang et al., 2011). Extenders based on coconut water solution (CWS) (Oliveira et al., 2011), or purified and lyophilized coconut water (ACP-118<sup>®</sup>; Lima et al., 2013) have been successfully applied to *S. apella*. From both solutions, ACP-118<sup>®</sup> appeared to be the more desirable solution for harvesting viable sperm from seminal coagulum (Lima et al., 2013) as a candidate extender for chilling and freezing procedures.

Extender influences sperm quality during cooling, being one of the important factors for retention of the capacity of the sperm cell to fertilize an oocyte (Dong et al., 2009b). Information on NHP semen quality after chilling using extenders, however, is scarce and limited to a few studies with *Macaca mulatta* (Dong et al., 2008; Si et al., 2010), *S. apella* (Lima et al., 2013) and *Saimiri collinsi* (Oliveira et al., 2015). Prior to freezing, cryoprotectant exposure is apparently another important factor affecting sperm survival. Glycerol is commonly used as an intracellular cryoprotectant at concentrations varying from 2.5% (Kusunoki et al. 2001; Li et al., 2005a; Oliveira et al., 2011) to 15% (Li et al., 2005b). In a previous study, 2.5% and 3.5% glycerol was applied to the extenders CWS and TES-TRIS, respectively, to cryopreserve *S. apella* semen. Sperm

cell motility, however, was not recovered after thawing (Oliveira et al., 2011), probably due to an insufficient permeation of glycerol into the cells.

The aim in the present study was to determine which extender is most desirable for liquefying semen coagulum and maintaining seminal quality by comparing TES-TRIS, CWS and ACP-118<sup>®</sup> during chilling, as well as to establish the optimal glycerol concentration (3%, 5% or 7%) to be added to the extenders for semen freezing after the cooling process.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals*

All experimental protocols were approved by the Ethical Committee in Animal Research (n°. 013/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS) and by the System of Authorization and Information in Biodiversity (SISBIO/ICMBio/MMA n°. 34009-2). All procedures were performed under the supervision of a veterinarian. Six healthy, sexually mature male *S. apella*, ~ 10 years old, provided by the National Primate Centre (CENP), were used for collecting semen. Length, width, height, circumference, and volume of both testes were measured.

The animals were individually housed in cages of 90 cm × 80 cm × 80 cm (length, width and height, respectively), under natural photoperiod (i.e., under 12 h of light and 12 h of dark) at CENP, Ananindeua, Brazil (1°22'57"S, 48°22'52"W). The climate is humid and tropical, with an average annual temperature of 28 °C. The diet consisted of fresh fruits, vegetables, commercial pellet chow specific for neotropical non-human primates (Megazoo<sup>®</sup> P18, 18% protein, 6.5% fibre, Brazil) and drinking water was available *ad libitum*. To avoid stress effects of the anaesthesia, animals were previously conditioned for 2 months as described by Oliveira et al. (2011).

## *2.2. Semen collection and analyses*

Semen was collected under hygienic conditions at the same period of the day (i.e., in the morning before feeding) and after anaesthesia with ketamine hydrochloride (12 mg/kg; IM; Dopalen 10%, Vetbrands, Paulina, Brazil) and xylazine hydrochloride (1 mg/kg; IM; Anasedan 2%, Vetbrands). Animals were stimulated with a modified rectal electro-ejaculation (EEJ) procedure described by Oliveira et al. (2011). In brief, an EEJ (Autojac-Neovet, Uberaba, Brazil) rectal probe (9 mm diameter and 15 cm long) was introduced in the rectum (~5 cm deep), and electrical stimuli were delivered. A stimulation session consisted of three series, composed of 35 electrical stimuli (10 –100 mA; 1 – 12 V) within an interval of 30 s before the next series. The intervals between semen collections were 20 days. Ejaculates were collected into a micro centrifuge tube (1.5 mL). Seminal volume, colour and viscosity were immediately evaluated. Sperm motility, vigour, and morphology were evaluated after seminal liquefaction as previously described (Oliveira et al., 2011). Sperm morphology and plasma membrane integrity were evaluated by a smear prepared adding 5 µL eosin 1% (Vetec) and 5 µL nigrosine 1% (Vetec) to 5 µL of semen on a pre-warmed (37 °C) glass slide. Morphologic defects detected in the sperm were classified as primary or secondary. Sperm concentration was recorded in a Neubauer chamber. All evaluations were performed under a light microscope (Nikon E400, Japan) at a magnification of 100 ×. Only animals where sperm have 60% or greater motility, a vigour rating of 4, and a maximum of 5% to 10% primary defects as well as 10% to 20% secondary defects were used in the experiment.

### 2.3. Extenders

Three extenders were tested for Experiment I: TES–TRIS (Morrell, 1998), *in natura* CWS (Oliveira et al., 2011) and ACP-118® (Lima et al., 2013). Each extender consisted of two fractions (A and B), as detailed in Table 1.

### 2.4. Semen liquefaction and dilution

Semen coagulum from each animal was divided into three aliquots of similar size with a sterile bistouri blade (Suzhou Kyuan Medical Ltd, China) under a light microscope. Each aliquot was diluted (1:1) as Fraction A in the tested extenders (TES-TRIS, CWS or ACP-118®) and maintained at 37 °C in a water-bath. Subsequently, the seminal coagulum in each extender was mechanically dissociated by repeated pipetting (Oliveira et al., 2011).

### 2.5. Experimental design

This study comprised two experiments. In Experiment I, extenders (TES-TRIS; coconut water solution – CWS; and purified and lyophilized coconut water - ACP-118®) were tested as to capacity to maintain sperm viability during cooling. In Experiment II, semen was frozen using the most desirable extender that was ascertained in Experiment I and different concentrations (3%, 5% or 7%) of glycerol were used.

