

CARLOS THIAGO SILVEIRA ALVIM MENDES DE OLIVEIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES ESPERMÁTICAS ASSOCIADO OU NÃO A
MELATONINA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

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

T

O48c
2016

Oliveira, Carlos Thiago Silveira Alvim Mendes de, 1984-
Criopreservação de sêmen caprino em diferentes concentrações
espermáticas associada ou não a melatonina / Carlos Thiago Silveira
Alvim Mendes de Oliveira. - Viçosa, MG, 2016.
xii, 48f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.38-46.

1. Caprino - Reprodução. 2. Sêmen. 3. Criopreservação.
4. Melatonina. 5. Espermatozoides - Concentração. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-
graduação em Zootecnia. II. Título.

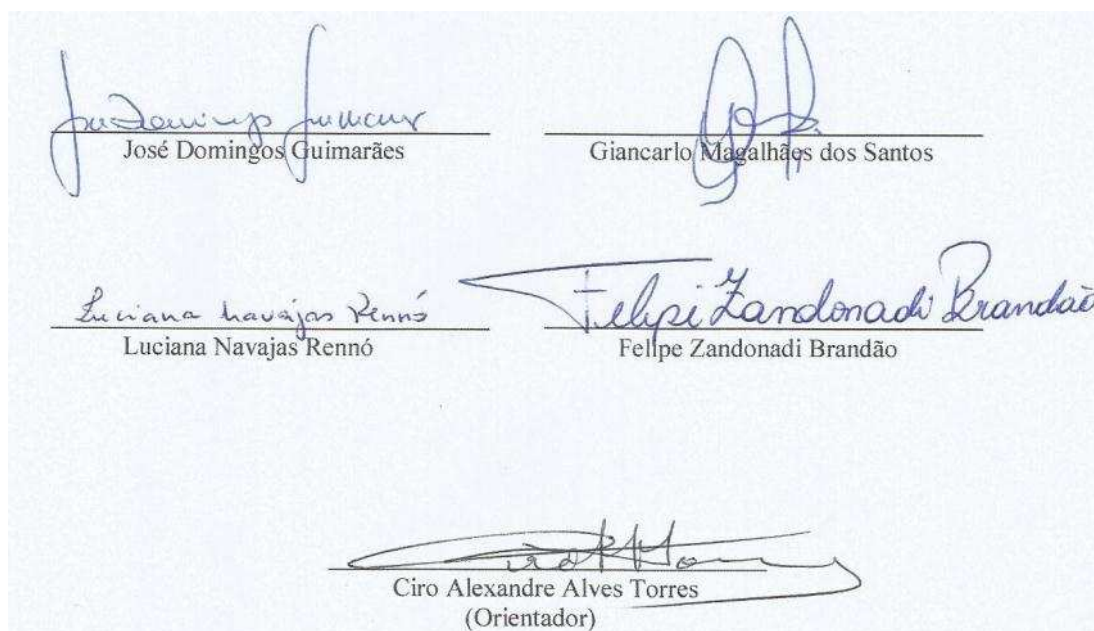
CDD 22. ed. 636.39

CARLOS THIAGO SILVEIRA ALVIM MENDES DE OLIVEIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES ESPERMÁTICAS ASSOCIADO OU NÃO A
MELATONINA**

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

APROVADA: 29 de fevereiro de 2016.



Handwritten signatures of the thesis committee members:

- José Domingos Guimarães
- Giancarlo Magalhães dos Santos
- Luciana Navajas Rennó
- Felipe Zandonadi Brandão
- Ciro Alexandre Alves Torres (Orientador)

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

Dedico esta obra a minha família: Maria das Graças Consuelo de Oliveira, José Carlos Mendes de Oliveira, Flávia Aline de Oliveira, Luciana Patrocínio e em especial aos meus avós paternos Lenita Mendes de Oliveira (“in memoriam”) e Jorge Alves de Oliveira (“in memoriam”).

AGRADECIMENTOS

Muitos contribuíram de maneira significativa para que este estudo fosse concluído, portanto, é com muita alegria que expresso nas linhas abaixo, o meu reconhecimento e gratidão a todos aqueles que não mediram esforços para que esta tese fosse realizada.

