

ÍTALO AUGUSTO DA COSTA SOARES

USO DA MELATONINA NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S676u
2016 Soares, Ítalo Augusto Costa, 1990-
Uso da melatonina na criopreservação do sêmen caprino /
Ítalo Augusto Costa Soares. – Viçosa, MG, 2016.
xii, 50f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Caprino. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. 4. Melatonina.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.39

ÍTALO AUGUSTO DA COSTA SOARES

USO DA MELATONINA NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2016.

José Domingos Guimarães

Giancarlo Magalhães dos Santos

Jeferson Ferreira da Fonseca

Cláudio José Borela Espeschit

Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

"Aprendi que não posso exigir o amor de ninguém... Posso apenas dar boas razões para que gostem de mim... E ter paciência para que a vida faça o resto..."

William Shakespeare

“Eu andarei vestido e armado com as armas de São Jorge para que meus inimigos, tendo pés não me alcancem, tendo mãos não me peguem, tendo olhos não me vejam, e nem em pensamentos eles possam me fazer mal. Armas de fogo o meu corpo não alcançarão, facas e lanças se quebrem sem o meu corpo tocar, cordas e correntes se arrebentem sem o meu corpo amarrar.

Jesus Cristo me proteja e me defenda com o poder de sua santa e divina graça, Virgem de Nazaré, me cubra com o seu manto sagrado e divino, protegendo-me em todas as minhas dores e aflições, e Deus, com sua divina misericórdia e grande poder, seja meu defensor contra as maldades e perseguições dos meus inimigos.

Glorioso São Jorge, em nome de Deus, estenda-me o seu escudo e as suas poderosas armas, defendendo-me com a sua força e com a sua grandeza, e que debaixo das patas de seu fiel ginete meus inimigos fiquem humildes e submissos a vós. Assim seja com o poder de Deus, de Jesus e da falange do Divino Espírito Santo. São Jorge Rogai por Nós.

Amém”

Oração de São Jorge

*Dedico esta obra a minha família,
minha mãe Marina da Costa Soares,
meu pai José Dimas de Souza Soares,
meus irmãos Dimmy Ângelo da Costa
Soares e Marianne Cecília da Costa
Soares, e aos meus avós maternos e
paternos (“in memoriam”).*

Aos meus amigos de Viçosa e Lajinha

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente de modo a guiar e iluminar a jornada da minha vida, na qual somos apenas seres espirituais em busca de um significado para essa complexa passagem chamada vida.

Foram quase dois anos de apertos e experiências muito bem vividas para contar... E, posso dizer que, ao longo desses dois anos, o que não falta são pessoas importantes para agradecer. Tão importante quanto o conhecimento adquirido com essa dissertação é o reconhecimento daqueles que fizeram a diferença para que o experimento fosse concluído.

Em primeiro lugar, não poderia ser diferente, agradeço e louvo aos meus pais Dimas e Marina e aos meus irmãos Dimmy e Marianne. Eles que sempre estiveram ao meu lado me dando todo o suporte necessário para mais essa conquista. Obrigado por tudo, sempre e pra sempre.

Ao meu orientador Ciro Torres, pelas ideias, discussões, orientação, compreensão e apoio ao longo desses anos. E, principalmente, obrigado por ter me apoiado quando perdemos o experimento de PIVE. Por compreender minha situação e dar incentivo para que tudo fosse adiante e superado, apesar dos pesares, meu agradecimento eterno. Ao prof Giovanni, pelo apoio como coorientador desta dissertação de mestrado.

Outro agradecimento especial é ao prof. Leandro Licursi. Graças a ele, Bruna e Paulinha consegui finalizar meu experimento. Obrigado por me ensinar a citometria de fluxo e permitir que se tornasse uma realidade para todos da Reprodução Animal da UFV. E obrigada por tanta disponibilidade, paciência e ideias para enriquecimento do meu aprendizado.

Aos professores membros da banca de dissertação de mestrado JD, Giancarlo, Jeferson, e Claudio pela disponibilidade, sugestões e correções desse trabalho.

Ao setor de caprinocultura da UFV e ao Laboratório de Reprodução Animal DZO/UFV, por disponibilizarem os animais e a estrutura física para que todo material fosse processado.

Aos estagiários Domingos, Andréia e Lucas TG que trabalharam dia e noite, finais de semana e feriados... Além da ótima convivência, harmonia e carinho recebido, agradeço por auxiliarem nas coletas e preparo dos materiais que fizeram com absoluta competência.

E por falar em competência, não posso deixar de agradecer de forma especial ao amigo Jurandy. Além de batalhador inteligente e competente, é pé no chão, carismático e domina como poucos a arte da estatística. Não posso deixar de referenciar de maneira especial ao Carlos Thiago, pois somente com palavras não conseguiria te agradecer, pois você fez e continua fazendo tanto por mim. Estes dois não só participaram de absolutamente todo o experimento como tomaram a responsabilidade pra si quando eu estava em apuros. Sem eles, sem dúvida as coisas teriam sido bem mais complicadas e demoradas. Obrigado mesmo Jura e Carlos.

Amiga do coração como Daniela Guedes, que sempre esteve do meu lado me dando todo apoio e carinho necessário para esta conquista e outras amizades geradas nesse tempo foram as do Duílio, Leandro e Érly, e da pós-graduação que além de me renderem boas gargalhadas, tornaram a árdua tarefa experimental mais leve e eficiente. Obrigado mesmo pela amizade e companheirismo...

Aos amigos da pós-graduação e orientados do JD, Bruna, Paula, Breno, Daniel, Denise, Faider, Paula, e Victor, por toda disponibilidade e sugestões.

Aos funcionários e professores do Departamento de Zootecnia e Veterinária que me ajudaram das mais variadas formas, em todos os momentos: seu Euvécio, Venâcio, Rosane e professores Mario Paulino, Eduardo Paulino e JD por disponibilizarem reagentes e equipamentos utilizados ao longo do experimento.

Um agradecimento especial à Fernanda, secretária da Pós Graduação do Departamento de Zootecnia, por me socorrer em todos os momentos que precisei e até mesmo naqueles em que eu não sabia que precisava de ajuda.

Aos membros da equipe do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV Karla, Gilmar e Lourenço por disponibilizarem os equipamentos e toda estrutura física adequada para que partes das análises fossem realizadas.

À Botupharma, pela atenção e prontidão ao ceder todos os diluentes utilizados no experimento.

À Biotran, pela atenção e prontidão em disponibilizar e enviar com maior boa vontade os reagentes para PIV, em especial não poderia deixar de agradecer ao Carlos Fernandes, diretor desta grande empresa no mercado de embriões.

Às agências de fomento FINEP, FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo financiamento de equipamentos e materiais utilizados nos mais diversos setores da UFV. Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

E, por fim, mas não menos importante, meu agradecimento eterno à Universidade Federal de Viçosa, instituição em que graduei em Medicina Veterinária e que hoje considero minha casa e tanto me orgulho.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Ítalo Augusto da Costa Soares, filho de José Dimas de Souza Soares e Marina da Costa Soares, nasceu em Lajinha – MG em 26 de março de 1990 onde residiu até seus 17 anos.

Em Viçosa, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, em março de 2009, graduando-se em Março de 2014. Durante esse período, foi Bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq) sob a orientação do Prof. Dr. Cláudio Cesar Fonseca e Bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Sirlene Rodrigues Souza Sartori.

Em março de 2014, iniciou o curso de Pós-graduação em Zootecnia, Mestrado, área de concentração Fisiologia e Reprodução Animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a orientação do Prof. Dr. Ciro Alexandre Alves Torres, concluindo sua dissertação de Mestrado em fevereiro de 2016.

ÍNDICE

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Plasma Seminal e sêmen caprino.....	2
2.2. Criopreservação de sêmen caprino.....	3
2.3. Meios diluidores e agentes crioprotetores	5
2.3.1. <i>Diluentes a base de gema de ovo.....</i>	6
2.3.2. <i>Diluentes a base de leite.....</i>	6
2.3.3. <i>Crioprotetores não penetrantes.....</i>	7
2.3.4. <i>Crioprotetores penetrantes.....</i>	7
2.4. Estresse Oxidativo e Antioxidantes.....	8
2.5. Melatonina.....	9
2.5.1. <i>Síntese, secreção e metabolismo da melatonina.....</i>	9
2.5.2. <i>Ação antioxidante da Melatonina.....</i>	10
2.6. Teste de Termorresistência.....	14
2.7. Citometria de fluxo.....	15
2.7.1. <i>Sondas Fluorescentes e Citometria de Fluxo.....</i>	15
2.7.2. <i>Citometria de fluxo em espermatozoides.....</i>	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Período e local do experimento.....	17
3.2. Delineamento Experimental.....	18
3.3. Colheitas e análises do sêmen fresco.....	19
3.4. Congelamento de sêmen.....	20

3.5. Avaliação in vitro da viabilidade espermática.....	21
3.6. Teste de termorresistência (TTR).....	21
3.7. Citometria de fluxo.....	21
3.7.1. Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio Intracelular (DCFDA/IP).....	22
3.7.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (IP/FITC- PSA).....	23
3.7.3. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1).....	25
3.8. Análises Estatísticas.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Sêmen fresco.....	27
4.2. Teste de termorresistência (TTR).....	27
4.3. Citometria de fluxo.....	29
4.3.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e presença de peróxido de hidrogênio intracelular.....	29
4.3.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal.....	32
4.3.3. Avaliação do potencial mitocôndrial.....	35
5. CONCLUSÕES.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
7. ANEXOS.....	49

RESUMO

SOARES, Ítalo Augusto da Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Uso da melatonina na criopreservação do sêmen caprino.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Coorientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Objetivou-se neste estudo verificar se a melatonina influencia a integridade estrutural da membrana plasmática, o acrosssoma, a produção de peróxido de hidrogênio e atividade mitocondrial dos espermatozoides caprinos criopreservados, bem como, verificar o potencial uso deste antioxidante em meio diluente comercial para criopreservação de sêmen. Foram utilizados dois machos adultos da raça Alpina e dois da raça Saanen. Foi utilizada vagina artificial obtendo-se sete ejaculados por animal. Após a coleta, fez-se a avaliação das características por meio de testes complementares. Em seguida, o sêmen foi diluído com os seguintes tratamentos: Botubov[®] (T₁), Botubov[®] + 1 μM (T₂), Botubov[®] + 1 mM Melatonina (T₃), Botubov[®] + 2 mM Melatonina (T₄), Botubov[®] + 3 mM Melatonina (T₅) e Botubov[®] + 4 mM Melatonina (T₆). Em seguida foram avaliados a motilidade progressiva e vigor espermático. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL, que foram resfriadas a 5°C, durante três horas. O pré-congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio durante 15 minutos. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio para o congelamento final do sêmen. As partidas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos e homogeneizadas para as análises de motilidade e vigor espermáticos, teste de termorresistência e citometria de fluxo. No sêmen fresco, as características de motilidade e vigor mantiveram-se dentro de parâmetros normais. As médias de motilidade e vigor para o sêmen descongelado diferiram entre os tratamentos, para aqueles utilizaram melatonina a partir de 1 e 2mM, principalmente após o descongelamento nos tempos zero e 30 minutos, sendo observado diferenças ao longo de todo TTR ($P < 0,05$). A análise por citometria de fluxo, para quase todas as características, apresentou diferenças entre o tratamento controle e os demais tratamentos ($P < 0,05$) quando a concentração de melatonina excedeu valores entre 1 e 2 mM no diluente. Conclui-se que a melatonina, em elevadas concentrações, apresenta resultados insatisfatórios no congelamento de sêmen caprino e que sua adição nas concentrações de 1 μM no diluente não afetou qualquer parâmetro avaliado neste estudo.

ABSTRACT

SOARES, Ítalo Augusto da Costa. Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Use of melatonin in cryopreservation of goat semen.** Advisor. Ciro Alexandre Alves Torres. Co-advisor: Giovani Ribeiro de Carvalho.

The aim of this study was to verify whether melatonin affects the structural integrity of the plasma membrane, acrosssoma, the production of hydrogen peroxide and mitochondrial activity of sperm cryopreserved goats, as well as to investigate the potential use of this antioxidant in commercial diluent for semen cryopreservation. Two adult males of the Alpine race and two Saanen were used. For semen collection was used artificial vagina resulting in seven ejaculations per animal. After collection, made up the evaluation of the characteristics through additional tests. Then, semen was diluted with the following treatments: Botubov® (T1), Botubov® + 1µM (T2), Botubov® + 1 mM Melatonin (T3), Botubov® + 2 mM melatonin (T4), Botubov® + 3 Melatonin mM (T5) and Botubov® + 4 mM Melatonin (T6). They were then evaluated motility and sperm vigor in each treatment. The semen was packaged in 0.25 ml palettes, which were cooled to 5 ° C for three hours. The pre-freezing was performed in liquid nitrogen vapor for 15 minutes. After this period, the palettes were immersed in nitrogen for the final freezing of semen. The palettes were defrosted in a water bath at 37 ° C for 30 seconds, put into microtubes and homogenized for analysis of spermatic motility and vigor, heat resistance test and flow cytometry. In fresh semen, the motility and vigor remained within normal parameters. The average motility and vigor to the defrosted semen differ between treatments to those used melatonin from 1 and 2 mM, especially after defrosting at zero and 30 minutes, and observed differences throughout TTR ($P < 0, 05$). The integrity of the plasma membrane and acrossosomal, production of peroxides and sperm mitochondrial activity were assessed by flow cytometry and for almost all the features presented differences between control treatment and other treatments ($P < 0.05$) when the concentration of melatonin exceeded values from 1 and 2 mM in diluent. It is concluded that the addition of melatonin, in high concentrations, shows unsatisfactory results in freezing goat semen and that the addition of melatonin in 1 uM concentrations in the diluent did not affect any of the parameters evaluated in this study.

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma biotecnologia de grande relevância que apresenta como principal objetivo o rápido avanço genético, com melhor aproveitamento de reprodutores de características produtivas superiores e aumento na eficiência reprodutiva e sanitária do rebanho (VISHWANATH, 2003).