#### 2.5.1. Experiment I: Semen cooling

After partial coagulum liquefaction in Fraction A of each extender, an aliquot of the fresh semen was immediately evaluated (motility, vigour and plasma membrane integrity) and the aliquot was submitted to a second dilution using Fraction B with each respective extender at a ratio of 1:1. Thereafter, samples were drawn into 0.25 mL

plastic straws (IMV Technologies, L'Aigle, France), sealed with metal beads and cooled down from 36 °C to 4 °C in 90 min (- 0.4 °C/min), and stored horizontally at 4 °C for 28 hours. The straws were subsequently warmed for 30 seconds at 37 °C and semen was evaluated for sperm motility, vigour, plasma membrane integrity and morphology.

### *2.5.2. Experiment II: Semen cryopreservation*

Each sample was cooled utilizing the most optimal extender ascertained when conducting Experiment I and samples were subsequently divided equally into three aliquots. An equal volume of pre-cooled (4 °C) corresponding extender (Fraction B) containing glycerol at three different concentrations (3%, 5% or 7%) was added stepwise (three times) at intervals of 10 min within 30 min. During the last 10 min of equilibration, the sperm were drawn into 0.25-ml plastic straws and sealed with metal beads. Straws were then placed horizontally on a rack 10 cm above the surface of liquid nitrogen and frozen. After 20 minutes, straws were submerged directly into liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) for at least 1 week of storage. Subsequently, straws containing frozen sperm were put in a 37 °C water bath for 30 seconds to thaw and submitted for sperm analysis.

### *2.6. Sperm motility and vitality recovery rate*

Analysis of sperm motility recovery rate and vitality maintenance rate using different extenders during cooling were evaluated, and the use of different glycerol concentrations in the freezing was estimated by Motility Recovery Rate (MRR) and Vitality Maintenance Rate (VMR). MRR is the percentage of recovered motility after cooling or freezing compared to the motility immediately after liquefaction (Li et

al., 2006). VMR is the ratio of integrity of plasma membrane after cooling or freezing when compared to control (fresh sperm).

### 2.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences in sperm motility, morphology, plasma membrane integrity, motility recovery rate and vitality maintenance rate were compared between treatments using Student's t-test, while vigour was compared with Kruskal-Wallis. The effect of the extenders and glycerol concentration on the percentage of plasma membrane integrity, sperm motility and vigour was evaluated with one-way ANOVA, and differences were located with a Fisher's protected least significant difference (LSD) *post hoc* test. A  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## 3. Results

### 3.1 Sperm quality is not affected by semen electro-ejaculation collection

Testicular width, height, length and volume averaged  $1.6 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ ,  $1.6 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ ,  $2.5 \text{ cm} \pm 0.7 \text{ cm}$ , and  $3.4 \text{ cm}^3 \pm 0.4 \text{ cm}^3$ , respectively, without significant differences between the left and right testis. Semen collection was successful in 23 of 34 attempts (67%), from which 14 samples were used in Experiment I ( $2 \pm 0.6$  collection/animal) and nine samples in Experiment II ( $2 \pm 0.3$  collection/animal) (Table 2). Penile erection began in the first series of electrical stimuli, and ejaculation often occurred in the second series (50%) (i.e., 13 min after electro-ejaculation started) and 30% and 20% of the ejaculates were recovered during first and third series, respectively. Collection sessions lasted, on average, 30 min. Before liquefaction, semen was a whitish and gelatinous coagulum. The collected volume was  $0.6 \pm 0.1 \text{ mL}$ . Seminal

coagulum liquefied within  $2 \pm 1$  h in all tested extenders. Complete liquefaction was not achieved and some remaining micro coagula were observed in the samples, but without interfere on the semen cooling or freezing-thawing. Sperm concentration during liquefaction averaged  $1199 \pm 608 \times 10^6$  sperm/mL.

### *3.2. Cooling negatively affects sperm motility and vigour*

Immediately after liquefaction, sperm motility and vigour were preserved to a greater extent ( $P < 0.05$ ) in ACP-118<sup>®</sup> than in TES-TRIS. When compared to fresh samples, cooling negatively affected sperm motility and vigour, whereas plasma membrane integrity was not affected independently by the extender. Sperm cooled in the presence of ACP-118<sup>®</sup> had a greater ( $P < 0.05$ ) percentage motility, plasma membrane integrity and motility maintenance rate when compared to use of TES-TRIS and CWS. Motility was greater ( $P < 0.05$ ) in the samples cooled in TES-TRIS than in those cooled in CWS. There was no difference when using ACP-118<sup>®</sup>, TES-TRIS and CWS for sperm cell vitality maintenance rate (Table 3). Three males had the greatest sperm quality after cooling and were then selected for use in Experiment II using ACP-118<sup>®</sup> as extender.

### *3.2. Cooling without cryoprotectant followed by freezing in ACP-118<sup>®</sup> added by 3% glycerol improves sperm motility*

Cryopreservation impaired sperm motility and plasma membrane integrity, but vigour and the percentages of morphologically normal sperm were unaffected. After freezing-thawing, the sperm motility and motility maintenance were greater ( $P < 0.05$ ) when 3% or 5% GLY was added to the extender (ACP-118<sup>®</sup>), while the greatest percentages of plasma membrane integrity were observed when sperm were frozen in



the presence of 3% GLY. All the other variables were not influenced by the GLY concentration (Table 4). Morphological abnormalities were decreased after cryopreservation independent of GLY concentration (Table 5).

#### 4. Discussion

This was the first successful attempt to obtain motile sperm after cryopreservation of semen from *S. apella*. Furthermore, frozen-thawed sperm retained the capacity to fertilize oocytes *in vitro*, resulting in the production of zygotes. Although no embryo development was observed, information regarding the importance of extender and cryoprotectant concentration in maintaining sperm viability was an important outcome of the present study.