À Deus, sempre presente em minha vida, por ter me iluminado e guiado meus passos nos momentos de maior dificuldade.

Aos meus pais José Carlos de Oliveira e Maria das Graças de Oliveira, pelo carinho, amor e dedicação incondicionais; por nunca medirem esforços para o meu crescimento pessoal e profissional e por me ensinarem o valor da educação.

À minha irmã Flávia Aline pelo companheirismo, amor e parceria.

À minha namorada, Luciana Angélica, por todo amor, carinho e compreensão. Por me mostrar que a vida vale muito mais quando tocamos o coração daqueles que cruzam o nosso caminho.

À minha família de Ipatinga: Dona Vanda, Dona Bali, Claudinha, Vadinho, Rodrigo, Artur, Túlio, Sabrina e Verônica. Pelo carinho e acolhimento.

Aos amigos de Ipatinga: Carlinha, Tales, Lolinha pelas conversas agradáveis e momentos de descontração.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto de pesquisa.

Aos meus familiares pela torcida, apoio e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao professor e orientador Ciro Alexandre Alves Torres, pela orientação, pela amizade e confiança.

Aos professores membros das bancas de qualificação e defesa de tese José Domingos (JD), Cláudio Borela, Felipe Zandonadi (UFF), Giancarlo (Univiçosa) e Luciana Rennó, pela disponibilidade, sugestões e correções desse trabalho.

Ao professor Marcelo Teixeira Rodrigues, pela oportunidade concedida para realização deste trabalho no capril.

Ao Dr. Cláudio Borela Espeschit, pela ajuda e pelos conselhos durante toda a minha pós-graduação.

À Fernanda, secretária da Coordenação da Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia, pelo auxílio e monitoramento acadêmico.

Aos colegas de pós-graduação, Carol, Ítalo, Juliana, Marco, Erly pelas contribuições fundamentais na execução do experimento e pelos momentos agradáveis compartilhados.

Às orientadas do JD, Paula e Bruna, pela ajuda imprescindível para o preparo das sondas fluorescentes e padronização das avaliações realizadas no citômetro de fluxo. Obrigado pela paciência e disponibilidade na execução dessas atividades.

Aos estagiários do setor de caprinocultura Carol, Lucas (TG), Paola, Gabriela e Vinícios pelo auxílio e dedicação. Em especial ao estagiário bolsista de iniciação científica Domingos Lollobrigida pela sua dedicação integral ao experimento.

Ao Jurandy pelo apoio estatístico durante toda execução do experimento.

Aos funcionários do capril da UFV, pelo apoio e disposição nas atividades do capril.

Aos amigos do Lancapri (Laboratório de nutrição em caprinos) Larissa, Tiago, Mariana, Érica, pelo auxílio sempre que necessário, das atividades do setor de caprinocultura. E por tornarem o ambiente do capril sempre muito agradável.

Aos amigos de Viçosa, Ana Paula (Aninha), David, Jurandy, Gisele, pelos momentos agradáveis e descontraídos.

Aos amigos de Goiânia Rafael Portes, Kelly, Rafael Amanso e; pela amizade, consideração e por torcerem pelo meu sucesso.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV Karla, Gilmar e Lourenço pelo auxílio no uso dos equipamentos do laboratório.

À Botupharma, pela gentileza ao fornecer todos os diluentes utilizados no experimento.

Às agências de fomento FINEP, FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo financiamento dos materiais de custeio e de capital utilizados nos mais diversos setores da UFV.

E não menos importante a todos que, direta e indiretamente contribuíram para a realização desse estudo.

BIOGRAFIA

Carlos Thiago Silveira Alvim Mendes de Oliveira, filho de José Carlos Mendes de Oliveira e Maria das Graças Consuelo Silveira Alvim de Oliveira, nasceu em Brasília - DF em 12 de setembro de 1984 onde residiu até seus 19 anos.

Em 2004 ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, graduando - se em janeiro de 2009.

Em março de 2010 ingressou no programa de pós - graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, mestrado na área de Reprodução Animal, concluindo-o em fevereiro de 2012.