A qualidade seminal é de fundamental importância para o sucesso da IA, por isso seu processamento deve preservá-la ao máximo. Os processos de congelamento e descongelamento causam diminuição da concentração dos espermatozoides viáveis por dose de sêmen congelado, e com isso redução do retorno econômico tanto para o proprietário como para as Centrais de Inseminação Artificial (CASTILHO, 2008).

Os diluentes possuem a função básica de proteger os espermatozoides das fases críticas da criopreservação. Um bom diluente deve possuir baixa toxicidade à célula espermática; osmolaridade adequada, onde o espermatozoide caprino possui maior viabilidade em meios hipertônicos entre 425 e 525 mOsm; poder nutritivo e tampão eficaz; estabilizadores de membrana; pH em torno da neutralidade e, por fim, ser de fácil preparo e baixo custo (PURDY, 2006). Sendo que, um dos pré-requisitos para o sucesso da IA é o uso de um diluente capaz de não comprometer ou minimizar lesões nas membranas dos espermatozoides.

Para diminuir os efeitos das espécies reativas de oxigênio (ROS), existem nos espermatozoides e no plasma seminal, potentes agentes antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, vitamina E, ácido ascórbico, etc.) que previnem a formação de radicais livres. Todavia, este sistema não é suficiente para prevenir a peroxidação dos lipídios, especialmente durante a estocagem *in vitro* (resfriamento e/ou congelamento), onde a produção de radicais livres é significativamente aumentada como resultado de mudanças metabólicas (BANSAL e BILASPURI, 2011).

Os mecanismos antioxidativos do sêmen quando lavado ou diluído para a criopreservação são reduzidos. O metabolismo dos espermatozoides, no sêmen com altas concentrações espermáticas, gera grande quantidade de ROS. Esses fatores levam ao estresse oxidativo e injúrias das células espermáticas (SOARES & GUERRA, 2009; LEAHY *et al.*, 2010).

Estudos sugerem que a melatonina participa na regulação das defesas antioxidantes do plasma seminal de ovinos, visto que, apresentou correlação positiva com os níveis seminais das enzimas glutathione redutase, superóxido dismutase e catalase. (CASAO *et al.* 2010). A fim de melhorar a qualidade do sêmen criopreservado por meio da prevenção ou redução do estresse oxidativo, a adição do antioxidante melatonina nos diluidores seminais e o uso de implantes subcutâneos de melatonina em diversas espécies tem sido reportado (CASAO *et al.* 2010c; SUCCU *et al.*; 2011; SILVA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012)

Objetivou-se no presente estudo testar um diluente acrescido de melatonina capaz de minimizar os efeitos deletérios provocados pela síntese excessiva de ROS durante o processo de criopreservação do sêmen caprino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plasma Seminal e sêmen caprino

O plasma seminal constitui a parte líquida do sêmen secretado pelas glândulas vesiculares, epidídimo, ductos deferentes, próstata e glândulas bulbouretrais. É isotônico e neutro, rico em substâncias orgânicas e inorgânicas, como a frutose, ácido ascórbico, inositol, sódio, potássio, cálcio, fosfolipídios, prostaglandinas, enzimas e proteínas que servem para proteger e nutrir os espermatozoides (MAIA, 2010).

Além destes compostos o plasma seminal é constituído por 75 % de água. A frutose é o açúcar mais metabolizável, e fonte energética dos espermatozoides. Outros compostos como: sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolipídios, e prostaglandinas auxiliam a movimentação dos espermatozoides nas vias genitais da fêmea (GUERREIRO, 2002).

O plasma seminal caprino possui essencialmente três funções: auxilia o transporte dos espermatozoides pelas vias genitais masculinas durante a ejaculação; ativa os espermatozoides previamente imóveis; e proporciona um meio tamponado e rico em nutrientes essenciais para a sobrevivência dos espermatozoides depositados nas vias genitais femininas.

O sêmen caprino possui algumas peculiaridades em relação aos de outras espécies, como: síntese e secreção de enzimas com atividade fosfolipase pelas

glândulas bulbouretrais (LEBOEUF, 2000); presença de agentes antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, vitamina E, ácido ascórbico, melatonina etc.) no espermatozoide e plasma seminal.

2.2. Criopreservação de sêmen caprino

A produção espermática dos caprinos é afetada por fatores como raça, idade, nutrição, fotoperíodo, temperatura ambiente e umidade, responsáveis por variações nas características espermáticas do ejaculado (CHEMINEAU, 1986).

Os primeiros espermatozoides caprinos foram congelados por Smith e Polge (1950), e desde então, inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando estabelecer protocolos de resfriamento e criopreservação do sêmen, sendo todos baseados em curvas de resfriamento que essencialmente seguem o mesmo modelo proposto desde o seu advento.

Durante o processo de criopreservação, o sêmen é resfriado da temperatura de 37 ° para 20 °C, o que parece não ocasionar danos relevantes ao espermatozoide quando este se encontra diluído em meio diluidor adequado (KEITH, 1998).

O estresse térmico inicia quando o espermatozoide passa da temperatura do corpo para cinco °C (SQUIRES *et al.*, 1999), este advento ocorre devido a membrana plasmática ainda se encontrar entre a fase de transição do estado líquido cristalino, para o estado de gel (AMANN & PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996; MEDEIROS, 2002). Sendo este efeito minimizado via controle da taxa de resfriamento entre as faixas de temperaturas de 19 °C a oito °C, adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente (GRAHAM, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas (-0,05 °C/min).

A curva de resfriamento é considerada o principal entrave no processo de criopreservação do sêmen (WATSON, 1995). Durante o resfriamento, a taxa de queda de temperatura entre 19 e oito °C é um importante fator na ocorrência de alterações morfológicas e funcionais do espermatozoide, devido à ocorrência de mudanças irreversíveis na atividade metabólica da membrana plasmática do espermatozoide, levando à ruptura e perda de componentes celulares (GRAHAM, 1996).

Ainda no resfriamento, as proteínas da membrana podem se agregar, aumentando a permeabilidade da membrana espermática e reduzindo o metabolismo celular. No resfriamento de maneira inadequada, o espermatozoide sofre um fenômeno

conhecido como choque térmico (AMANN & GRAHAM, 1993), com danos irreversíveis à célula espermática que se caracterizam por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade progressiva, danos no metabolismo, alterações na membrana plasmática, acrossoma, concentrações intracelulares de cálcio e desorganização da bicamada lipídica (WATSON, 2000; COOTER *et al.*, 2005).

Diferentes períodos de equilíbrio são descritos para criopreservação do sêmen caprino (SAHNI e ROY, 1972; WAIDE *et al.*, 1997; DEKA e RAO, 1985). Essa diversidade pode ser devido a diferentes composições dos meios diluidores utilizados no congelamento (DEKA e RAO, 1985). Segundo Das e Rajkkonwvar (1995) e Dutta *et al.* (1996), o período de equilíbrio ideal para criopreservação de sêmen caprino encontra-se entre uma e quatro horas.

Durante o processo de criopreservação, existem duas faixas de temperatura que são consideradas críticas ao espermatozoide: o período de super-resfriamento (zero a menos cinco °C) e a de formação de cristais de gelo (menos seis a -15 °C) (WOELDERS, 1997). À medida que a temperatura é reduzida abaixo de 0°C, a amostra torna-se super-resfriada, e os cristais de gelo extracelulares começam a se formar a partir da água contida no meio circundante. A formação de gelo no meio extracelular aumenta a concentração de solutos e, com isso, um novo gradiente osmótico, aliado ao fato de a água intracelular congelar-se mais lentamente que a água do meio extracelular, a mesma sai do espermatozoide desidratando-o. (WATSON, 2000; ANDRABI, 2007). Neste ponto, a curva de congelação deve ser lenta o bastante para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico, pois uma desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer o colapso da membrana espermática (MEDEIROS, 2002).

A desidratação é um evento desejável, pois reduz a probabilidade de se formarem grandes canais de gelo intracelulares que causariam danos às estruturas internas e, ou, a membrana plasmática do espermatozoide (SQUIRES, 1999).

Outra etapa de grande relevância e que afeta diretamente a função espermática é o descongelamento. A curva de descongelamento ideal depende da curva utilizada para o congelamento. Espermatozoides criopreservados em curva lenta

devem ser descongelados lentamente, dando tempo suficiente para que os cristais de gelo descongelem e ocorra a rediluição dos solutos extracelulares, reidratando gradativamente a célula espermática. Se o espermatozoide é descongelado rapidamente, o gelo passa para fase líquida diluindo o soluto do meio e a água entra no espermatozoide que se encontra hiperconcentrado, danificando-o. (GRAHAM, 1996). Já as curvas rápidas de congelamento exigem que os espermatozoides sejam descongelados rapidamente a fim de que o gelo intracelular não tenha tempo de sofrer recristalização (GRAHAM, 1996; SQUIRES *et al.*, 1999).

2.3. Meios diluidores e agentes crioprotetores

O sêmen caprino é extremamente sensível ao choque térmico, às variações de pH e pressão osmótica da solução diluente (DEKA & RAO, 1985), e para que o espermatozoide ejaculado sobreviva por longos períodos, é necessária a adição de meios diluidores protetores no sêmen, aumentando assim a viabilidade espermática e o número de doses destinadas a inseminação artificial (AISEN, 2008).

Existem vários meios diluidores de sêmen para caprinos, compostos por diferentes formulações e ingredientes. No entanto, o meio diluidor ideal deve possuir as seguintes propriedades: disponibilizar os nutrientes adequados e em quantidades suficientes aos espermatozoides; atuar como tampão estabilizando as mudanças de pH; proporcionar um ambiente isotônico mantendo a osmolaridade igual à do plasma seminal; proteger o espermatozoide do choque térmico durante a refrigeração, bem como protegê-lo das lesões causadas na membrana plasmática e acrossomal durante congelamento e descongelamento; e controlar a proliferação microbiana. Ou seja, criar um ambiente que garanta que o espermatozoide não sofra alterações morfofisiológicas e funcionais, garantindo deste modo que o sêmen criopreservado promova uma boa taxa de fertilidade após a inseminação (MAIA, 2010).

Os meios para criopreservação do sêmen caprino podem ser constituídos à base de citrato de sódio, gema de ovo, lactose, água de coco, Tris e leite bovino desnatado em pó e reconstituído (BARBOSA, 1999). Sendo o meio composto também por um crioprotetor penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfóxido), sais (citrato de sódio ou ácido cítrico) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina) (PURDY, 2006).

2.3.1. Diluentes a base de gema de ovo

O efeito protetor da gema de ovo sobre a membrana plasmática da célula espermática ocorre devido a reposição de fosfolipídios perdidos em função da mudança brusca de temperatura durante o resfriamento (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990). Durante o choque térmico, lipoproteínas de baixa densidade, como a fosfatidilcolina, interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática e minimizam o choque térmico. Essa interação ocorre principalmente na fase de equilíbrio (processo de resfriamento a cinco °C).

A gema de ovo previne também a liberação da enzima hialuronidase pela célula espermática (FOULKES, 1977). Aboagla e Tereda (2004) sugerem que a adição de gema de ovo aos meios para o sêmen caprino aumenta substancialmente a proporção de espermatozoides viáveis recuperados após a descongelação.

No entanto, segundo Maxwell e Evans (1987) os diluidores utilizados na criopreservação de sêmen caprino devem apresentar 2,5 % de gema de ovo, uma porcentagem mais baixa do que a utilizada em outras espécies, pois o seu plasma seminal possui a enzima coaguladora da gema de ovo; e também por existir no seu plasma seminal enzimas com atividade fosfolipase que catalisam a hidrólise das lecitinas presentes na gema de ovo em lisolecitinas, com ação detergente sobre lipídeos de membrana e ácidos graxos, sendo então, altamente tóxicos para a célula espermática (IRITANI E NISHIKAWA, 1964; PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997). A lecitina também está presente na membrana plasmática do espermatozoide caprino, ressaltando-se a importância da composição enzimática do sêmen e do meio diluente para criopreservação de sêmen nesta espécie (SIMPLÍCIO E MACHADO, 1989; BARIL *et al.*, 1993). A concentração desta enzima varia com o macho e o ejaculado, sendo mais elevado no sêmen obtido por eletroejaculação, devido a maior presença de plasma seminal no ejaculado.

2.3.2. Diluentes a base de leite

O leite desnatado é considerado um dos diluentes de eleição para a espécie caprina (BARBOSA, 1999). A eficiência das proteínas (caseínas) do leite na criopreservação do sêmen se assemelha ao da gema de ovo, pois sua composição proteica atua como tampão, e sua ação quelante diante dos metais pesados, diminuem os efeitos deletérios causados durante o resfriamento (SALOMON & MAXWELL,

2000). O efeito deletério do diluente a base de leite e a fração glicoproteica do plasma seminal caprino (NUNES, 1982), que é responsável por hidrolisar os fosfolípidos da membrana plasmática e os triglicerídeos do leite desnatado, resulta em um ácido graxo (ácido oleico) tóxico aos espermatozoides (PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997).

2.3.3. Crioprotetores não penetrantes

Os crioprotetores não penetrantes são substâncias constituídas por macromoléculas, lipídios e proteínas que não atravessam a membrana plasmática dos espermatozoides. Os mais utilizados são gema de ovo, leite, carboidratos (glicose, frutose, lactose, sacarose, manose, rafinose, trealose), polímeros sintéticos (polivinilpirrolidona e metilcelulose) e albumina sérica bovina (HOLT, 2000; LEBOEUF *et al.*, 2000; KEITH, 1998). Essas substâncias auxiliam no congelamento, pois tornam o meio diluidor hipertônico com o aumento da osmolaridade do meio extracelular, que por gradiente de concentração permite a passagem de água do interior da célula espermática para o meio extracelular, de modo a inibir a formação de cristais de gelo no interior da célula durante a criopreservação (GONZALEZ, 2004).