*S. apella* seminal coagulum dissolution can be performed with simple solutions such as 0.9% saline (Nagle and Denari, 1983), or with the extenders TES-TRIS and CWS (Oliveira et al., 2011). However, after removal from the seminal plug, sperm are frequently immotile or have poor motility. In the present study, use of ACP-118® was effective in improving the rates of sperm motility and vigour when compared with TES-TRIS and CWS with use of CWS being more effective than TES-TRIS. This is probably due the medium composition. TES-TRIS contains less buffers and fructose than CWS and ACP-118® which are rich in membrane stabilizers (Tan et al., 2014) such as potassium, sodium, calcium, magnesium, glucose and sucrose (Hincha et al., 2006; Yan et al., 2014). Semen dilution results in a decreased concentration of natural antioxidants present in the seminal plasma which results in a redox system imbalance, stress, and subsequent impairment of sperm motility, viability and capacity for fertilization (Agarwal et al., 2006; De Lamirande and O'Flaherty, 2008). Hence, presence of vitamin C in CWS and ACP-118® might support the preservation of sperm quality. ACP-118®

is produced by spray drying and stored as a powder, being more stable than CWS, explaining the results of the present study.

Usually, cooling of NHP sperm is performed prior to freezing where specimens are maintained under refrigeration at 4 °C for approximately 2 hours (Li et al., 2005b; Dong et al., 2008; Si et al., 2010). In the present study, ACP-118<sup>®</sup> appeared to be the preferred extender for preservation of sperm motility, vigour and membrane integrity after cooling at 4 °C for 28 hours. The cooled semen alternative used in the present study could be valuable for use in species with poor success rates of fertilization after semen cryopreservation as well as for facilitating semen transport and handling in the field.

Regarding cryopreservation, concentration of the cryoprotectant and the time of its exposure affect the survival rates of sperm. In a previous study, exposure to glycerol before cooling resulted in decreased sperm viability (Oliveira et al., 2011). In the present study, glycerol was added after cooling with improved rates of sperm survival. There were similar results when glycerol was used for semen storage in dogs (Uchoa et al., 2012), collared peccary (Silva et al., 2012) and old-world NHP (Li et al., 2005ab, 2006; Si et al., 2010). Decreasing the exposure time to glycerol during cooling protects the sperm cells from osmotic shock, toxicity of glycerol and plasma membrane damage (Buhr et al., 2001). It is important to note that individual variations were observed not only regarding semen quality after collection but also on the freezing capacity in the present study. Similar results were described by Leibo et al. (2007) when studying the cryopreservation of rhesus monkey semen. When frozen-thawed semen was compared with fresh semen, there were no differences for the percentages of morphologically normal sperm. It is suggested, based on the present and previous findings, that

morphological analysis alone is not a reliable procedure to evaluate cryopreservation efficacy and results from such studies can be misleading.

All glycerol concentrations used in the present study preserved sperm motility after thawing, but 3% glycerol appeared as the most efficient. Results of Oliveira et al. (2011) were not consistent with this finding when freezing *S. apella* semen with 2.5% to 3.5% glycerol. These previous results might be related to the types of extenders used (i.e., CWS and TES-TRIS) showing that cryoprotectant and extender interaction is important during semen preservation.

## **5. Conclusion**

The extender ACP-118® is suitable for the maintenance of sperm motility and viability after cooling, as well as after freezing when combined with 3% glycerol.

## **Acknowledgements**

The authors thank CENP for the logistical support. D.L. Leão was supported by CNPq, Brazil.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that there is no potential conflict of interest that can be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

## **References**

Agarwal, A., Said, T.M., Bedaiwy, M.A., Banerjee, J., Alvarez, J.G., 2006. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil. Steril.* 86, 503-512.

- Buhr, M.M., Fiser, P., Bailey, J.L., Curtis, E.F., 2001. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J. Androl.* 22, 961-969.
- De Lamirande, E., O'Flaherty, C., 2008. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784, 106-115.
- Dong, Q., Rodenburg, S.E., Huang, C., Vandervoort, C.A., 2008. Effect of pre-freezing conditions on semen cryopreservation in rhesus monkeys. *Theriogenology* 70, 61-69.
- Dong, Q., Correa, L.M., Vandervoort, C.A., 2009a. Rhesus monkey sperm cryopreservation with TEST-yolk extender in the absence of permeable cryoprotectant. *Cryobiology* 58, 20-27.
- Dong, Q., Hilla, D., Vandervoort, C.A., 2009b. Interactions among pre-cooling, cryoprotectant, cooling, and thawing for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Cryobiology* 59, 268-274.
- Hincha, D.K., Popova, A.V., Cacela, C., 2006. Effects of sugars on the stability and structure of lipid membranes during drying, in: Leitmannova, A., (Eds.), *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Academic Press, pp. 189-127.
- Kusunoki, H., Daimaru, H., Minami, S., Nishimoto, S., Yamane, K., Fukumoto, Y., 2001. Birth of a chimpanzee (*Pan troglodytes*) after artificial insemination with cryopreserved epididymal spermatozoa collected postmortem. *Zoo Biol.* 20, 135-143.
- Leibo, S.P., Kubisch, H.M., Schramm, R.D., Harrison, R.M., VandeVoort, C.A., 2007. Male-to-male differences in post-thaw motility of rhesus spermatozoa after cryopreservation of replicate ejaculates. *J. Med. Primatol.* 36, 151-163.