Em março de 2012, ingressou no curso de pós-graduação em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, doutorado na área de Reprodução Animal, concluindo-o em fevereiro de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 – Efeitos da criopreservação sobre a célula espermática	3
2.2 - Plasma seminal caprino	6
2.3 – Meios diluidores e crioprotetores	7
2.4 – Concentração espermática e viabilidade do sêmen	10
2.5 – Estresse oxidativo e fertilidade	12
2.6 – Efeito antioxidante da melatonina	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Comissão de ética	15
3.2 Local e período de experimentação	16
3.3 – Animais, alimentação e sanidade	16
3.4 – Delineamento experimental	16
3.5 – Colheita de sêmen	17
3.6 – Análises físicas do sêmen	18
3.7 – Diluição do sêmen	19
3.8 – Resfriamento do sêmen	19
3.9 – Congelamento do sêmen	19
3.10 – Descongelamento e análises do sêmen	19
3.11 – Teste de termorresistência	20
3.12 – Teste morfológico	20
3.13 – Teste hiposmótico	20
3.14 – Citometria de fluxo	21
3.15 – Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (IP/FITC-PSA)	22
3.16 – Avaliação do potencial de membrana (JC-1)	24
3.17 – Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular (DCFDA/IP)	25
3.18 – Análises estatísticas	27

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.0 CONCLUSÕES	37
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	47

RESUMO

OLIVEIRA, Carlos Thiago Silveira Alvim Mendes de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Criopreservação de sêmen caprino em diferentes concentrações espermáticas associado ou não a melatonina.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar se a ação antioxidante da melatonina influencia na viabilidade *in vitro* pós-descongelamento dos espermatozoides caprinos, bem como verificar o potencial uso deste antioxidante em diferentes concentrações de espermatozoides caprinos criopreservados. Foram utilizados dois machos adultos da raça Alpina e dois machos adultos da raça Saanen. Para as coletas de sêmen foi utilizada vagina artificial onde se obteve seis ejaculados por animal. Após a coleta, fez-se a avaliação das características macro e microscópicas. Em seguida, o sêmen foi diluído com os seguintes tratamentos : T₁ 40 X 10⁶ espermatozoides sem antioxidante (Controle); T₂ 40 X 10⁶ espermatozoides com antioxidante; T₃ 80 X 10⁶ espermatozoides sem antioxidante; T₄ 80 X 10⁶ espermatozoides com antioxidante; T₅ 100 X 10⁶ espermatozoides sem antioxidante e T₆ 100 X 10⁶ espermatozoides com antioxidante. Após as diluições finais, foram avaliados a motilidade progressiva e vigor espermático de cada tratamento. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL, as palhetas foram resfriadas a cinco graus celsius, durante uma hora em refil plástico contendo álcool etílico. O pré-congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido durante 15 minutos. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio para o congelamento do sêmen. As partidas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos e homogeneizadas para a análise imediata de motilidade e vigor espermático, teste hiposmótico e teste de termorresistência. As amostras foram avaliadas mediante patologia espermática e por meio de citometria de fluxo quanto à integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e produção de peróxido de hidrogênio intracelular. No sêmen fresco, as características físicas estavam dentro dos parâmetros normais. O melhor resultado obtido no TTR foi referente aos tratamento 100µM (p<0,05), manteve a maior média de motilidade espermática total após cinco minutos de incubação a 37 °C. O potencial mitocondrial sofreu alteração frente aos tratamentos com uma concentração

de 40×10^6 spz/dose ($p < 0,05$). Em relação à raça, foi observado maior viabilidade celular com presença de peróxido de hidrogênio intracelular na raça saanen comparada a raça alpina ($p < 0,05$). Em relação à concentração espermática, foi observado maior proporção de células viáveis com presença de peróxido de hidrogênio intracelular nos tratamentos com concentração espermática de 40 e 80×10^6 espermatozoide/mL, enquanto a menor proporção foi observada no tratamento com 100×10^6 espermatozoide/mL ($p < 0,05$). Os resultados obtidos quanto à ação da Melatonina não foram satisfatórios, porém as concentrações utilizadas neste experimento mantiveram a viabilidade seminal de acordo com as características preconizadas pelo CBRA, mas não foram superior ao tratamento controle.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Carlos Thiago, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Cryopreservation of goat semen with different sperm concentrations with or without melatonin.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres.