2.3.4. Crioprotetores penetrantes

Em geral, os crioprotetores penetrantes são formados por moléculas lipofílicas, que possuem capacidade de atravessar a membrana plasmática do espermatozoide e atuam de acordo com suas propriedades coligativas com a água. As ligações de hidrogênio formadas entre água e crioprotetor alteram a orientação das mesmas nos cristais de gelo, limitando a sua formação e retardando crescimento dos cristais de gelo (NASH, 1966; ROWE, 1966; WATSON, 1979). Além de diminuir a água intracelular e, conseqüentemente, o tamanho e o número de cristais de gelo, estes agentes diminuem o ponto crioscópico intracelular, de forma a manter maior quantidade de água no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos e propiciando ambiente menos deletério à célula espermática durante a criopreservação (WATSON, 1995).

São classificados em dois grupos: os álcoois (glicerol, etilenoglicol, entre outros) e as amidas. Sendo que o agente crioprotetor permeável ideal deve possuir baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (NASH, 1966; MEDEIROS *et al.*, 2002).

O crioprotetor pode causar danos osmóticos aos espermatozoides, mas cada espécie responde de maneira diferente em relação à ação do agente crioprotetor. O sêmen caprino é ligeiramente tolerante a essas condições e resistem de forma mais efetiva ao glicerol (MEDEIROS *et al.*, 2002). O uso deste agente em concentrações acima de sete % pode também resultar em danos irreversíveis a célula espermática, devido seu alto grau de toxicidade. Esses danos incluem mudanças nas estruturas citoplasmáticas, alteração da polimerização da tubulina e interferência direta nas proteínas de membrana (PARKS e GRAHAM, 1992).

2.4. Estresse Oxidativo e Antioxidantes

No intuito de minimizar os danos oriundos do processo de criopreservação, o uso de agentes antioxidantes tem sido investigado, visto que, aumentam o sucesso do congelamento por melhorar as condições do ambiente em que os espermatozoides estão expostos, minimizando efeitos deletérios provocados pela síntese excessiva de ROS, que reduzem os danos às membranas e modulam os mecanismos de capacitação espermática e reação acrossomal (CASAO *et al.*, 2010; LOOMIS & SQUIRES, 2005).

As ROS que representam maiores implicações na biologia reprodutiva e fertilização são representadas pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o ânion superóxido (O₂⁻), o radical peroxila (ROO⁻), e o radical hidroxila (OH⁻) com alto poder reativo (SIKKA, 1996; MANEESHE JAYALEKSHMI, 2006; ORTEGA FERRUSOLA *et al.*, 2009; REITER *et al.*, 2013). Existem ainda os oxidantes derivados do nitrogênio, que são denominados de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (TURRENS, 2003), com destaque para o óxido nítrico (ON⁻) e o peroxinitrito (ONOO⁻).

A formação de ROS em pequenas quantidades exerce fundamental importância na viabilidade espermática e fertilização, uma vez que os radicais O₂⁻ e H₂O₂ participam dos mecanismos de capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide ao ovócito em várias espécies (MAIA e BICUDO, 2009). Porém, quando a sua produção excede a capacidade antioxidante do meio intra e extracelular, instala-se o estresse oxidativo, caracterizado por peroxidação da membrana lipídica, lesões de membrana plasmática e acrossomal, e danos importantes ao DNA celular (GUTHRIE & WELCH, 2012). Além disso, o estresse oxidativo também prejudica o potencial de atividade mitocondrial e a capacidade fertilizante dos

espermatozoides para produção de embriões viáveis (SHANG *et al.*, 2004; AITKEN *et al.*, 2010).

Durante o congelamento, os efeitos deletérios do estresse oxidativo são desencadeados tanto pela retirada da maior parte do plasma seminal, o qual possui capacidade antioxidante (BUSTAMANTE *et al.*, 2006), quanto pelo estímulo à produção de ROS durante a criopreservação (WATSON, 2000). As principais enzimas que degradam as ROS são a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GRd) e glutamilmglicina ligase (GCL), particularmente abundantes no plasma seminal de mamíferos (REITER *et al.*, 2013). Além de enzimas, outros agentes antioxidantes do plasma seminal que atuam de forma a degradar as ROS, tais como: albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, lactato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotina (BALL, 2011).

O uso de antioxidantes exógenos no sêmen tem apresentado resultados favoráveis, reduzindo a concentração de malonaldeído (MDA) nas amostras seminais em decorrência da menor taxa de peroxidação lipídica e, e conseqüentemente, menos danos espermáticos e melhor conservação celular durante o processo de criopreservação (SARLÓS *et al.*, 2002). Entretanto, a terapia com antioxidantes pode apresentar efeitos indesejáveis quando a dose de segurança é ultrapassada, pois assim, inibem excessivamente a formação das ROS e suas funções fisiológicas desempenhadas nos espermatozoides, impossibilitando que ocorra a hiperativação, capacitação e reação acrossomal (CARVALHO *et al.*, 2002, LAMIRANDE *et al.*, 1997; SANOCKA & KURPISZ, 2004).

2.5. Melatonina

2.5.1. Síntese, secreção e metabolismo da melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é sintetizada a partir do aminoácido essencial triptofano, e secretada principalmente pela glândula pineal de mamíferos, mas existem outras estruturas reprodutivas periféricas que a produzem provavelmente para seu próprio uso (ITOH *et al.*, 1999; TOSINI & FUKUHARA, 2002).

A melatonina é sintetizada quase que exclusivamente durante a escotofase, e secretada em grandes quantidades no início da fase escura, sendo cerca de 100 vezes

mais elevada do que durante o dia (DRIJFHOUT *et al.*, 1996). Este hormônio é um dos componentes essenciais na regulação reprodutiva dos animais sazonais, visto que, todo o eixo hipotalâmico hipofisário gonadal é influenciado positivamente pela melatonina na espécie caprina (REITER *et al.*, 2013). No entanto, a produção de melatonina extra pineal possui ação autócrina ou parácrina, enquanto a maior concentração plasmática do hormônio se deve a síntese pela glândula pineal (STEFULJ *et al.*, 2001).

O aminoácido essencial triptofano é capturado na corrente sanguínea e por reações bioquímicas é biotransformado em melatonina. O triptofano é primeiramente hidroxilado pela enzima triptofano-5-hidroxilase (T-5-H) à 5- hidroxitriptofano, que é descarboxilado pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HDT) à 5-hidroxitriptamina (serotonina), acetilado pela arilalkilamina-N-acetiltransferase (AANAT ou NAT) à N-acetilserotonina e metilado em melatonina pela enzima citosólica hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), chamada também de acetilserotonina O-metiltransferase (ASOMT) (SIMONNEAUX & RIBELAYGA, 2003; REITER *et al.*, 2009).

Devido à sua natureza lipofílica, logo após sua síntese, é secretada sem nenhum mecanismo específico, podendo difundir livremente pelas membranas celulares e atravessar facilmente a barreira hematocefálica (VANECEK, 1998; MALPAUX, 2006). Além disso, a maior parte da melatonina (60-80%) presente na corrente sanguínea está ligada a proteína plasmática albumina e a α 1- glicoproteína ácida (KENNAWAY & VOULTSIOS, 2000). No entanto, a melatonina possui um período de meia-vida curta (20 minutos na ovelha) (ZARAZAGA *et al.*, 1998), sendo metabolizada principalmente, pela enzima hepática melatonina 6-hidroxilase (SKENE *et al.*, 2001).

2.5.2. Ação antioxidante da Melatonina

A melatonina influencia independente de receptores, a fisiologia reprodutiva do macho estimulando enzimas antioxidantes, e também, sequestrando radicais livres (OH e ONOO-) que induziriam danos e apoptose das células espermáticas (RODRIGUEZ *et al.*, 2004; DU PLESSIS *et al.*, 2010). (Figura 1).

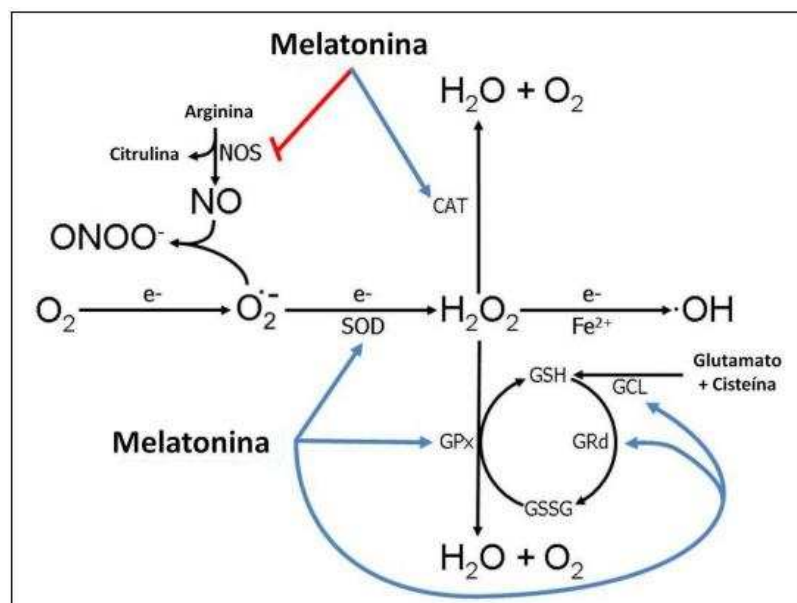


Figura 1. Ações da melatonina reduzindo radicais livres. A melatonina estimula muitas enzimas antioxidantes incluindo a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GRd) e glutamilglicina ligase (GCL); e também, inibe enzimas pró oxidativas como, óxido nítrico sintase (NOS). O radical ânion superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (·OH) são referidos como espécies reativas de oxigênio (ROS), e o óxido nítrico (NO) e ânion peroxinitrito (ONOO⁻) são referidos como espécies reativas de nitrogênio (RNS).

Fonte: reproduzido de Reiter *et al.* (2013).

A melatonina vem sendo largamente utilizada em sêmen de várias espécies no intuito de preservar a qualidade e viabilidade espermática durante a criopreservação, pois sua propriedade antioxidante está diretamente relacionada com a qualidade espermática, redução do processo apoptótico, indução da capacitação, hiperativação espermática e reação acrossômica.

Em sêmen humano, a melatonina foi testada quanto à sua capacidade em proteger os espermatozoides humanos da apoptose após exposição à agentes tóxicos. Sendo que, a adição da melatonina inibiu o aumento da atividade das caspase-3 e caspase-9, que são essenciais para a realização do processo apoptótico, além de reduzir a externalização da fosfatidilserina e dos níveis de ROS que levam a morte celular. (ESPINO *et al.*, 2010),

Shang *et al.* (2004) ao induzirem a síntese de radicais livres em sêmen humano, verificaram aumento na atividade da succinato desidrogenase mitocondrial, síntese de ROS, e redução do potencial de atividade mitocondrial. Sendo que, as alterações observadas para esses parâmetros foram reduzidas na presença de

melatonina, e com isso, os autores sugeriram o uso deste antioxidante em diluentes seminais para proteger a célula espermática de danos oxidativos. Du Plessis *et al.*, 2010 ao incubar *in vitro* espermatozoides humanos com dois mM de melatonina, durante 120 min, verificaram que a melatonina foi efetiva na redução das concentrações de óxido nítrico no sêmen, mas não na geração de ROS. Sendo que a porcentagem de espermatozoides móveis com motilidade progressiva e rápida foi elevada, e acompanhadas por um aumento na viabilidade espermática identificado pela sonda fluorescente Iodeto de Propídio (IP).

Estudo realizado com espermatozoides de ratos obtidos da cauda do epidídimo e incubados com mercúrio apresentou redução na motilidade e atividade das enzimas antioxidantes, e aumento na geração de H₂O₂ e produtos de peroxidação lipídica. Porém, quando coincubados com melatonina (mercúrio + melatonina) todas as mudanças induzidas pelo metal pesado foram revertidas para níveis encontrados em espermatozoides normais (RAO & GANGADHARAN, 2008).

Espermatozoides de roedores obtidos da cauda do epidídimo e tratados com pesticida organofosforado (Diazinon) apresentaram extensa ruptura do DNA e cromatina, porém, quando a melatonina foi administrada antes do pesticida, os danos ao DNA foram drasticamente reduzidos (SARABIA *et al.*, 2009).

Em búfalos Nili-Ravi, o uso da melatonina foi testado durante o processo de sexagem espermática, e revelou que a melatonina no diluidor, é altamente eficaz para proteção dos espermatozoides bubalinos destinados a coloração, sexagem espermática e criopreservação. Inferindo que, espermatozoides bubalinos previamente tratados com melatonina tenham uma melhor capacidade de fertilização e taxas de prenhez aumentadas em programas de transferência de embriões ou inseminação artificial (LI *et al.*, 2012).

A incubação do sêmen equino com melatonina nas concentrações zero, 50 pM, 100 pM, 200 pM ou um μ M a 37 °C por três horas, apresentou redução nas alterações que normalmente estão associadas a apoptose (aumento da permeabilidade da membrana plasmática e do baixo potencial de atividade mitocondrial), além de baixas concentrações de produtos da peroxidação lipídica e uma maior fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides (SILVA *et al.*, 2011). Acompanhado das melhorias funcionais, a peroxidação dos lipídeos também foi reduzida na presença da

melatonina. Sendo assim, as ações protetoras da melatonina foram consequências de suas ações diretas no sequestro de radicais livres e indiretas na estimulação de enzimas antioxidantes.

Em suínos, a melatonina na concentração de um μM foi adicionado ao sêmen com objetivo de aumentar a vida útil do espermatozoide refrigerado (à 17 °C). Após os períodos de um, quatro ou sete dias, foram analisados os parâmetros referentes à motilidade total e progressiva por análise computacional. Em citômetro de fluxo, foi avaliado o potencial de atividade mitocondrial, a integridade da membrana plasmática, a fluidez da membrana e a integridade da membrana acrossomal. Sendo que, no dia sete, o número de espermatozoides estáticos aumentou e a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva foi reduzida. Os dados de citometria documentaram que a melatonina aumentou a porcentagem de espermatozoides viáveis com acrossoma intacto e uma porcentagem significativamente maior de espermatozoides permanecendo viáveis durante o período de armazenamento de sete dias (MARTIN-HILDAGO *et al.*, 2011).