- Li, X., Dayong, G., Weizhi, J.I., 2004. Cryopreservation of sperm of an endangered species-assamese macaque. *Cell Preserv. Technol.* 2, 29-33.
- Li, Y., Cai, K., Kovacs, A., Ji, W., 2005a. Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *J. Androl.* 26, 387-395.
- Li, Y., Cai, K., Su, L., Guan, M., He, X., Wang, H., Kovacs, A., Ji, W., 2005b. Cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa in a chemically defined extender. *Asian J. Androl.* 7, 139-144.
- Li, Y., Cai, K., Li, J., Dinnyes, A.; Ji, W., 2006. Comparative studies with six extenders for sperm cryopreservation in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) and rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Am. J. Primatol.* 68, 39-49.
- Lima, J.S., Leão, D.L., Sampaio, R.V., Brito, A.B., Santos, R.R., Miranda, S.M., Ohashi, O.M., Domingues, S.F.S., 2013. Embryo production by parthenogenetic activation and fertilization of *in vitro* matured oocytes from *Cebus apella*. *Zygote.* 21, 162-166.
- Morrell, J.M., Hodges, J.K., 1998. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. *Anim. Reprod. Sci.* 53, 43-63.
- Nagle, C.A., Denari, J.H., 1983. The cebus monkey (*Cebus apella*). In: Hearn, J.P. (Ed.), *Reproduction of New World Primates*. Lancaster, pp. 281–304.
- Oliveira, K.G., Miranda, S.A., Leão, D.L., Brito, A.B., Santos, R.R., Domingues, S.F.S., 2011. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES–TRIS. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 75-80.

- Oliveira, K.G., Leão, D.L., Almeida, D.V.C, Santos, R.R., Domingues, S.F.S., 2015. Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey, *Saimiri collinsi*. *Theriogenology*, *in press*.
- Si, W., Zheng, P., Tang, X., He, X., Wang, H., Bavister, B.D., Ji, W., 2000. Cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa and their functional assessment by *in vitro* fertilization. *Cryobiology* 41, 232-240.
- Si, W., Lua, Y., Hea, X., Jia, S., Niua, Y., Tana, T., Ji, W., 2010. Directional freezing as an alternative method for cryopreserving rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm. *Theriogenology* 74, 1431-1438.
- Silva, M.A., Peixoto, G.C.X., Lima, G.L., Bezerra, J.A.B., Campos, L.B., Paiva, A.L.C., Paula, V.V., Silva, A.R., 2012. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology* 78, 605-611.
- Tan, T.C., Cheng, L.H., Bhat, R., Rusul, G., Easa, A.M., 2014. Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. *Food Chem.* 142, 121-128.
- Uchoa, D.C., Silva, T.F.P., Mota Filho, A.C., Silva, L.D.M., 2012. Intravaginal artificial insemination in bitches using frozen/thawed semen after dilution in powdered coconut water (ACP-106c). *Reprod. Domest. Anim.* 47, 289-292.
- Yan, F.X., Wu, H.L., Quing, X.D., Sun, Y.M., Yu, R.Q., 2014. Interference-free determination of indole-3-acetic acid in two real systems using second order calibration method couple with excitation-emission matrix. *Anal. Sci.* 30, 489-494.

Yang, S., Ping, S., Ji, S., Lu, Y., Niu, Y., Wang, H., Ji, W., Si, W., 2011. The positive effects of seminal plasma during the freezing process on cryosurvival of sperm with poor freezability in rhesus macaque (*Macaca mulatta*). J. Reprod. Develop. 57, 737-743.

**Table 1**

Composition, osmolarity and pH of fractions A and B from extenders

Fraction	Composition	Amount	Osmolarity	pH
Fraction A				
	<i>TES-TRIS</i>			
	TES	4.90 g		
	TRIS	1.06 g		
	Ultrapure water	100 mL		
	D-Fructose	0.20 g		
	Streptomycin	0.20 g		
	Penicillin	0.10 g	327 mOsm	7.2
	<i>CWS</i>			
	<i>In natura</i> coconut water	50 mL		
	Ultrapure water	25 mL		
	Citrate solution 5%	25 mL		
	Streptomycin	0.20 g		
	Penicillin	0.10 g	294 mOsm	6.5
	<i>ACP-118®</i>			
	ACP-118®	5.84 g		
	Ultrapure water	50 mL		
	Streptomycin	0.20 g		
	Penicillin	0.10 g	300 mOsm	6.5
Fraction B				
	<i>TES-TRIS</i>			
	Fraction A	30 mL		
	Skim milk solution 11%	30 mL		
	Egg yolk	40 mL	520-540 mOsm	7.0
	<i>CWS</i>			
	Fraction A	60 mL		
	Egg yolk	40 mL	580-590 mOsm	6.5
	<i>ACP-118®</i>			
	Fraction A	60 mL		
	Egg yolk	40 mL	580-590 mOsm	6.5



**Table 2**

Data on semen collection by electroejaculation and the distribution (number of samples per animal) in Experiments I and II

Animals	Semen collection			
	Attempts	Ejaculate	Cooled semen	Frozen semen
1	9	8 (89%)	5 (63%)	3 (37%)
2	5	3 (60%)	3 (100%)	0 (0%)
3	5	4 (80%)	2 (50%)	2 (50%)
4	4	3 (75%)	2 (67%)	1 (33%)
5	5	3 (60%)	1 (33%)	2 (67%)
6	6	2 (33%)	1 (50%)	1 (50%)
Total	34	23 (67%)	14 (67%)	9 (33%)

**Table 3**

Mean values ( $\pm$  SEM) of motility, vigour, plasma membrane integrity (PMI), motility (MMR) and vitality (VMR) maintenance rates before and after 28h of *S. apella* semen cooling using TES-TRIS, CWS or ACP-118® as extenders