The aim of this study was to evaluate the antioxidant effect of melatonin on the viability *in vitro* post-thaw sperm of goats, as well as to investigate the potential use of this antioxidant in different concentrations of sperm cryopreserved goats. Four Billy goats were used and six samples were collected from each and their semen was cryopreserved in commercial diluent Botubov[®]. After each collection, the semen was diluted and analyzed, and then distributed along nine experimental treatments: T₁ (control) – 40 X 10⁶ spermatozoa without melatonin; T₂ - 40 X 10⁶ spermatozoa with 1µM melatonin; T₃ - 40 X 10⁶ spermatozoa with 100µM melatonin; T₄ - 80 X 10⁶ spermatozoa without melatonin; T₅ - 80 X 10⁶ spermatozoa with 1µM melatonin; T₆ - 80 X 10⁶ spermatozoa with 100µM melatonin; T₇ - 100 X 10⁶ spermatozoa without melatonin; T₈ - 100 X 10⁶ spermatozoa with 1µM melatonin; T₉ - 100 X 10⁶ spermatozoa with 100µM melatonin. After dilutions, the semen was cooled to 5 °C, kept in a three- hour period of equilibrium, and then stored in previously identified and sealed 0,25mL straws. The straws were frozen in a liquid nitrogen vapor for 15 minutes, submerged in nitrogen, and then stored in cryogenic cylinder. The doses of semen in the treatments were thawed at 37 °C for 30 seconds and subjected to *in vitro* tests: motility, vigor, morphology, membrane functionality by hypoosmotic test and thermoresistance test (TRT) at 37 °C for three hours and by flow cytometry as to integrity of plasma and acrosomal membrane, mitochondrial potential and intracellular peroxide hydrogen production. The results related to Melatonin were not satisfactory, revealing with it the need for new studies about its optimal concentration and effects on semen freezing goats. The best result obtained in TTR was referring to 100µM treatment (p <0.05), maintained the highest average total sperm motility after five minutes of incubation at 37 °C. Mitochondrial potential was altered to the treatments with a concentration of 40 X 10⁶ sperm / dose (p <0.05). In regard to race, greater cell viability was observed with the presence of intracellular hydrogen peroxide in the Alpine compared Saanen (p <0.05). Regarding the sperm concentration was observed a higher proportion of viable cells in presence

of intracellular hydrogen peroxide in treatments with sperm concentration of 40 to 80 x 10⁶ sperm / ml, while the smaller proportion was observed in the treatment with 100 x 10⁶ sperm / ml (p <0.05). The results obtained as to the action of melatonin were not satisfactory, however the concentrations used in this experiment maintained seminal viability according to the features prescribed by the CBRA, but not higher than the control treatment

1. INTRODUÇÃO

Dentre as ferramentas reprodutivas, a inseminação artificial (IA) apresenta um melhor custo benefício, possibilita ao produtor a propagação do seu potencial genético de forma mais ampla, permitindo assim o acasalamento de milhares de fêmeas por ano (AISEN, 2008). Apesar do seu custo de implantação relativamente baixo quando comparado às outras biotécnicas, a IA, permite ampliar a utilização dos reprodutores, viabilizando sua avaliação genética por meio da progênie em um curto espaço de tempo, aumentando assim a eficiência reprodutiva do rebanho (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O sucesso do programa de IA em uma propriedade depende de vários fatores, como a qualidade do sêmen utilizado e a sua correta manipulação. Principalmente durante os processos de congelamento e descongelamento do sêmen, ocorre diminuição do número de espermatozoides viáveis por dose (AMANN & PICKETT, 1987; WATSON, 1995), assim, a redução ou o controle de qualquer tipo de injúria que afete os espermatozoides possibilita melhora na viabilidade espermática.