A adição de melatonina foi associada com a hiperativação de espermatozoides suínos (MARTIN-HIDALGO *et al.*, 2011) e de hamsters (FUJINOKI, 2008). Sendo que, a hiperatividade nos estágios iniciais de armazenamento pode ser resultado de uma elevada síntese de ATP, visto que, a melatonina possui alta solubilidade lipídica para atravessar o plasmalema do espermatozoide e entrar nas mitocôndrias (JOU *et al.*, 2007), promovendo a eficiência do complexo mitocondrial e produção de ATP (MARTIN *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2002; LEON *et al.*, 2004). Porém as ações da melatonina sobre a motilidade espermática podem ter sido uma consequência de sua interação com a calmodulina (POZO *et al.*, 1997; BENITEZ-KING & ANTON-TAY, 1993) que, entre as suas várias funções, influencia elementos do citoesqueleto, modulando assim a motilidade dos espermatozoides (REITER *et al.*, 2013).

O uso da melatonina no ejaculado de carneiros foi reportado por Succu *et al.* (2011) ao adicionar melatonina em concentrações de 0,001 a um mM no diluente, verificaram que a adição da melatonina na concentração de um mM resultou em maiores porcentagens de espermatozoides com motilidade progressiva, de espermatozoides com velocidade média e rápida, altas concentrações de ATP

intracelular e maior integridade do DNA. Além disso, oócitos fertilizados por espermatozoides tratados com melatonina exibiram melhores taxas de clivagem que aqueles fertilizados por espermatozoides de carneiro congelados sem melatonina. Casao *et al.* (2010c), ao investigarem se o sêmen de carneiro incubado com melatonina nas concentrações um μM , 10 nM e 100 pM durante a estação não reprodutiva, relataram que a melatonina não apresentou influência sobre os parâmetros de motilidade e de viabilidade espermática, porém, na concentração de um μM , a melatonina atuou reduzindo a capacitação espermática e a translocação de fosfatidilserina. Por outro lado, o tratamento com 100 pM aumentou a capacitação a curto prazo, o que levou a elevadas taxas de fertilização e clivagem na fertilização *in vitro*.

Além da adição de melatonina no diluente de criopreservação, também já foram utilizados em carneiros implantes subcutâneos de melatonina durante e fora da estação reprodutiva, e após a coleta e criopreservação a qualidade do ejaculado foi avaliada (KAYA *et al.*, 2001). Os resultados mostraram que a melatonina melhorou a viabilidade pós-descongelamento durante a estação reprodutiva, melhorando as taxas de integridade das membranas plasmática e acrossomal. Assim, pressupõe-se que o sêmen de carneiros tratados previamente com melatonina parece ser conservado durante o processo de criopreservação (REITER *et al.*, 2013). Casao *et al.* (2010) pelo Teste de Ligação à Zona Pelúcida verificou a habilidade da melatonina em influenciar a fertilidade do espermatozoide, constatando que ao utilizarem o sêmen de carneiros com e sem implantes de melatonina, observaram maior facilidade de ligação do espermatozoide ao oócito para os animais que receberam o implante. Além disso, ovelhas inseminadas com sêmen de doadores tratados com melatonina, exibiram melhores taxas de fertilidade e fecundidade.

2.6. Teste de Termorresistência

O teste de termorresistência (TTR) consiste em incubar a amostra de sêmen descongelada em banho-maria e mantê-las sob determinada temperatura e tempos pré-estabelecidos, para que ao longo do tempo, possa ser avaliado a motilidade progressiva e o vigor espermático (CBRA, 1998).

O teste de termorresistência é utilizado para avaliar o comportamento (motilidade e vigor) da amostra de sêmen incubada a 37 °C por tempo determinado e, desta forma, prever a fertilidade seminal (VOGLER *et al.*, 1991).

O teste de termorresistência rápido é amplamente utilizado na avaliação de sêmen criopreservado, e constitui uma prova de grande aplicabilidade especialmente devido a sua correlação com fertilidade do sêmen em programas de TE ou IA. A associação da resistência dos espermatozoides imposta ao período de incubação estabelecido pelo teste de termorresistência possui importantes implicações fisiológicas e práticas a campo, uma vez que, as correlações de fertilidade *in vivo* e a campo mostraram-se presentes (VISHWANATH & SHANNON, 1997).

2.7. Citometria de fluxo

2.7.1. Sondas Fluorescentes e Citometria de Fluxo

A utilização de sondas fluorescentes, também designadas de fluorocromos, na citometria de fluxo, é fundamental para o desenvolvimento desta técnica. As sondas fluorescentes são sensíveis em obter informação acerca da estrutura, função e viabilidade das partículas que se deseja analisar por citometria de fluxo.

Quando se utiliza mais do que uma sonda fluorescente, é importante salientar que estas devem possuir espectros de emissão diferentes para permitir quantificar de forma separada as características analisadas simultaneamente. No entanto, há situações em que os fluorocromos têm espectros de emissões que se sobrepõem, obtendo-se resultados ambíguos. Por esta razão, os citômetros possuem um sistema informático de compensação ou subtração de sinal. No entanto, é difícil prever teoricamente o grau de compensação, devendo este ser ajustado individualmente.

Os compostos fluorescentes podem marcar os componentes estruturais e funcionais de interesse de diferentes formas, tais como: ligando-se especificamente a esses componentes celulares (são exemplos os fluorocromos que marcam os ácidos nucleicos de cadeia dupla, proteínas ou lipídeos). Também podem distribuir-se num compartimento celular específico (exemplo, no núcleo, mitocôndrias ou vacúolos); num compartimento específico sub-celular em função do seu estado funcional (compartimento mitocondrial) e ser utilizados ligados a anticorpos ou lecitinas

conjugadas com outros fluorocromos (a fluoresceína e a ficoeritrina). Também são utilizados como uma não marcação, ou seja, como marcação negativa. Por exemplo, a exclusão do iodeto de propídio (IP) permite avaliar a integridade da membrana plasmática.

O primeiro fluorocromo a ser utilizado como marcador foi o isotiocianato de fluoresceína (FITC). Este é uma molécula pequena, com uma importante afinidade para as proteínas. Por outro lado o FITC é excitado com o azul (488 nm). No entanto, apresenta alguns inconvenientes relacionados com a quantificação. Há que se ter em conta, que uma molécula de FITC não é somente excitável pela luz do laser sendo também pela luz que provem de uma molécula de fluoro cromo que se encontra muito próxima.

Para estudos em células espermáticas, os fluorocromos mais utilizados são o IP (integridade da membrana plasmática); FITC- PSA ou FITC-PNA (integridade do acrossoma); DCFDA (síntese de H₂O₂); JC-1 (potencial mitocondrial), BODIPY^{581/591} (peroxidação da membrana espermática); e merocianina – M540 (organização da bicamada lipídica).

2.7.2. Citometria de fluxo em espermatozoides

A citometria de fluxo permite a observação de determinadas características das células por um sistema de fluxo, que permite a análise rápida, objetiva e quantitativa de amostras de células em suspensão. Esta técnica envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem em uma suspensão líquida, sendo esta particularidade uma das principais diferenças existentes entre a citometria de fluxo e outras técnicas de análise quantitativa, como por exemplo, a microespectrofotometria, que necessita da fixação de partículas a uma superfície (ex: lâmina).

A adaptação do citômetro de fluxo para avaliação espermática teve início no estudo da mensuração do conteúdo de DNA, e sua aplicação para análise espermática vem crescendo consideravelmente nas últimas décadas (EVENSON *et al.*, 1980). A citometria de fluxo é uma ferramenta muito importante para a análise celular, visto que, permite determinar, em poucos minutos, dados sobre todas as subpopulações celulares de uma determinada amostra. Este fator torna o método de citometria de fluxo

ideal para a avaliação de populações heterogêneas, como a dos espermatozoides (BATISTA e GUERRA, 2010).

Por microscopia óptica de fluorescência, normalmente, se conseguem examinar apenas 200 células espermáticas, enquanto que por citometria de fluxo, consegue-se examinar cerca de 30.000 espermatozoides em menos de um minuto. Além disso, este sistema automatizado permite ter maior exatidão nos resultados e redução no tempo de preparação, quando se compara com outras técnicas fluorescentes (ARRUDA *et al.*, 2011). A citometria de fluxo permite análises a alta velocidade e, além disso, garante que as partículas analisadas sejam selecionadas de toda a população, sem qualquer subjetividade associada.

A análise por citometria de fluxo é objetiva, apresenta alta repetibilidade experimental e permite que o pesquisador trabalhe com amostras de volume reduzido. Além disso, o citômetro de fluxo tem a capacidade de detectar marcadores por múltiplos fluorocromos associados a um único espermatozoide, o que permite avaliar simultaneamente mais de um atributo espermático (CROSS *et al.*, 1986).

A citometria de fluxo permite a observação de características, como tamanho da célula, forma e complexidade interna, assim como qualquer componente ou função do espermatozoide que pode ser detectado por um fluorocromo ou composto marcado com fluorescência (CELEGHINI *et al.*, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Período e local do experimento

O experimento foi aprovado pela Comissão de Uso de Animais de Produção (CEUAP - UFV 81/2014), conduzido no Setor de Caprinocultura e no

Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, situados na cidade de Viçosa, Minas Gerais, cujas coordenadas geográficas correspondem a 20°46'23'' latitude sul e 42°51'53'' longitude oeste, altitude média de 692,74m, clima Cwa pela classificação de Köppen (inverno seco e verão úmido), com temperatura média anual de 19,4 °C e precipitação pluviométrica anual de 1221 mm³, no período de Março de 2015 a Junho de 2016.

3.2. Delineamento Experimental

Foram selecionados como doadores de sêmen quatro reprodutores caprinos, sendo dois da raça Alpina e dois da raça Saanen, mantidos em baias individuais, clinicamente sadios e com histórico de fertilidade normal. De cada animal foram coletados sete ejaculados, sendo realizadas duas coletas semanais de cada reprodutor, totalizando 28 coletas durante todo o experimento. Antes do período experimental, os animais foram esgotados e submetidos a exame andrológico de acordo com o manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) e foram considerados aptos para reprodução.

Os animais receberam alimentação volumosa composta de silagem de milho e concentrado proteico, bem como sal mineral e água *ad libitum* atendendo às exigências nutricionais da categoria (NRC, 2006).

Para o congelamento dos ejaculados, foi utilizado o meio comercial Botu-Bov®1 sem antioxidante, constituindo esse o diluente base para os tratamentos de 2 a 6. Os tratamentos testados diferiram quanto às proporções adicionadas de melatonina ®2, conforme segue:

Tratamento 1: Botu-Bov® (Grupo Controle)

Tratamento 2: Botu-Bov® + 1µm de Melatonina

Tratamento 3: Botu-Bov® + 1mM de Melatonina

Tratamento 4: Botu-Bov® + 2mM de Melatonina

Tratamento 5: Botu-Bov® + 3mM de Melatonina

Tratamento 6: Botu-Bov® + 4mM de Melatonina

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas (*split plot*), sendo a raça considerada o fator primário e as concentrações de melatonina o fator secundário.

3.3. Colheitas e análises do sêmen fresco

As colheitas de sêmen foram realizadas no período da manhã, com o auxílio de fêmeas em estro ou uma fêmea em estro contida em tronco apropriado para a espécie caprina. Os ejaculados foram obtidos por meio de vagina artificial, preenchida com água a 60 °C e ar até a obtenção da pressão adequada, obtendo-se a temperatura média de 41 °C (40 a 42 °C) no ato da coleta. Como revestimento da mucosa da vagina artificial foi utilizado sacos plásticos estéreis em forma de funil, onde na extremidade mais fina acoplou-se um tubo plástico de centrifuga graduado (15mL). Esse mesmo tubo foi revestido externamente com material isotérmico, a fim de evitar mudanças bruscas de temperatura do sêmen com o ambiente. Em seguida, o ejaculado foi levado ao laboratório, para ser analisado e processado.

O tubo de colheita foi acondicionado à temperatura ambiente, da mesma forma, o diluente Botubov[®], que foi retirado do banho-maria (37 °C) assim que o ejaculado foi coletado.

Todo material utilizado na avaliação do sêmen encontrava-se previamente aquecido, em uma placa aquecedora regulada para temperatura de 37 °C.

Na avaliação física do sêmen *in natura*, foram analisadas as seguintes características: volume (mL), turbilhonamento (1-5), motilidade espermática progressiva retilínea (%), vigor (1-5) e concentração espermática (espermatozoides/mL). Uma gota (10 µL) de sêmen fresco de cada ejaculado foi colocada em uma lâmina previamente aquecida a 37 °C e então avaliado o turbilhonamento (movimento espermático em massa) em aumento de 100 X em microscopia de luz. Posteriormente, colocada uma lamínula previamente aquecida a 37 °C sobre a gota de sêmen e, em aumento de 400 X, foram avaliados a motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático, tal como preconizado pelo CBRA (2013).