	Extender	Motility (%)	Vigour	PMI (%)	MRR (%)	VMR (%)
Fresh	<i>TES-TRIS</i>	50 $\pm$ 4 <sup>aB</sup>	3 <sup>aB</sup>	76 $\pm$ 6 <sup>aA</sup>	-	-
	<i>CWS</i>	12 $\pm$ 5 <sup>aC</sup>	0 <sup>aC</sup>	29 $\pm$ 9 <sup>aB</sup>	-	-
	<i>ACP-118®</i>	83 $\pm$ 2 <sup>aA</sup>	5 <sup>aA</sup>	80 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	-	-
Cooled	<i>TES-TRIS</i>	24 $\pm$ 6 <sup>bB</sup>	0 <sup>bB</sup>	43 $\pm$ 6 <sup>aAB</sup>	12 $\pm$ 8 <sup>B</sup>	64 $\pm$ 24 <sup>A</sup>
	<i>CWS</i>	0 <sup>bC</sup>	0 <sup>bB</sup>	25 $\pm$ 7 <sup>aB</sup>	2 $\pm$ 2 <sup>B</sup>	85 $\pm$ 18 <sup>A</sup>
	<i>ACP-118®</i>	49 $\pm$ 5 <sup>bA</sup>	3 <sup>bA</sup>	50 $\pm$ 11 <sup>aA</sup>	42 $\pm$ 11 <sup>A</sup>	70 $\pm$ 5 <sup>A</sup>

<sup>a-b</sup>Different lower-case letters indicate differences between means compared before and after cooling within the same extender ( $P < 0.05$ )

<sup>A-C</sup>Different upper-case letters indicate differences between means comparing extenders within the same group (fresh or cooled) ( $P < 0.05$ )

**Table 4**

Mean values ( $\pm$  SEM) of motility, vigour, plasma membrane integrity (PMI), normal sperm, motility (MMR) and vitality (VMR) maintenance before and after freezing

ACP-118®	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Mean
Control*				
Motility	67 $\pm$ 9	95	80 $\pm$ 0	80.6 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
Vigour	3	5	4-3	3 <sup>a</sup>
PMI (%)	72 $\pm$ 7	60	79 $\pm$ 1	70.3 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>
Normal sperm (%)	60 $\pm$ 5	94	91 $\pm$ 4.5	81.7 $\pm$ 10.9 <sup>a</sup>
MRR (%)	-	-	-	-
VMR (%)	-	-	-	-
+ 3% GLY				
Motility	37 $\pm$ 9	50	15 $\pm$ 15	34.0 $\pm$ 10.2 <sup>b</sup>
Vigour	4	4	4.0	4 <sup>a</sup>
PMI (%)	52 $\pm$ 14	10	51 $\pm$ 18	37.7 $\pm$ 13.8 <sup>ab</sup>
Normal sperm (%)	95 $\pm$ 3.5	99	82 $\pm$ 11	92.2 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>
MRR (%)	59 $\pm$ 17	53	18 $\pm$ 18	43.3 $\pm$ 12.8 <sup>A</sup>
VMR (%)	70 $\pm$ 16	17	45 $\pm$ 45	44.0 $\pm$ 15.3 <sup>A</sup>
+ 5% GLY				
Motility	25 $\pm$ 8.7	60	5 $\pm$ 5	30.0 $\pm$ 16.1 <sup>b</sup>
Vigour	4	4	3.0	4 <sup>a</sup>
PMI (%)	46 $\pm$ 16	10	28 $\pm$ 28	28.0 $\pm$ 10.4 <sup>b</sup>
Normal sperm (%)	94 $\pm$ 3	100	95 $\pm$ 5	96.3 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>
MRR (%)	40 $\pm$ 14	63	6 $\pm$ 6	36.3 $\pm$ 16.6 <sup>A</sup>
VMR (%)	63 $\pm$ 20	17	36 $\pm$ 36	38.7 $\pm$ 13.3 <sup>A</sup>
+ 7% GLY				
Motility	10 $\pm$ 2.9	0	0	3.3 $\pm$ 3.3 <sup>c</sup>
Vigour	4	0	0	3 <sup>a</sup>
PMI (%)	42 $\pm$ 16.2	2	27 $\pm$ 27	23.7 $\pm$ 11.7 <sup>b</sup>
Normal sperm (%)	96 $\pm$ 3	100	92.5 $\pm$ 7.5	96 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
MRR (%)	17 $\pm$ 7	0	3 $\pm$ 3	6.7 $\pm$ 5.3 <sup>B</sup>
VMR (%)	57 $\pm$ 21	3	35 $\pm$ 35	31.7 $\pm$ 15.7 <sup>A</sup>

\*Immediately after dissolution of seminal coagulum; Animal 1 (3 ejaculates); Animal 2 (1 ejaculate); Animal 3 (2 ejaculates); <sup>a-c</sup> Different lower-case letters indicate significant differences between control and treatments within the same column ( $P < 0.05$ ); <sup>A,B</sup> Different upper-case letters indicate significant differences among treatments when comparing MMR or VMR ( $P < 0.05$ ).

**Table 5**

Morphological analysis of primary and secondary abnormalities in the *Sapajus apella* sperm before (control) and after cryopreservation (3%, 5% and 7% glycerol in ACP-118®); Mean percentages ( $\pm$  SEM) of sperm with normal morphology or primary and secondary abnormalities

ACP-118®	Primary abnormalities		Secondary abnormalities	
	Strongly coiled tail	Bent tail	Coiled tail	
Control*	$9 \pm 2^a$	$11 \pm 5^a$	$7 \pm 2^a$	
+ 3% GLY	$4 \pm 2^b$	$0^b$	$1 \pm 0^b$	
+ 5% GLY	$3 \pm 1^b$	$0^b$	$2 \pm 1^b$	
+ 7% GLY	$4 \pm 2^b$	$0^b$	$2 \pm 1^b$	

\* Immediately after dissolution of seminal coagulum

<sup>a,b</sup>Different lower-case letters indicate significant differences between means within the same column ( $P < 0.05$ )

**5 EXTENDER SUPPLEMENTATION WITH CATALASE MAINTAINS THE INTEGRITY OF SPERM PLASMA MEMBRANE AFTER FREEZING-THAWING OF SEMEN FROM CAPUCHIN MONKEY**

Danuza L. Leão, Adriel B. Brito, Stefania A. Miranda, Karol G. Oliveira,  
Debora V. C. Almeida, Regiane R. Santos and Sheyla F. S. Domingues

Artigo submetido na revista *Zygote*

(Formatação conforme normas da revista)

<sup>a</sup> Laboratory of Wild Animal Biology and Medicine, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

<sup>b</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

<sup>c</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pará, Castanhal, Pará, Brazil

\*Correspondence to Regiane R Santos

Federal University of Pará, Laboratory of Wild Animal Biology and Medicine

BR 316 Km 61, CEP 68740-970, Castanhal, Pará, Brazil.