A concentração espermática da dose inseminante está relacionada como um dos fatores que interferem na fertilidade do sêmen congelado. Segundo Castelo *et al.* (2008) os ejaculados da maioria dos animais domésticos contêm maior quantidade de espermatozoides do que o necessário para a fecundação. Desta forma, o processo de diluição do sêmen pode contribuir para o aproveitamento de um ejaculado para um maior número de fêmeas. Mann, *apud* LEAHY *et al.* (2010), descreve o efeito diluição com a perda de motilidade e viabilidade quando os espermatozoides são altamente diluídos. Diluição excessiva tem sido reportada como causa de desestabilização de membrana devido à diminuição de fatores protetores do plasma seminal, como agentes antioxidantes, interferindo na fertilidade pós-inseminação. Por outro lado, o metabolismo dos espermatozoides, em doses de sêmen com altas concentrações espermáticas, gera grande quantidade de espécies reativas ao oxigênio (ROS) também conhecidas como radicais livres. Dentre estes, destacam-se o radical livre superóxido e, o não radical, peróxido de hidrogênio.

A peroxidação lipídica é uma das injúrias causadas nas membranas dos espermatozoides (JONES & MANN, 1977) causada pelo estresse oxidativo devido à produção excessiva de radicais livres, os quais estão associados com o declínio da fertilidade do sêmen após o período de estocagem (MAXWELL & WATSON,

1996). O aumento de reações oxidativas possui efeito danoso na membrana espermática e no DNA dos espermatozoides. A membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados, os quais se tornam altamente sensíveis a ROS (COMHAIRE *et al.*, 1999; OCHSENDORF, 1999).

Todos esses fatores levam a estresse oxidativo e injúrias das células espermáticas (SOARES & GUERRA, 2009; LEAHY *et al.*, 2010). Assim, a adição de agentes antioxidantes, em meios para criopreservação, pode melhorar a fertilidade do sêmen criopreservado.

A melatonina é considerada um potente antioxidante, na medida em que protege as células da apoptose mitocondrial e inibe a peroxidação lipídica. Sua presença já foi detectada no plasma seminal ovino (Casao, *et al.*, 2010) e nos seus receptores na membrana espermática (Fujinoki, 2008).

De acordo com essas premissas esse estudo teve como objetivo avaliar a fertilidade *in vitro* do sêmen caprino criopreservado das raças Saanen e Alpina com diferentes concentrações espermáticas e na presença, ou não, da melatonina como agente antioxidante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Efeitos da criopreservação sobre a célula espermática.

Devido a sua complexidade o processo de criopreservação de sêmen envolve uma série de fatores que contribuem para o sucesso da biotécnica. Dentre esses fatores, destacam-se a qualidade inicial da amostra seminal colheita, a diluição submetida, concentração, diluente e a técnica de criopreservação utilizada (WATSON, 2000).

Os espermatozoides podem ser divididos de acordo com a sua morfologia em duas estruturas distintas: a cabeça e a cauda. A cabeça, cuja forma, tamanho e estrutura variam entre as espécies, contém duas regiões principais: acrossomal e a pós-acrossomal. De acordo com BARTH & OKO (1989) podem ser distinguidas cinco membranas na cabeça dos espermatozoides: a plasmalema, a membrana acrossomal externa e interna e a membrana nuclear interna e externa. A integridade e funcionalidade dessas estruturas estão fortemente relacionadas com a viabilidade da célula espermática.

A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide, constituindo assim o componente mais externo da célula, composta por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluído (SINGER & NICHOLSON, 1972). Sua composição, tipo de fosfolipídios e quantidade de proteínas são variáveis e influenciam a sensibilidade ao choque térmico. Sendo os lipídios, os principais constituintes que conferem à membrana a característica de fluidez, a qual depende tanto da composição quanto da temperatura, sendo que a mudança de estado líquido para gel em membranas com maior proporção de lipídios de cadeia insaturada ocorre em temperaturas menores (AMANN & GRAHAM, 1993). Os lipídios de membrana são assimétricos na sua distribuição nas duas faces da bicamada, embora a assimetria, ao contrário daquela das proteínas da membrana, não seja absoluta (LEHNINGER *et al.*, 2005).