Em microtubos de 1,5mL contendo um mL de solução fixadora de formol salina tamponada, foram acondicionadas alíquotas do sêmen suficiente para

turvar a solução, para análise morfológica dos espermatozoides por meio de preparação úmida e com auxílio de microscopia de fase em aumento de 1000 X. Foram contabilizadas 400 células por ejaculado e a porcentagem dos defeitos espermáticos (maiores, menores e totais) foi registrada segundo os critérios estabelecidos por Blom (1973) e preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Para realização da concentração espermática foi retirada uma alíquota de 10 µL do sêmen, que foi diluída em 1990 µL de solução formol salina, resultando em um fator de diluição de 1/200 (sêmen:solução). O número de células espermáticas foi quantificado com o uso de uma câmara de Neubauer, e por meio da fórmula abaixo, sendo assim estimada a concentração total do ejaculado (e):

$$e = \frac{n}{1/10^* \times 5/25^{**} \times 1/200^{***}}$$

n= número de espermatozoides contados em 5 campos da câmara de Neubauer;

* = distância entre lâminula e a lente da câmara de Neubauer;

**= número de quadrados contados sobre o total existente na câmara de Neubauer;

***= fator de diluição.

O valor encontrado é em cm³ (espermatozoides/cm³). Para transformá-lo o valor em mL foi necessário multiplicá-lo por 1000 (espermatozoides/mL).

3.4. Congelamento de sêmen

Após a diluição, o sêmen foi envasado em palhetas (IMV^{®3}) de 0,25 mL com concentração final de 50 x 10⁶ espermatozoides viáveis/paleta. As palhetas foram colocadas em um tubo de ensaio de vidro (15 mL), hermeticamente fechado. Posteriormente, o tubo de ensaio foi colocado no interior de um tubo plástico (240 mL) contendo 120 mL de álcool absoluto, ambos mantidos à temperatura ambiente (24 °C), e levado ao interior de uma geladeira, à temperatura de cinco °C, por três horas, seguindo a curva de resfriamento (45 min) e tempo de equilíbrio de duas horas e 15 min.

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido (- 108 °C), colocando-se as palhetas, em uma plataforma telada cinco cm acima da lâmina de nitrogênio líquido por 15 min. Após este período, as palhetas foram mergulhadas no

nitrogênio líquido. A seguir as palhetas foram acondicionadas em raques, e armazenadas em botijão criogênico, para posteriores análises *in vitro*.

3.5. Avaliação *in vitro* da viabilidade espermática

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C, por 30 segundos, acondicionadas em microtubos plásticos de 1,5 mL e homogeneizadas. Em seguida, análises de motilidade progressiva e vigor espermático, foram realizadas por meio de microscopia de contraste de fase, em aumento de 200 X (CBRA, 2013).

3.6. Teste de Termorresistência (TTR)

Uma amostra de sêmen de cada partida, após o descongelamento, foi submetida ao teste de termorresistência (TTR) para avaliação de sua motilidade após o estresse térmico. A motilidade progressiva retilínea e o vigor espermático foram avaliados nos tempos zero, 30, 60, 120 e 180 min de incubação em banho-maria a 37 °C (VOGLER et al., 1991). Tal procedimento se deu em função do valor de referência (motilidade ≥ 30 e vigor \geq dois) para liberação de sêmen criopreservado para utilização em programas de inseminação artificial (CBRA, 1998).

3.7. Citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo das amostras foi realizada no Núcleo de Microscopia e Microanálises da UFV em aparelho BD FACSVerser TM⁴, equipado com laser de argônio (azul – 488 nm de emissão com 20 mW de potência), laser UV (vermelho – 640 nm de emissão com 40 mW de potência) e filtros A (Long Pass 507 nm / Band Pass 527/32 nm), B (LP 560 nm / BP 568/42 nm), C (LP 665 nm / BP 700/54 nm), D (LP 752 nm / BP 783/56 nm), E (LP 660 nm / BP 660/10 nm) e F (LP 752 nm / BP 783/56 nm).

Para o ajuste do aparelho, foram utilizadas amostras de sêmen fresco de bodes com fertilidade comprovada, diluídas em PBS na concentração de cinco x 10⁶ espermatozoides/mL. As partículas não espermáticas (debris) detectadas foram eliminadas, efetuando uma triagem sobre a população de interesse.

Partículas com características de dispersão semelhantes às dos espermatozoides, mas sem conteúdo de DNA suficiente para análise também foram excluídas.

As amostras foram primeiramente analisadas sem corantes, para que assim determinasse o local específico onde se localizava a população espermática, sendo este estipulado como padrão para análise. Em seguida, as amostras foram coradas com as sondas fluorescentes de forma a identificar os espermatozoides marcados.

Os testes foram repetidos até a obtenção de resultados coerentes com a viabilidade previamente conhecida do sêmen utilizado e, com isso, o melhor ajuste (compensação) obtido para cada sonda foi estipulado como padrão.

3.7.1. Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular (DCFDA/IP)

A produção de peróxido de hidrogênio intracelular foi avaliada mediante a utilização do fluoróforo diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFDA), que, ao penetrar na célula é oxidado pelo peróxido de hidrogênio intracelular emitindo fluorescência verde.

Para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular, foi seguido o protocolo proposto por Macías-García *et al.* (2012a). Uma alíquota de 500 μL da amostra diluída em meio PBS (5×10^6 sptz/mL) foi adicionada a um microtubo (dois mL) aquecido em banho maria a 37 °C, e corada com 0,5 μL DCFDA⁵ (um mg/mL (um mg/mL; anexo B) durante 30 min. Após esse período, 150 μL da amostra incubada retirada e corada com três μL de IP, permanecendo incubada por mais cinco minutos. Foram então adicionados 150 μL de PBS e destinado a leitura no citômetro de fluxo. Foram contabilizadas 20.000 células, numa taxa de 400 células/segundo, com os filtros A (DCFDA oxidado) e C (IP, células não viáveis) e excitação de 488 nm.

Foram observadas quatro populações celulares: LL, células com membrana plasmática íntegra sem peróxido de hidrogênio intracelular; UL, células com membrana plasmática lesionada sem peróxido de hidrogênio intracelular; UR, células com membrana plasmática lesionada e com peróxido de hidrogênio intracelular; LR, células com membrana plasmática íntegra e com peróxido de hidrogênio intracelular (figura 2a).

A fim de quantificar a concentração de peróxido de hidrogênio intracelular, foi realizada análise do histograma quanto à média de emissão do

fluoróforo DCFDA pelas células de membrana plasmática íntegra captada no filtro A em relação a essa população (figura 2b).

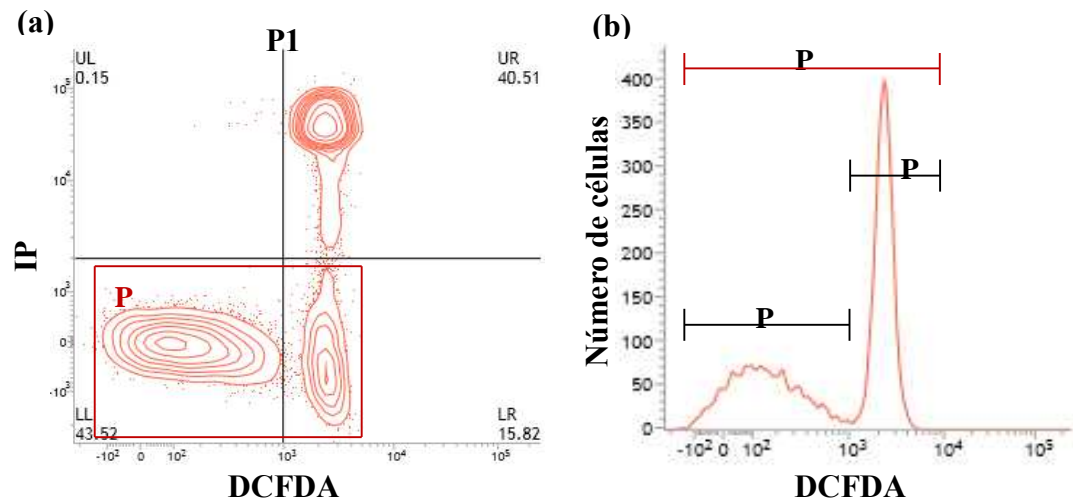


Figura 2: (a) Gráfico de contorno (contour plot) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com IP e DCFDA, permitindo a classificação de espermatozoides em quatro categorias: LL, células com membrana plasmática íntegra sem peróxido de hidrogênio intracelular; UL, células com membrana plasmática lesionada sem peróxido de hidrogênio intracelular; UR, células com membrana plasmática lesionada e com peróxido de hidrogênio intracelular; LR, células com membrana plasmática íntegra e com peróxido de hidrogênio intracelular. (b) Histograma da população de células com membrana plasmática íntegra (P2) analisada quanto à distribuição da fluorescência emitida pelo DCFDA: P3, células com peróxido de hidrogênio intracelular; P4, células sem peróxido de hidrogênio intracelular.

3.7.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (IP/FITC-PSA)

A integridade da membrana plasmática espermática foi avaliada por meio da sonda iodeto de propídeo (IP), sonda impermeável à membrana, que cora o núcleo celular em vermelho quando a mesma encontra-se lesionada (MATYUS *et al.*, 1984). Para avaliação da integridade acrossomal foi utilizada a aglutinina *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITCPSA), sonda incapaz de penetrar a membrana acrossomal intacta, corando em verde somente aqueles espermatozoides reagidos ou com acrossoma lesionado (CROSS *et al.*, 1986) ao se ligar em moléculas de α -manose dispostas na matriz acrossomal (CELEGHINI *et al.*, 2007).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossoma adotou-se o protocolo proposto por Oliveira *et al.* (2012) modificado. Uma alíquota de 150 μL de sêmen diluído em PBS⁶ (5×10^6 spz/mL) foi incubada com 10 μL de FITC-PSA⁷ (100 $\mu\text{g/mL}$; anexo B) e 3 μL de IP⁸ (0,5 mg/mL; anexo B) em microtubos plásticos (2 mL) dispostos em banho maria a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 μL de PBS e realizada a leitura no aparelho. Todas as amostras continham 10.000 células analisadas, numa taxa de aproximadamente 200 células/segundo, nos filtros A (FITC-PSA, lesão acrossomal) e C (IP, lesão de membrana plasmática) e excitação de 488 nm.

Foi possível a observação de quatro categorias celulares, de acordo com as combinações de lesão de membrana plasmática e de acrossoma: (LL), células com membrana plasmática e acrossomal íntegras; (UL), células com membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro; (UR), células com lesão de membrana e acrossomal; LR, células com membrana plasmática íntegra e acrossoma lesionado (figura 3).

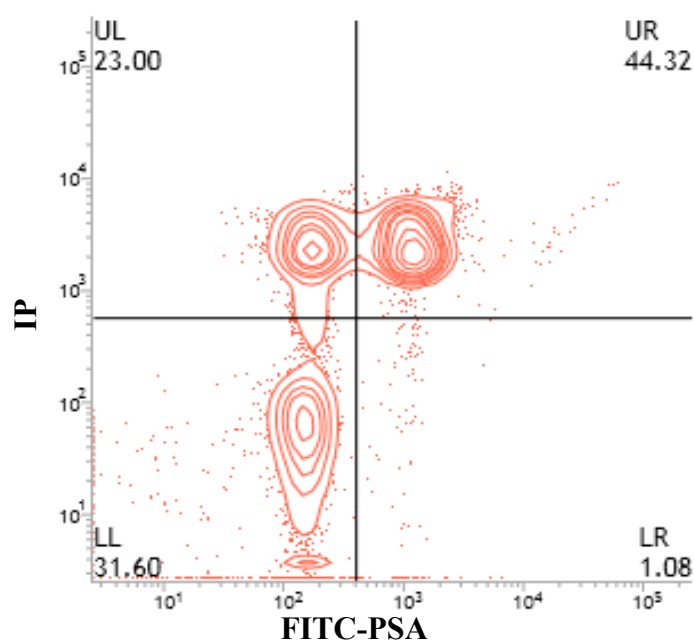


Figura 3: Gráfico de contorno (contour plot) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com IP e FITC-PSA, permitindo a classificação de espermatozoides em quatro categorias: LL, células com membrana plasmática e acrossomal íntegras; UL, células com membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro; UR, células com lesão de membrana e acrossomal; LR, células com membrana plasmática íntegra e acrossoma lesionado.

3.7.3. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1)

O potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) espermático foi avaliado mediante a utilização da sonda fluorescente JC-1⁹ (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina). Essa sonda é um fluorocromo lipofílico que se acumula na mitocôndria de acordo com seu potencial de membrana. A fluorescência verde é característica da forma monomérica, que se acumula somente na mitocôndria despolarizada, com baixo potencial transmembrana ($\Delta\Psi_m < 80-100$ mV). Quando o $\Delta\Psi_m$ encontra-se acima de 80-100 mV, a fluorescência é emitida em laranja, em função da formação dos agregados de JC-1 na mitocôndria polarizada (FRACKZEK et al., 2012).

A análise do potencial mitocondrial foi determinada de acordo com protocolo proposto por Ortega-Ferrusola et al. (2010) modificado. Uma alíquota de 500 μ L de cada amostra previamente diluída em meio PBS (5×10^6 spz/mL) foi incubada com 0,5 μ L JC-1 (153 μ M) por 40 minutos em banho maria a 37 °C. Após esse período a amostra foi destinada à leitura no aparelho.

Foram analisadas 30.000 células por amostra, em uma taxa de aproximadamente 200 células/segundo, com os filtros A (JC-1 monômeros) e B (JC-1 agregados) e excitação de 488 nm.

Foi possível a classificação das células em três categorias: com alto, médio e baixo potencial mitocondrial. Para fins de análise estatística, foi considerado o somatório das células com potencial mitocondrial alto e baixo (figura 4).