Email: R.Rodriguesdossantos@pq.cnpq.br

## Summary

We aimed to evaluate the effect supplementation of ACP-118<sup>®</sup> extender with the antioxidant catalase (10 and 50 µg/ml) on *Sapajus apella* sperm motility, vigor, and plasma membrane integrity during the process of seminal liquefaction, cooling, and freezing. Catalase did not affect none of the evaluated parameters after semen dilution or cooling. However, cryopreserve sperm in the presence of 50 µg/ml catalase, presented plasma membrane integrity similar to fresh sperm.

**Keywords:** antioxidant, monkey, semen, cell membrane

## Introduction

*Sapajus apella* presents a high degree of seminal coagulation, which does not liquefy spontaneously after ejaculation (Dixon and Anderson, 2002). Hence, sperm from *S. apella* suffer stress during coagulum liquefaction, followed by the stress caused by the freezing process (Oliveira *et al.*, 2011; Leão *et al.*, 2015). Although seminal freezing has been described in *S. apella* using TES-TRIS and coconut-derivate extenders, sperm parameters such as motility and vigor decrease significantly after seminal coagulum liquefaction, cooling, freezing, and thawing, sometimes being almost null (Oliveira *et al.*, 2011; Leão *et al.*, 2015). Similar effects were observed in other species of neotropical primates as *Saimiri collinsi* (Oliveira *et al.*, 2015, Oliveira *et al.*, 2016ab), *S. vanzolinii*, *S. cassiquiarensis* and *S. macrodon* (Oliveira *et al.*, 2016ab). It is known that the use of extenders will dilute the concentration of natural antioxidants present in the seminal plasma (Agarwal *et al.*, 2006), and cryopreservation leads to an increased production of reactive oxygen species (ROS) (Aitken and Baker, 2006). Consequently, a redox system imbalance causes impairment of sperm capacity to fertilize due the injury in the plasma membrane (Taylor *et al.*, 2009), and decrease in

sperm motility (Kefer *et al.*, 2009). Catalase is an antioxidant present in seminal plasma and plays a role in counteracting oxidative stress (Mora-Esteves and Shin, 2013). The beneficial effect of catalase on sperm viability and motility has been reported for human (Moubasher *et al.*, 2013). In non-human primates the use of catalase was investigated in rhesus macaque *Macaca mulatta* (Dong *et al.*, 2009; McCarthy and Meyer, 2011), being able to decrease lipid peroxidation (McCarthy and Meyer, 2011), and to improve post-thaw sperm motility (Dong *et al.*, 2009). Our aim was to evaluate semen extender supplementation with catalase at two different concentrations (10 and 50 µg/ml) on the sperm morphology, motility, vigor, and plasma membrane integrity during the processes of seminal liquefaction, cooling, and freezing-thawing.

## **Materials and Methods**

This study was approved by the Ethical Committee in Animal Research (n°. 013/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS) and by the System of Authorization and Information in Biodiversity (SISBIO/ICMBio/MMA n°. 34009-3). Six *S. apella* males were provided by the National Primate Centre (Ananindeua, Brazil). Length, width, height, circumference and volume of both testes were measured. Animals were stimulated with a rectal electro-ejaculation (EEJ) procedure (Oliveira *et al.*, 2011). Two extenders were prepared, representing A and B fractions. The A-fraction-A extender was used for the liquefaction of the seminal coagulum and consisted of 5.84 g ACP 118® (ACP Biotecnologia®, Fortaleza, Ceará, Brazil) diluted in 50 ml of ultrapure water. B-Fraction was used for freezing and was composed by 60% A-fraction, with a final concentration of 20% egg yolk, and 3% glycerol (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA). Both A and B-fractions were either or not supplemented with the antioxidant enzyme catalase (Sigma), as follow: i) fractions A and B without catalase (control), ii) fractions A and B with 10 µg/ml catalase, or iii) fractions A and B with 50

$\mu\text{g/ml}$  catalase. Both concentrations were reached after semen dilution in the extenders. After collection, semen coagulum was divided into three equal parts, each one was diluted (1:1) in the fraction A of the tested treatments (Control, or 10  $\mu\text{g/ml}$  or 50  $\mu\text{g/ml}$  catalase) and maintained at 37 °C in a water-bath. Seminal coagulum in each extender was mechanically dissociated (Oliveira *et al.* 2011) until a volume > 100  $\mu\text{l}$  of liquid fraction was obtained. Samples were cooled down from 37 °C to 4 °C within 90 min (-0.4 °C/min). An equal volume of precooled (4 °C) corresponding to B fraction from each treatment was added in three steps interspersed with 10 min. The spermatozoa were drawn into 0.12 ml plastic straw (IMV, L'Aigle, France) and sealed with metal beads. Straws were placed horizontally on a rack 10 cm above the surface of liquid nitrogen. Twenty minutes later, they were submerged directly into liquid nitrogen for one-week storage. For thawing, straws were kept in a water bath (37 °C) for 30 seconds, and thawed semen was microscopically evaluated. Samples were evaluated for sperm motility, vigor, plasma membrane integrity, and morphology. All evaluations were performed under a light microscope (Nikon, Tokyo, Japan), at a magnification  $\times 100$ . Sperm vigor was evaluated on a scale of 0 to 5 (Oliveira *et al.*, 2011). Sperm motility was expressed as the percentage of cells actively moving in a forward direction (Dong *et al.*, 2008). Sperm plasma membrane integrity and morphology, including morphologic defects, were evaluated as previously described (Oliveira *et al.* 2011). Sperm motility, plasma membrane integrity and morphology were compared with ANOVA and vigor was compared with Kruskal-Wallis test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. To avoid that one animal could influence the results more than others, in case more ejaculates were obtained from a same animal, the mean value was used for the statistical analysis as an unit, and not all the values from a single animal.