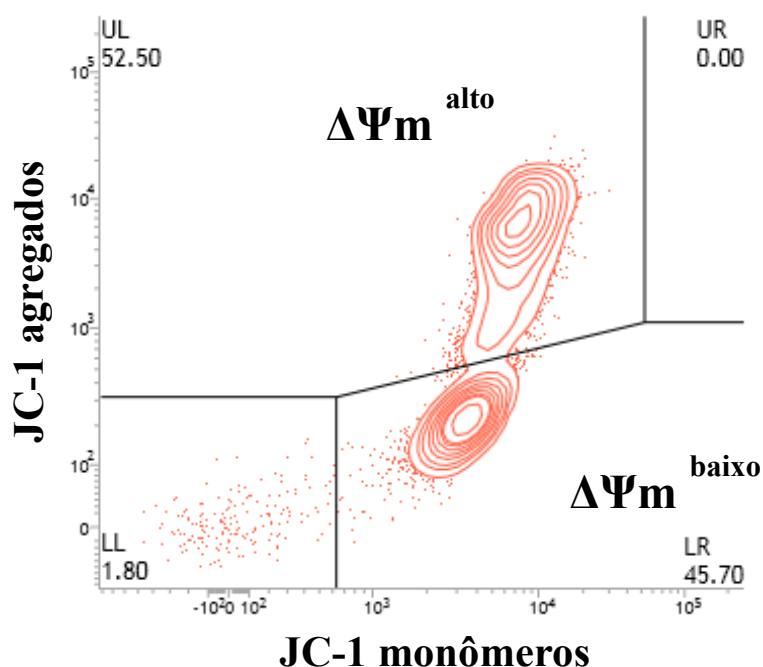


Figura 4: Gráfico de contorno (contour plot) gerado pela análise do sêmen caprino por citometria de fluxo, em amostra corada com JC-1, permitindo a classificação de espermatozoides com alto potencial mitocondrial (UR, $\Delta\Psi_m^{\text{alto}}$) e baixo potencial mitocondrial (LR, $\Delta\Psi_m^{\text{baixo}}$).

3.8. Análises Estatísticas

Para a análise dos dados foi utilizado o software *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas (*split plot*), sendo a raça considerada o fator primário e as concentrações de melatonina o fator secundário, de acordo com o modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + R_i + e(R)_i + T_j + (RT)_{ij} + e(T)_j$$

Y_{ij} = resposta observada;

μ = constante geral;

R_i = efeito referente à raça;

$e(R)_i$ = erro aleatório referente ao efeito da raça;

T_j = efeito referente ao tratamento (concentrações de melatonina);

$(RT)_{ij}$ = efeito de interação da raça e tratamento;

$e(T)_j$ = erro aleatório referente ao efeito de tratamento.

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Para

comparação dos diversos parâmetros, entre os tratamentos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) associada ao teste de Tukey. As variáveis qualitativas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi 5% ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sêmen Fresco

As características de todos ejaculados obtidos durante o período experimental apresentaram-se dentro dos padrões preconizados pelo CBRA (2013) para o congelamento de sêmen caprino comercial (tabela 1).

Tabela 1: Médias \pm erros padrão da motilidade e vigor espermático total de amostras de sêmen caprino fresco

Animal	Raça	Motilidade (%)	Vigor (1-5)
Animal 1	Alpina	78.57 \pm 3.40 ^a	3.86 \pm 0.26 ^a
Animal 2	Saanen	82.86 \pm 2.86 ^a	3.86 \pm 0.14 ^a
Animal 3	Alpina	80.00 \pm 3.09 ^a	4.00 \pm 0.22 ^a
Animal 4	Saanen	85.71 \pm 2.02 ^a	4.14 \pm 0.14 ^a

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).

4.2. Teste de termorresistência (TTR)

Os tratamentos que utilizaram concentrações de melatonina igual ou superior a dois mM apresentaram quedas significativas em relação ao controle para os parâmetros de motilidade e vigor (Tabela 2 e 3). Além do estresse oxidativo inerente à criopreservação (HARRISON & VICKERS, 1990), sugere-se um efeito citotóxico da melatonina em elevas concentrações.

Esses resultados, entretanto, são mais evidentes ao comparar as médias obtidas de motilidade espermática registradas no tempo zero e 30 minutos de incubação à 37 °C pós descongelamento (tabela 2). Sendo que, após esse período, as médias registradas de todos os tratamentos revelaram motilidade abaixo de 30 % (tabela 2), sugerindo que as amostras não atingiram os parâmetros mínimos preconizados pelo CBRA (2008) ao término do TTR.

Tabela 2: Médias \pm erros padrão da motilidade espermática total de amostras de sêmen caprino congelado com diferentes concentrações de melatonina e avaliado pelo teste de termorresistência em intervalos de 30 minutos após descongelamento

Trat	0	1 μ M	1mM	2mM	3mM	4mM
Mot 0	43.57 \pm 1.72 ^a	43.21 \pm 1.93 ^a	38.21 \pm 1.55 ^{ab}	35.36 \pm 1.50 ^{bc}	34.29 \pm 1.40 ^{bc}	30.00 \pm 1.63 ^c
Mot 30'	32.86 \pm 2.17 ^a	32.86 \pm 2.99 ^a	30.18 \pm 2.16 ^{ab}	25.36 \pm 2.38 ^{ab}	21.79 \pm 2.29 ^{bc}	20.18 \pm 2.13 ^c
Mot 60'	26.43 \pm 2.31 ^a	22.86 \pm 2.46 ^{ab}	21.43 \pm 2.09 ^{ab}	20.00 \pm 2.30 ^{ab}	15.89 \pm 2.21 ^{bc}	13.21 \pm 1.75 ^c
Mot 90'	20.00 \pm 2.12 ^a	15.54 \pm 2.05 ^{ab}	17.32 \pm 2.00 ^{ab}	13.93 \pm 1.81 ^{ab}	11.79 \pm 1.98 ^b	10.18 \pm 1.68 ^b
Mot 120'	13.21 \pm 2.03 ^a	10.00 \pm 1.82 ^a	11.07 \pm 1.79 ^a	10.89 \pm 1.76 ^a	8.04 \pm 1.6 ^a	8.57 \pm 1.41 ^a
Mot 150'	10.54 \pm 1.73 ^a	8.57 \pm 1.70 ^{ab}	7.68 \pm 1.35 ^{ab}	7.32 \pm 1.53 ^{ab}	4.64 \pm 1.12 ^b	5.89 \pm 1.26 ^{ab}
Mot 180'	8.21 \pm 1.55 ^a	7.14 \pm 1.57 ^{ab}	6.43 \pm 1.20 ^{ab}	5.54 \pm 1.19 ^{ab}	3.39 \pm 0.93 ^b	3.93 \pm 1.27 ^{ab}

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 3: Médias \pm erros padrão do vigor espermático total de amostras de sêmen caprino congelado com diferentes concentrações de melatonina e avaliado pelo teste de termorresistência em intervalos de 30 minutos após descongelamento

Trat	0	1 μ M	1mM	2mM	3mM	4mM
Vigor 0	3.46 \pm 0.11 ^a	3.46 \pm 0.11 ^a	3.25 \pm 0.10 ^{ab}	3.11 \pm 0.09 ^b	3.04 \pm 0.10 ^b	3.04 \pm 0.08 ^b
Vigor 30'	3.04 \pm 0.16 ^a	2.75 \pm 0.23 ^{ab}	3.00 \pm 0.18 ^a	2.54 \pm 0.20 ^b	2.50 \pm 0.19 ^b	2.61 \pm 0.17 ^b
Vigor 60'	2.57 \pm 0.20 ^a	2.25 \pm 0.20 ^{ab}	2.50 \pm 0.17 ^a	2.18 \pm 0.19 ^{ab}	1.93 \pm 0.18 ^b	1.93 \pm 0.18 ^b
Vigor 90'	2.21 \pm 0.19 ^a	1.89 \pm 0.21 ^{ab}	2.07 \pm 0.18 ^a	1.89 \pm 0.19 ^{ab}	1.46 \pm 0.20 ^b	1.57 \pm 0.15 ^b
Vigor 120	1.79 \pm 0.20 ^a	1.43 \pm 0.19 ^{ab}	1.54 \pm 0.19 ^{ab}	1.64 \pm 0.16 ^{ab}	1.18 \pm 0.19 ^b	1.50 \pm 0.15 ^{ab}
Vigor 150	1.43 \pm 0.17 ^a	1.32 \pm 0.19 ^{ab}	1.21 \pm 0.18 ^{ab}	1.11 \pm 0.17 ^{ab}	0.86 \pm 0.18 ^b	1.07 \pm 0.16 ^{ab}
Vigor 180	1.21 \pm 0.17 ^a	1.00 \pm 0.18 ^{ab}	1.04 \pm 0.17 ^{ab}	1.00 \pm 0.17 ^{ab}	0.61 \pm 0.15 ^b	0.68 \pm 0.15 ^b

Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis (p<0,05).

4.3. Citometria de fluxo

As análises de sêmen por testes complementares foram associadas à técnica de citometria de fluxo e sondas fluorescentes que avaliaram a viabilidade espermática, produção de peróxido de hidrogênio, status acrossomal, e potencial mitocondrial, de modo a comparar os efeitos antioxidantes da melatonina em relação aos danos físicos ou morfofuncionais provocados aos espermatozoides submetidos à criopreservação.

4.3.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e presença de peróxido de hidrogênio intracelular

Houve interação ($P < 0.05$) de tratamento e raça somente quanto à população de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e presença de peróxido de hidrogênio intracelular. O estudo apresentou diferença ($P < 0.05$) entre as raças somente para o tratamento controle, fato não observado entre os demais tratamentos e que possivelmente pode estar relacionado ao efeito antioxidante da melatonina (tabela 4). A partir da concentração de melatonina de dois mM, foi observada na raça Alpina queda significativa em relação ao controle, sendo o mesmo não verificado para raça Saanen (tabela 4). Sendo assim, acredita-se que as alterações encontradas na raça Alpina, são devido a uma maior sensibilidade desta raça em relação à exacerbada ação antioxidante (CARVALHO *et al.*, 2002, LAMIRANDE *et al.*, 1997; SANOCKA & KURPISZ, 2004) ou efeitos citotóxicos da melatonina.

Tabela 4. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio e viabilidade espermática em amostras de sêmen caprino congelado na raça Alpina e Saanen, avaliadas por citometria de fluxo

Tratamento	ALPINA Membrana Íntegra Com H₂O₂	SAANEN Membrana Íntegra Com H₂O₂
0	35.38 \pm 3.71 ^{a1}	23.24 \pm 4.03 ^{a2}
1μM	31.74 \pm 4.29 ^{ab1}	23.40 \pm 4.28 ^{a1}
1mM	29.00 \pm 3.69 ^{abc1}	21.06 \pm 3.75 ^{a1}
2mM	23.59 \pm 2.76 ^{bcd1}	22.17 \pm 3.59 ^{a1}
3mM	20.59 \pm 3.95 ^{cd1}	16.28 \pm 3.70 ^{a1}
4mM	15.17 \pm 2.82 ^{d1}	14.57 \pm 2.64 ^{a1}

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).
Números diferentes sobre as médias dentro da mesma linha indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).

Apesar de apresentar um alto valor de média, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos quanto à população de espermatozoides com presença de peróxido de hidrogênio intracelular (tabela 5). Quando a concentração de melatonina excedeu o valor de dois mM no diluente, foi verificado um decréscimo significativo para população espermática com membrana plasmática íntegra (tabela 5). A melatonina não comprometeu a integridade da membrana, inibindo assim excessivamente a síntese das ROS e impossibilitando o desempenho das funções fisiológicas dos espermatozoides (CARVALHO *et al.*, 2002, LAMIRANDE *et al.*, 1997; SANOCKA & KURPISZ, 2004); mas sim devido às possíveis alterações de osmolaridade e/ ou efeitos citotóxicos do antioxidante nestas concentrações.

Tabela 5. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção ou não de peróxido de hidrogênio e viabilidade espermática, em amostras de sêmen caprino criopreservado em diferentes concentrações de melatonina, avaliadas por citometria de fluxo

Tratamento	Com H ₂ O ₂	Membrana Íntegra
0	94.43 \pm 1.44 ^a	34.18 \pm 2.57 ^a
1 μ M	94.12 \pm 1.25 ^a	32.73 \pm 2.51 ^a
1mM	94.48 \pm 1.74 ^a	29.90 \pm 2.47 ^a
2mM	93.51 \pm 2.02 ^a	28.75 \pm 2.17 ^{ab}
3mM	94.23 \pm 1.59 ^a	23.62 \pm 2.45 ^{bc}
4mM	94.76 \pm 1.41 ^a	19.48 \pm 1.78 ^c

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).

Tabela 6. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio e viabilidade da membrana plasmática, em amostras de sêmen caprino criopreservado em diferentes concentrações de melatonina, avaliadas por citometria de fluxo

T	Membrana Lesionada Sem H ₂ O ₂	Membrana Lesionada Com H ₂ O ₂	Membrana Íntegra Com H ₂ O ₂
0	0.69 \pm 0.05 ^a	65.12 \pm 2.56 ^c	4.87 \pm 1.45 ^a
1 μ M	0.72 \pm 0.06 ^a	66.55 \pm 2.51 ^c	5.15 \pm 1.26 ^a
1mM	0.65 \pm 0.05 ^a	69.45 \pm 2.47 ^c	4.87 \pm 1.75 ^a
2mM	0.63 \pm 0.04 ^a	70.62 \pm 2.15 ^{bc}	5.86 \pm 2.04 ^a
3mM	0.59 \pm 0.07 ^a	75.79 \pm 2.43 ^{ab}	5.18 \pm 1.59 ^a
4mM	0.63 \pm 0.07 ^a	79.89 \pm 1.76 ^a	4.61 \pm 1.42 ^a

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

T: tratamentos.

Quando a concentração de melatonina excedeu o valor de dois mM (tabela 6) foi observado um alto percentual de espermatozoides com membrana plasmática lesionada, aliado à presença de peróxido de hidrogênio intracelular nestas concentrações não apresentou a ação antioxidante esperada (SUCCU *et al.*, 2011; REITER *et al.*, 2013), mas sim efeitos citotóxicos aos espermatozoides.

4.3.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal

Em relação à integridade da membrana plasmática e acrossomal, houve interação ($P < 0.05$) de tratamento e raça quanto às populações espermáticas com membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro; membrana plasmática lesionada e acrossoma lesionado; acrossoma íntegro; e acrossoma lesionado (tabelas 7, 8 e 9).

A população espermática com membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro apresentou uma queda ($P < 0.05$) para raça Alpina em relação ao controle a partir da concentração de melatonina de três mM, sendo o mesmo não verificado para raça Saanen (Tabela 7). O ocorrido pode estar relacionado à maior taxa metabólica dos espermatozoides na raça Alpina, que consequentemente possuem maior capacidade de síntese de ROS; aliado ao efeito citotóxico da melatonina a partir de três mM, que induz a capacitação espermática (LAMIRANDE & O'FLAHERT, 2008) e reação acrossomal precoce (CASAO *et al.*, 2010c; SILVA *et al.*, 2011; REITER *et al.*, 2013), causando lesões as membranas espermáticas.

Tabela 7. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas com membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro em espermatozoides criopreservados de caprinos das raças Alpina e Saanen, avaliadas por citometria de fluxo

Tratamento	ALPINA	SAANEN
	Membrana Lesionada Acrossoma Íntegro	Membrana Lesionada Acrossoma Íntegro
0	31.51 \pm 2.00 ^{a1}	23.36 \pm 4.33 ^{a1}
1 μ M	29.37 \pm 2.08 ^{a1}	24.68 \pm 5.51 ^{a1}
1mM	31.35 \pm 2.51 ^{a1}	23.20 \pm 4.94 ^{a1}
2mM	23.30 \pm 2.37 ^{ab1}	22.91 \pm 4.50 ^{a1}
3mM	16.36 \pm 3.30 ^{b1}	22.79 \pm 3.80 ^{a1}
4mM	14.24 \pm 3.83 ^{b1}	20.52 \pm 3.08 ^{a1}

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).
Números diferentes sobre as médias dentro da mesma linha indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).

A população espermática com membrana plasmática lesionada e acrossoma lesionado apresentou para as raças Alpina e Saanen um aumento ($P < 0.05$) em relação ao controle a partir da concentração de melatonina de dois mM. (Tabela 8). Diante do achado, sugere-se que as alterações observadas podem ser consequências do efeito citotóxico de altas concentrações de melatonina que diminui seu efeito antioxidante, induz a capacitação e reação acrossomal precoce (LAMIRANDE & O'FLAHERT, 2008).

Tabela 8. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas com membrana plasmática e acrossomal lesionada em espermatozoides criopreservados de caprinos das raças Alpina e Saanen, avaliadas por citometria de fluxo

Tratamento	ALPINA	SAANEN
	Membrana Lesionada Acrossoma Lesionado	Membrana Lesionada Acrossoma Lesionado
0	36.57 \pm 3.72 ^{c1}	35.58 \pm 2.54 ^{b1}
1 μ M	43.28 \pm 5.18 ^{c1}	35.54 \pm 3.61 ^{b1}
1mM	44.62 \pm 5.15 ^{bc1}	40.19 \pm 3.49 ^{b1}
2mM	54.15 \pm 5.92 ^{b1}	41.54 \pm 4.25 ^{ab2}
3mM	64.68 \pm 7.29 ^{a1}	45.30 \pm 5.25 ^{ab2}
4mM	69.66 \pm 6.99 ^{a1}	51.62 \pm 4.62 ^{a2}

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).
Números diferentes sobre as médias dentro da mesma linha indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).

Em relação à integridade da membrana acrossomal, a raça Alpina apresentou queda significativa em relação ao controle a partir da concentração de melatonina de um mM, já para raça Saanen verificou-se diferença significativa somente no tratamento de concentração de melatonina (quatro mM). Tal achado reforça a idéia anterior de que a raça Alpina apresente um maior metabolismo espermático e tenha sofrido as consequências de uma reação acrossomal precoce, que lesiona as membranas espermáticas.

Ainda em relação à integridade da membrana acrossomal, o estudo apresentou diferença significativa entre a raça Alpina e Saanen somente para aqueles tratamentos que utilizaram concentrações de melatonina igual ou superior a dois mM (Tabela 9).

Tabela 9. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas com membrana acrossomal íntegra avaliadas em espermatozoides criopreservados de caprinos das raças Alpina e Saanen, avaliadas por citometria de fluxo

Tratamento	ALPINA Acrossoma Íntegro	SAANEN Acrossoma Íntegro
0	63.11 \pm 3.66 ^{c1}	63.82 \pm 2.55 ^{b1}
1 μ M	56.42 \pm 5.16 ^{c1}	63.92 \pm 3.61 ^{b1}
1mM	55.07 \pm 5.10 ^{bc1}	59.25 \pm 3.48 ^{b1}
2mM	45.61 \pm 5.88 ^{b1}	57.93 \pm 4.26 ^{ab2}
3mM	35.02 \pm 7.27 ^{a1}	54.24 \pm 5.24 ^{ab2}
4mM	30.13 \pm 6.93 ^{a1}	47.84 \pm 4.60 ^{a2}

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).
Números diferentes sobre as médias dentro da mesma linha indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).

Não foi encontrada diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos para as porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma lesionado (tabela 10). Sendo assim, o baixo valor de média encontrado para esta população espermática, reforça a teoria de que geralmente as lesões no acrossoma são acompanhadas de lesões na membrana plasmática. (SILVA *et al.*, 2011; REITER *et al.*, 2013).

Tabela 10. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas com membrana plasmática íntegra e presença ou não de lesão acrossomal em espermatozoides de caprinos criopreservados, avaliadas por citometria de fluxo

Tratamento	Membrana Íntegra Acrossoma Lesionado	Membrana Íntegra Acrossoma Íntegro
0	0.46 \pm 0.08 ^a	36.03 \pm 2.84 ^a
1 μ M	0.42 \pm 0.05 ^a	33.14 \pm 3.46 ^{ab}
1mM	0.44 \pm 0.05 ^a	29.89 \pm 3.07 ^{bc}
2mM	0.38 \pm 0.05 ^a	28.67 \pm 3.03 ^{bc}
3mM	0.38 \pm 0.05 ^a	25.05 \pm 3.18 ^{cd}
4mM	0.38 \pm 0.05 ^a	21.60 \pm 2.65 ^d

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).

As populações de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras (tabela 10) e espermatozoides com membrana plasmática íntegra (tabela 11), apresentaram queda significativa ($P < 0.05$) em relação ao controle quando a concentração de melatonina excedeu o valor de um mM. Sendo assim, sugere-se que a melatonina a partir de um mM, não apresente o esperado efeito antioxidante em prevenir o estresse oxidativo, mas sim que provoque efeitos citotóxicos capazes de induzir a capacitação e reação acrossomal precoce.

Tabela 11. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à integridade de membrana plasmática avaliadas em espermatozoides criopreservados de caprinos por citometria de fluxo

Tratamento	Membrana Íntegra
0	36.49 \pm 2.86 ^d
1 μ M	33.56 \pm 3.48 ^{cd}
1mM	30.32 \pm 3.10 ^{bc}
2mM	29.05 \pm 3.05 ^{bc}
3mM	25.43 \pm 3.20 ^{ab}
4mM	21.98 \pm 2.68 ^a

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$).

4.3.3. Avaliação do potencial mitocondrial

Houve interação ($P < 0.05$) de raça e tratamento para população de espermatozoides com alto potencial de atividade mitocondrial. A raça Alpina apresentou queda ($P < 0.05$) em relação ao controle quando a concentração de melatonina excedeu valores de dois mM no diluente (Tabela 12), provavelmente devido ao efeito citotóxico da melatonina nestas concentrações.

Foi observada diferença significativa entre as raças para todos os tratamentos, exceto o tratamento 4mM de melatonina (Tabela 12), demonstrando que, a maior taxa metabólica associada a uma alta atividade mitocondrial, confere maior resistência espermática para raça Alpina no tempo de incubação de 40 minutos com a sonda JC-1.

Tabela 12. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à alta atividade mitocondrial avaliadas em espermatozoides criopreservados de caprinos das raças Alpina e Saanen, avaliadas por citometria de fluxo

Tratamento	Potencial de atividade mitocondrial alto (JC-1 alto)	Potencial de atividade mitocondrial alto (JC-1 alto)
	ALPINA	SAANEN
0	30.64 \pm 4.42 ^{a1}	10.84 \pm 3.67 ^{a2}
1 μ M	29.25 \pm 4.88 ^{ab1}	13.91 \pm 4.71 ^{a2}
1mM	27.74 \pm 3.42 ^{ab1}	12.00 \pm 4.43 ^{a2}
2mM	22.10 \pm 3.85 ^{abc1}	11.38 \pm 2.98 ^{a2}
3mM	20.34 \pm 4.01 ^{bc1}	8.77 \pm 3.35 ^{a2}
4mM	12.91 \pm 2.83 ^{c1}	6.83 \pm 1.67 ^{a1}

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$). Números diferentes sobre as médias dentro da mesma linha indicam diferença significativa à ($p < 0,05$). JC1 alto, espermatozoides com alto potencial mitocondrial.

O potencial de atividade mitocondrial se manteve baixo em todos os tratamentos (75.55 a 87.79 %; tabela 18). A maior porcentagem de células apresentando baixo potencial mitocondrial observado entre os tratamentos com três e quatro mM de melatonina (83.07 e 87.79; respectivamente; tabela 13) é indicativa da menor taxa metabólica dos espermatozoides congelados com a melatonina em elevadas concentrações, o que é refletido pela menor motilidade (34.29 – 34.29 %; tabela 2) e a baixa proporção de células com membrana plasmática íntegra com de peróxido de hidrogênio intracelular (Alpina 20.59 – 15.17 % e Saanen 16.28 – 14.57 % respectivamente; tabela 4). Isso se deve à alta sensibilidade mitocondrial ao choque osmótico, conforme demonstrado em outras espécies (MACIAS *et al.*, 2011; FREITAS, 2015). Diante do contexto, o achado parece estar relacionado à alta proporção de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionadas (tabela 8) e a baixa proporção de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras (tabela 10) avaliadas no estudo.

Tabela 13. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à média atividade mitocondrial avaliadas em espermatozoides criopreservados de caprinos por citometria de fluxo

Tratamento	Potencial de atividade
	mitocondrial baixo (JC-1 baixo)
0	75.55 \pm 2.85 ^c
1 μ M	75.49 \pm 3.15 ^c
1mM	76.81 \pm 2.85 ^c
2mM	80.58 \pm 2.36 ^{bc}
3mM	83.07 \pm 2.48 ^{ab}
4mM	87.79 \pm 1.53 ^a

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$). JC1 médio, espermatozoides com médio potencial mitocondrial.

O estudo apresentou diferenças ($P < 0.05$) entre a raça Alpina e Saanen para característica potencial de atividade mitocondrial baixo. Sendo que, a raça Saanen apresentou um maior valor de média para baixo potencial mitocondrial, sugerindo então, que esta raça apresente uma menor resistência durante o tempo de incubação com a sonda JC-1 (tabela 14).

Tabela 14. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à baixa atividade mitocondrial avaliadas em espermatozoides criopreservados de caprinos das raças Alpina e Saanen, avaliadas por citometria de fluxo

Raça	Potencial de atividade
	mitocondrial baixo (JC-1 baixo)
Alpina	73.93 \pm 1.54 ^b
Saanen	85.84 \pm 1.28 ^a

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa à ($p < 0,05$). JC1 médio, espermatozoides com médio potencial mitocondrial.

5. CONCLUSÕES

Conclui-se que, a adição de melatonina na concentração de um μM manteve a viabilidade espermática *in vitro*, de forma que não afetou nenhum dos parâmetros avaliados neste estudo, apesar de não apresentar resultados superiores ao controle. Os resultados obtidos quanto à adição de melatonina não apresentaram o efeito antioxidante esperado, e quando adicionado em elevadas concentrações, apresentou resultados insatisfatórios, sendo assim necessários novos estudos quanto à concentração ideal e seus possíveis efeitos na criopreservação do sêmen caprino.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOAGLA, E.M.F., TEREDA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology** 62: 1160 – 1172. 2004.

AISEN, E. G. Reprodução ovina e caprina. São Paulo: **MedVet**, v.1, 203, 2008.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; HEDGES, A.; MCLACHLAN, R. I. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2415–2426. 2010.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, 1. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, cap. 80,p. 715-745, 1993.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Sci.** V. 7: 3, p 145 – 173, 1987.

ANDRABI S. M. H. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. Mini review. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 9, p. 367-369. 2007.

ARRUDA, R.P., CELEGHINI, E.C.C., ALONSO, M.A., CARVALHO, H.F., OLIVEIRA, L.Z., NASCIMENTO, J., SILVA, D.F., AFFONSO, F.J., LEMES, K.M, JAIMES, J.D. 2011. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 35(2): 145-151.

BALL, B. A. Oxidative stress in sperm. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. (Eds) **Equine Reproduction**. 2a ed.Wiley Blackwell, 2011. p. 991-995.

BANSAL, A.K; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

BARBOSA, O. R.; TUTIDA, L.; HUBLER, M. R. N. O.; AKIMOTO, L. S.; MORAES, G. V. Influência das estações do ano nas concentrações séricas de 3,5,3' triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e testosterona (Tes) de carneiros. **Acta Scientiarum**, v.21, n.3, p.599-605, 1999.

BARIL, G., CHEMINEAU, P., COGNIE, Y., GUÉRIN, Y., LEBOEUF, B., ORGEUR, P., VALLET, J.C. 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. **Étude FAO production et santé animales. France.**

BATISTA, A.M., GUERRA MMP. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Rev Bras Reprod Anim**, v.34, n.3, p.125-132, 2010.

BENITEZ-KING, G.; ANTON-TAY, F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. **Experientia**, v.49, p.35–41, 1993.

BLOM, E. The ultra-structure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordic Veterinary Medicine*, v.25, p.383-391, 1973.

BUSTAMANTE FILHO, I. C.; PEDERZOLLI, A. M.; SGARAVATTI, A. M.; MATTOS, R. C.; DUTRA FILHO, C. S.; JOBIM, M. I. M. Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 70-73. 2006.