## Results

All the males (n=6) used in this study were healthy during the experiments and presented symmetric testes with normal consistency and mobility. Mean ( $\pm$ SD) body weight was  $3.915 \pm 3$  kg. Testicular biometry is presented in Supplementary [Table 1](#). A total of 26 semen collection trials (at least two attempts in each of the 6 males) were performed resulting in seven ejaculates from four males (Table 1). Before liquefaction, the seminal coagulum presented a yellowish colour and was opaque. Mean ( $\pm$ SD) collected volume of coagulated semen was  $410 \pm 129$   $\mu$ L (250-600  $\mu$ L; min–max). After liquefaction some seminal micro-clots were still present, but without interfering on the semen manipulation and cooling or freezing procedures. No significant effect of liquefaction or cooling on the evaluated semen parameters was observed (Table 2). However, freezing-thawing led to a significant decrease in the sperm motility and vigor, as well as impaired plasma membrane integrity. Exposure to catalase during dilution and cooling did not improve sperm motility, or plasma membrane integrity. Similar results were observed when sperm motility and vigor were evaluated after freezing-thawing. However, cryopreservation solution supplementation with 50  $\mu$ g/ml catalase maintained plasma membrane integrity similar to fresh sperm (Table 2). Liquefaction, cooling, and freezing-thawing did not affect sperm morphology, independently on the extender supplementation with catalase (Table 3).

## Discussion

The limited capacity of storing antioxidant enzymes due to small cytoplasm, combined with a rich membrane with unsaturated fatty acids makes sperm susceptible to oxidative stress and to lipid peroxidation (Aitken and Baker, 2006; Agarwal *et al.*, 2014). Thus, supplementation of the extender with antioxidant has been reported as an

alternative to protect the sperm against ROS during semen cryopreservation. Usually the targets are the plasma membrane integrity and sperm motility (Aitken and Baker, 2006; Moubasher *et al.*, 2013). Catalase was efficient to maintain sperm motility after the cryopreservation process. Differently from our findings, the use of catalase (200 IU/ml) was associated with an improved human sperm viability, increase in percentage of progressive motility, as well as decrease in DNA damage, when compared with ejaculates cryopreserved without catalase (Moubasher *et al.*, 2013). In this study, all treatments had partially recovered post-thaw sperm motility in *S. apella*, differently from the data reported by Oliveira *et al.* (2011) who described absence of motility after cryopreservation in TEST and *in natura* coconut water extender. These results may have been due the extenders used by Oliveira *et al.* (2011), as well as the cryopreservation protocol performed within 4.8 hours, while in the present study all handling took 3.4 hours, a factor that influence ROS production (Kothari *et al.*, 2010). Considering that supplementation with catalase was effective in maintaining the plasma membrane integrity in frozen-thawed sperm, this antioxidant may have minimized the effects of lipid peroxidation on *S. apella* sperm membrane (Mccarthy and Meyers, 2011). However, it is not advised to simply supplement extender with catalase, and other strategies or antioxidants should improve not only sperm membrane integrity, but motility post-thaw.

## References

- Agarwal, A., Sharma, R.K., Nallella, K.P., Thomas, A.J. Jr., Alvarez, J.G., Sikka, S.C. (2006) Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil. Steril.* **86**, 878-85.

- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S.S. (2014) Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J. Men's Health* **32**, 1-17.
- Aitken, R.J., Baker, M.A. (2006) Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol. Cel. Endocrinol.* **250**, 66–9.
- Dixson, A.F., Anderson, M.J. (2002) Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in Primates. *Folia Primatol.* **73**, 63-9.
- Dong, Q., Rodenburg, S.E., Huang, C., VandeVoort, C.A. (2008) Cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) epididymal spermatozoa before and after refrigerated storage. *J. Androl.* **29**, 283–92
- Dong, Q., Correa,, L.M., Yandevoort, C.A. (2009) Rhesus monkey sperm cryopreservation with TEST-yolk extender in the absence of permeable cryoprotectant. *Cryobiology* **58**, 20–7.
- Kefer, J.C., Agarwal, A., Sabanegh, E. (2009) Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int. J. Urol.* **16**, p.449–57.
- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., Plessis, S.S. (2010) Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian. J. Exp. Biol.* **48**, 425-35.
- Leão, D.L., Miranda, S.A., Brito, A.B., Lima, J.S., Santos, R.R., Domingues, S.F.S. (2015) Efficacious long-term cooling and freezing of *Sapajus apella* semen in ACP-118®. *Anim. Reprod. Sci.* **159**, 118–23.
- Mccarthy, M.J., Meyers, S.A. (2011) Antioxidant treatment in the absence of exogenous lipids and proteins protects rhesus macaque sperm from cryopreservation-induced cell membrane damage. *Theriogenology* **76**, 168–76.
- Mora-Esteves, C., Shin, D. (2013) Nutrient supplementation: improving male fertility fourfold. *Sem. Reprod. Med.* **31**, 293-300.