CASAO, A.; MENDOZA, N.; PEREZ-PE, R.; GRASA, P.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F., et al. (2010). Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. **J. Pineal Res**, 48(1), 39-46.

CASAO, A.; MENDOZA, N.; PÉREZ-PÉ, R.; GRASA, P.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. **Journal of Pineal Research**, v.48, p.39–46, 2010c.

CASTILHO, E. F. Uso da própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. 2008, 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa-MG, 2008.

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p. 33-38. 2002.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: **CBRA**, 104p, 2013.

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

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488. 2007.

CHEMINEAU, P. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. **Reproduction Nutrition Development**, Paris v. 26, n. 2A, p. 453-460, 1986.

COOTER, P. Z.; GOOLSBY, H. A.; PRIEN, S. D. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 98-99. 2005.

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

DAS, K.K.; RAJKONWAR, C.K. Acrossosomal changes of Buck spermatozoa after equilibration and freezing in egg yolk citrate glycerol extender. **Indian Vet. Journal**, v. 73, p. 35-40, 1995.

DEKA, B.C.; RAO, A.R. Effect of glycerol level in Tris based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. **Theriogenology**, v.26, n.2, p. 231 – 239, 1985.

DRIJFHOUT, W. J.; VAN DER LINDE, A. G.; KOOL, S. E.; GROL, C. J.; WESTERINK, B. H. C. Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v.66, p.748–755, 1996.

DU PLESSIS, S. S.; HAGENAAR, K.; LAMPIAO, F. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. **Andrologia**, v.42, p.112–116, 2010.

DUTTA, S.; GHOSH, B.B.; BONDYOPADHYAY, S.K. et al. Effect of different extenders, glycerol levels and equilibration times on deep-freezing of Buck semen. **Indian J. Animal Health**, v. 35, p. 35-38, 1996.

ESPINO, J.; BEJARANO, I.; ORTIZ, A.; LOZANO, G. M.; GARCIA, J. F.; PARIENTE, J. A.; RODRIGUEZ, A. B. Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.94, p.1915–1917, 2010.

EVENSON DP, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v.210, p.1131-1133, 1980.

FOULKES J. A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** 49: 277 – 284. 1977.

FRACZEK, M.; PIASECKA, M.; GACZARZEWICZ, D.; SZUMALA-KAKOL, A.; KAZIENKO, A.; LENART, S.; LASZCZYNSKA, M.; KURPISZ, M. Membrane stability and mitochondrial activity of human ejaculated spermatozoa during in vitro experimental infection with *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Bacteroides ureolyticus*. **Andrologia**, v. 44, p. 315–329. 2012.

FREITAS, B.W. **Efeitos de diferentes crioprotetores e aditivos no diluente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça manga-larga marchador**. 2015 114f. Tese

(Doutorado em Medicina Veterinária) Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, MG, 2015.

FUJINOKI, M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. **Reproduction**, v.136, p.533–541, 2008.

GONZALEZ R. A.F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sob parâmetros espermáticos e a integridade de membranas no espermatozoide bovino.** Tese de doutorado, Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2004.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North. Am.:* Equine Practice, v. 12, p. 131-147, 1996.

GUERREIRO, R.I.N. 2002. Caracterização reprodutiva e avaliação da conservação de sémen por um período de 48 horas em diferentes tipos de diluidores em bodes da raça Algarvia. Relatório de estágio: **Licenciatura em Engenharia Zootécnica. Universidade dos Açores.** Angra do Heroísmo.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700-1708. 2012.

HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.** 11: 73 – 88.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Animal Reproduction**, v. 88, p. 343-352. 1990.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p.47 – 58, 2000.

IRITANI, A. J.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg yolk coagulating enzyme in goat semen. **Japanese journal of Zootecnical Science**, v.10 (2), p.57 – 64, 1964.

ITOH, M. T.; ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; AMEMIYA, A.; SUMI, Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**, v.5, p.402–408, 1999.

JOU, M. J.; PENG, T. I.; YU, P. Z.; JOU, S. B.; REITER, R. J.; CHEN, J. Y.; WU, H. Y.; CHEN, C. C.; HSU, L. F. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v.43, p.389–403, 2007.

KAYA, A.; AKSOY, M.; BASPINAR, N.; YILDIZ, C.; ATAMAN, M. B. Effect of melatonin implantation to sperm donor rams on post-thaw viability and acrosomal integrity of sperm cells in the breeding and non-breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, p.211–215, 2001.

KEITH, S.L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Colorado, 1998. 104p. Tese (Master of Science). **Colorado State University**, Fort Collins.

KENNAWAY, D. J.; VOULTSIOS, A. Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.83, n.3, p.1013–1015, 2000.

LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54. 1997.

LAMIRANDE, E.; O'FLAHERT, C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 106-115. 2008.

LEAHY, T.; MARTI, J. I.; MENDOZA, N.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. High pré-freezing dilution improves post-thaw function of RAM spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 137-146, 2010.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.113-141, 2000.

LEON, J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin and mitochondrial function. **Life Sciences**, v.75, p.765–790, 2004.

LI, X. X.; YANG, X. G.; LU, Y. Q.; LU, S. S.; ZHANG, M.; YAO, H. I.; MENG, L. J.; LU, K. H. Protective effects of melatonin against oxidative stress in flow cytometry-sorted buffalo sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.299–307, 2012.

LOOMIS, P. R.; SQUIRES, E. L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491. 2005.

MACÍAS-GARCÍA, B.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; GALLARDO-BOLANOS, J. M.; PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; MORRELL, J. M. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 74-82. 2012a.

MACIAS, G. B.; MIRO, M. A.; GONZALEZ, F. L.; ORTEGA, F. C.; MORILLO, R. A.; GALLARDO BOLANOS, J. M.; BALAO DA SILVA, C. M.; RODRIGUEZ, M. H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic induced stress: role of c-Jun Nterminal kinase (JNKs) pathway. **Journal of Andrology**, v. 33, p. 105-113. 2011.

MAIA, M.S. 2010. Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial em Caprinos e Ovinos. **Governo do Estado do Rio Grande do Norte**,13.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, Oct/Dez, 2009.

MALPAUX, B. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: NEILL, J. D. & KNOBIL, E. (Org.). **Physiology of Reproduction**. 3. ed. London: Elsevier, 2006. Cap.41, p.2231–2281.

MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, p. 80-89, 2006.

MARTIN-HILDAGO, D.; BARÓN, F. J.; BRAGADO, M. J.; CARMONA, P.; ROBINA, A.; GARCÍAMARÍN, L. J.; GIL, M. C. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. **Theriogenology**, v.75, p.1550–1560, 2011.

MARTIN, M.; MACÍAS, M.; LEÓN, J.; ESCAMES, G.; KHALDY, H.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin increases the activity of oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.34, p.348–357, 2002.

MARTIN, M.; MACÍAS, M.; ESCAMES, G.; REITER, R. J.; AGAPITO, M. T.; ORTIZ, G. G.; ACUÑACASTROVIEJO, D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. **Journal of Pineal Research**, v.28, p.242–248, 2000.

MATYUS, L.; SZABO, J. R. G.; RESLI, I.; GASPAR JR, R.; DAMJANOVICH, S. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. **Acta Biochimica et Biophysica Acta**; v. 19, p. 209-214. 1984.

MAXWELL, W.M.C., EVANS, G. Salamon's Artificial Insemination of sheep and goats. **Butterworths Pty Limited**, p. 194, 1987.

MEDEIROS, A. S. L.; GOMES, G.; CARMO, M. T.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, p. 273–276. 2002.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compound able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, H. T. (Ed.). **Cryobiology**, New York: Academic Press, p.179-220. 1966.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC - Nutrient requirements of small ruminants. 1ed. Washington: National Academy Press, 2006. 362p.

NUNES, J.F., CORTEEL, J.M., COMBARNOUS, Y., BARIL, G. Role Du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoids de bouc. **Reproduction Nutrition Development**. V.22, p. 611 – 620, 1982.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; OLIVEIRA, C. S.; LIMA, V. F. M. H. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livestock Science**, v. 146, p. 38-46. 2012.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, p. 458–465. 2010.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J. M.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion -dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, p. 55-63. 2009.

PARKS, J.E; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209 – 222, 1992.

PELLICER – RUBIO, M.T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60 – kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biology of Reproduction**, v.27 (5), p. 1023 – 1031, 1997.

POZO, D.; REITER, R. J.; CALVO, J. R.; GUERRERO, J. M. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.65, p.430–442, 1997.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rumin. Res.**, 63: 215 – 225, 2006.

RAO, M. V.; GANGADHARAN, B. Antioxidant potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.935–942, 2008.

REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S. A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.7231-7272, 2013.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M. Melatonin and Reproduction Revisited. **Biology of Reproduction**, v.81, n.3, p.445–456, 2009.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal Pineal Research*, v.36, p.1–9, 2004.

ROWE, A. W. Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. *Cryobiology*, v. 3, p. 12-18. 1966.

SAHNI, K.L.; ROY, A. A study on the effect of deep freezing (-79 °C) on post thawing revival of sheep and goat spermatozoa. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 42, p. 102-105, 1972.

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

SANOCCA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 2, p. 12-18. 2004.

SARABIA, L.; MAURER, I.; BUSTOS-OBREGON, E. Melatonin prevents damage elicited by organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.72, p.663–668, 2009.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 50, p. 235-245. 2002.

SHANG, X. J.; LI, K.; YE, Z. Q.; CHEN, Y. G.; YO, X.; HUANG, Y. F. Analysis of lipid peroxidative levels in seminal plasma of infertile men by high-performance liquid chromatography. *Archives of Andrology*, v.50, p.411–416, 2004.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, v. 1, p. 78-86. 1996.

SILVA, C. M.; MARCÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORILLORODRIGUES, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; STILWELL, G.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *Journal of Pineal Research*, v.51, p.172–179, 2011.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews*, v.55, n.2, p.325-395, 2003.

SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8. 1989, Belo Horizonte. *Anais*. Belo Horizonte: CBRA, 1989. p.171-177.

SKENE, D. J.; PAPAGIANNIDOU, E.; HASHEMI, E.; SNELLING, J.; LEWIS, D. F.; FERNANDEZ, M.; IONNIDES, C. Contribution of CYP1A2 in the hepatic

metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. **Journal of Pineal Research**, v.31, p.333– 342, 2001.

SMITH, A.H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v. 166, p.668 – 671, 1950.

SQUIRES, E.L; PICKET, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Principles of cryopreservation. In: **Cooled and frozen Stallion Semen**, b.09, 1999.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **User's guide**. Cary: SAS Institute, 2002. 525p.

STEFULJ, J.; HÖRTNER, M.; GHOSH, M.; SCHAUENSTEIN, K.; RINNER, I.; WÖLFLER, A.; SEMMLER, J.; LIEBMANN, P. M. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. **Journal of Pineal Research**, v.30, n.4, p.243-247, 2001.

SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; PASCIU, V.; SATTA, V.; LEONI, G. G.; NAITANA, S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. **Journal of Pineal Research**, v.50, p.310–318, 2011.

SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 2, p. 53-63, 2009.

TOSINI, G.; FUKUHARA, C .The mammalian retina as a clock. **Cell and Tissue Research**, v.309, p.119-126, 2002.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, p. 335-344. 2003.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiological Reviews**, v.78, n.3, p.687-721, 1998.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v. 59, p. 571-584, 2003.

VOGLER, C.J.; SAACKE, R. G.; BAME, J. H. et al. Effect of scrotal insulation on viability of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3827-3835, 1991.

WAIDE, Y.; NIWA, T.; ASANUMA, R. Studies on preservation of liquid and frozen sêmen of domestic animals. 3. Viability and fertility of frozen goat sêmen. **Japanese J. Anim. Reprod.**, v. 23, p. 129-137, 1997.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891. 1995.

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

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. **Reproductive Biology**, v. 1, p. 183-350. 1979.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**, v. 19, p.135-138. 1997.

ZARAZAGA, L. A.; MALPAUX, B.; GUILLAUME, D.; BODIN, L.; CHEMINEAU, P. Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism. **American Journal of Physiology**, v.274, p.1086–1090, 1998.

7. ANEXOS

ANEXO A

Diluições da melatonina para adição no diluente comercial Botu-Bov[®].

1. SOLUÇÃO ESTOQUE DE MELATONINA (1M)

Solução estoque I (1M)

4.3 mL = 1g = 1 M

430 μ L = 0.1 g = 1 M

0,1 g de melatonina + 430 μ L DMSO

2. MELATONINA (1 μ M)

30 μ L de melatonina (1 mM) + 30 mL de diluente Botu-Bov[®]

3. MELATONINA (1 mM)

30 μ L SE I + 30 mL de diluente Botu-Bov[®]

4. MELATONINA (2 mM)

60 μ L SE I + 30 mL de diluente Botu-Bov[®]

5. MELATONINA (3 mM)

90 μ L SE I + 30 mL de diluente Botu-Bov[®]

6. MELATONINA (4 mM)

120 μ L SE I + 30 mL de diluente Botu-Bov[®]

ANEXO B

Diluições das sondas utilizadas na citometria de fluxo

1. IODETO DE PROPÍDEO (IP)

Solução estoque (25 mg/mL = 40 mM)

25 mg PI + 1 mL DMSO

Solução de trabalho (0,5 mg/mL = 0,8 mM)

20 uL SE + 980 uL PBS

2. FITC-PSA

Solução estoque (0,5 mg/mL)

1 mg FITC-PSA + 4 mL PBS

Solução de trabalho (100 ug/mL)

2 mg FITC-PSA + 20 mL PBS

3. JC-1

Solução estoque (1,53 mM)

5 mg JC1 + 5 mL DMSO

Solução de trabalho (153 uM)

100uL SE + 900 uL DMSO

4. DCFDA

Solução estoque I (50 mg/mL)

2 g DCFDA + 20 mL DMSO

Solução estoque II (5 mg/mL)

1 mL SE I + 9 mL DMSO

Solução de trabalho (1 mg/mL)

1 mL ST I + 4 mL DMSO