- Moubasher AE, El Din AME, Ali ME, El-Sherif WT, Gaber HD, 2013: Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia* **45**, 135–9.
- Oliveira, K.G., Miranda, S.A., Leão, D.L., Brito, A.B., Santos, R.R., Domingues, S.F.S. (2011) Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES–TRIS. *Anim. Reprod. Sci.* **123**, 75-80.
- Oliveira, K.G., Leão, D.L., Almeida, D.V.C., Santos, R.R., Domingues, S.F.S. (2015) Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey, *Saimiri collinsi*. *Theriogenology* **84**, 743-9.
- Oliveira, K.G., Santos, R.R., Leão, D.L., Queiroz, H.L., Paim, F.P., Vianez-Júnior, J.L.S.G., Domingues, S.F.S. (2016a) Similarities in testicular and seminal aspects in four squirrel monkeys' species. *Theriogenology* **86**, 879–87.
- Oliveira, K.G., Santos, R.R., Leão, D.L., Brito, A.B., Lima, J.S., Sampaio, W.V., Domingues, S.F.S. (2016b) Cooling and freezing of sperm from captive, free-living and endangered squirrel monkey species. *Cryobiology* **72**, 283-9.
- Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K., Burton, P. (2009) Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reprod. BioMedicine Online* **18**, 184-9.

**Table 1.** Mean ( $\pm$  SD) data of ejaculates (number), sperm motility (%), vigor (grade), and sperm plasma membrane integrity (PMI; %).

<b>Animal</b>	<b>Ejaculates</b>	<b>Group</b>	<b>Motility</b>	<b>Vigour</b>	<b>PMI</b>
I	1	Control	90	5	71
II	1	Control	90	5	90
III	1	Control	50	4	51
IV	4	Control	72.5 $\pm$ 23	4	65 $\pm$ 21
I	1	catalase 10 $\mu$ g/ml	90	5	78
II	1	catalase 10 $\mu$ g/ml	90	5	58
III	1	catalase 10 $\mu$ g/ml	20	4	51
IV	4	catalase 10 $\mu$ g/ml	74 $\pm$ 23	5	51 $\pm$ 26
I	1	catalase 50 $\mu$ g/ml	90	5	60
II	1	catalase 50 $\mu$ g/ml	90	5	80
III	1	catalase 50 $\mu$ g/ml	0	0	27
IV	4	catalase 50 $\mu$ g/ml	72 $\pm$ 23	4	69 $\pm$ 24

**Table 2:** Motility, vigor, and plasma membrane integrity (PMI) of *Sapajus apella* sperm.

	<b>Motility</b>	<b>Vigor</b>	<b>PMI</b>
<b><i>Diluted</i></b>			
Control	77 ± 19 <sup>A</sup>	5 ± 1 <sup>A</sup>	60 ± 22 <sup>A</sup>
Catalase			
10 µg/ml	69 ± 33 <sup>A</sup>	5 ± 1 <sup>A</sup>	59 ± 19 <sup>A</sup>
50 µg/ml	63 ± 43 <sup>A</sup>	4 ± 2 <sup>A</sup>	39 ± 12 <sup>A</sup>
<b><i>Cooled</i></b>			
Control	59 ± 41 <sup>A</sup>	3 ± 2 <sup>A</sup>	60 ± 22 <sup>A</sup>
Catalase			
10 µg/ml	54 ± 42 <sup>A</sup>	3 ± 2 <sup>A</sup>	59 ± 20 <sup>A</sup>
50 µg/ml	51 ± 38 <sup>A</sup>	3 ± 2 <sup>A</sup>	39 ± 12 <sup>A</sup>
<b><i>Frozen-thawed</i></b>			
Control	6 ± 12 <sup>B</sup>	1 ± 1 <sup>B</sup>	11 ± 19 <sup>B</sup>
Catalase			
10 µg/ml	4 ± 8 <sup>B</sup>	1 ± 1 <sup>B</sup>	14 ± 15 <sup>B</sup>
50 µg/ml	7 ± 14 <sup>B</sup>	1 ± 1 <sup>B</sup>	15 ± 29 <sup>A</sup>

A-B: Different uppercase letters indicate differences between means comparing liquefied, cooled and freezing–thawing within the same group;  $P < 0.05$ .

**Table 3:** Mean ( $\pm$  SD) percentages of morphologically normal sperm and sperm with major pathologic defects.

	<b>Diluted*</b>			<b>Cooled</b>			<b>Frozen–thawed</b>		
	<b>Control</b>	<b>Catalase</b>		<b>Control</b>	<b>Catalase</b>		<b>Control</b>	<b>Catalase</b>	
		<b>10 <math>\mu</math>g/ml</b>	<b>50 <math>\mu</math>g/ml</b>		<b>10 <math>\mu</math>g/ml</b>	<b>50 <math>\mu</math>g/ml</b>		<b>10 <math>\mu</math>g/ml</b>	<b>50 <math>\mu</math>g/ml</b>
<b>Sperm morphology</b>									
Normal spermatozoa	77 $\pm$ 4	82 $\pm$ 3	81 $\pm$ 3	78 $\pm$ 4	85 $\pm$ 4	82 $\pm$ 3	84 $\pm$ 6	88 $\pm$ 2	88 $\pm$ 2
<i>Primary abnormalities</i>									
Strongly coiled tail	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2	2 $\pm$ 0	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1
<i>Secondary abnormalities</i>									
Coiled tail	11 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2	9 $\pm$ 4	5 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1
Bent tail	7 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1

\*After liquefaction

## **6 CONCLUSÃO GERAL**

O diluidor ACP®-118 conseguiu manter de forma mais eficaz a motilidade, garantindo melhor viabilidade espermática após o resfriamento em relação ao TESTRIS e ACIN. A criopreservação do sêmen de *Sapajus apella* em diluidor à base ACP®-- 118 a 3% apresentou melhores resultados nos parâmetros espermáticos analisados. Contudo, apesar de sêmen descongelado ser capaz de fecundar o óocito e produzir zigoto, não houve desenvolvimento de embrião.

No tocante a suplementação de antioxidante no meio de criopreservação seminal, o uso de catalase mostrou efeito benéfico durante o processo, entretanto, novas concentrações devem ser testadas visando melhorar os parâmetros espermáticos pós-descongelação.