O alto conteúdo de ácidos graxos insaturados no espermatozoide tende a ocasionar estresse oxidativo (KODAMA *et al.*, 1996). Os fosfolipídios, cujas cadeias de ácidos graxos são predominantemente poli-insaturadas, quando submetidos à redução da temperatura, assumem uma forma cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada de

forma “hexagonal II” ou micela invertida. Quando a membrana está em transição da fase fluida para a fase cristalina, para muitos lipídios, a formação dessa micela invertida é transitória, entretanto, para certos fosfolipídios, esta estrutura persiste tornando-se irreversível e impossibilitando a reorganização do arranjo bilaminar da membrana, mesmo após o reaquecimento do espermatozoide à temperatura ambiente (AMANN & PICKETT, 1987). Como consequência, tem-se aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana e, assim, causar danos irreparáveis (PARKS & GRAHAM, 1992; WATSON, 1995; BEYGI & ZARGHAMI, 2007).

A criopreservação mantém a vida útil do sêmen por um período indeterminado à temperatura de -196°C em nitrogênio líquido visto que, nessa temperatura as reações químicas, processos biológicos e físicos intra e extracelulares são interrompidos. Assim, as alterações espermáticas são causadas durante o processo de resfriamento, congelamento e descongelamento (PARKS & GRAHAM, 1992). O estresse inicial se dá quando o espermatozoide passa da temperatura corporal para cinco graus (SQUIRES *et al.*, 1999). Isto ocorre pela transição da membrana plasmática do estado líquido cristalina, para o estado de gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS, 2002). Para minimizar este efeito é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19°C a oito graus e pela adição de lipídios (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente (GRAHAM, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas ($-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$). Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, o espermatozoide sofre choque térmico, o fenômeno que induz a danos irreversíveis aos espermatozoides caracterizados por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade, danos do metabolismo, da membrana plasmática e do acrossoma (GRAHAM, 1996; SQUIRES, 1999).

Durante o processo de congelamento a suspensão de espermatozoides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super-resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, ocorre um aumento na temperatura que é necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozoide, sendo minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento (SQUIRES, 1999). Em torno de cinco graus a água intra e extracelular permanece super-resfriada e não cristaliza. Entre -5°C a -10°C

começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular que permanece super-resfriado, ocorre troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular ocasionando a desidratação celular. Neste ponto, a curva de congelamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e, rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Uma desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (MEDEIROS, 2002).

O processo de desidratação é um evento desejável, pois reduz a probabilidade de se formarem grandes canais de gelo dentro da célula que causariam danos às estruturas internas e, ou, a membrana plasmática (SQUIRES, 1999).

O descongelamento vai depender de como o sêmen foi congelado. Espermatozoides congelados em curvas moderadas necessitam de curvas adequadas de descongelamento. Neste caso, como o gelo extracelular descongela lentamente, diluirá lentamente o soluto das frações de água que não congela, o que permite que a água difunda lentamente para dentro da célula, diluindo o soluto intracelular até atingir a concentração inicial. Se o espermatozoide é descongelado rapidamente, o gelo derrete, diluindo o soluto do meio e a água entrará no espermatozoide, o qual se encontra altamente concentrado, danificando o espermatozoide (GRAHAM, 1996).

O processo de criopreservação envolve uma série de respostas biofísicas, ainda não completamente compreendidas, das células e dos tecidos. A taxa de sobrevivência espermática ao resfriamento, congelamento e aquecimento dependem das taxas de resfriamento e aquecimento utilizadas, do tempo em que a célula permanece em cada etapa, do transporte de substâncias e da formação de cristais de gelo. (AMANN & PICKETT, 1987).

Durante o congelamento lento, ocorre o congelamento da água inicialmente no meio extracelular, antes que os cristais de gelo sejam formados no meio intracelular (MEDEIROS *et al.*, 2002). Com a formação de cristais de gelo no meio extracelular, a água é removida do ambiente extracelular e um gradiente osmótico é formado, levando a passagem de água para fora da célula. MAZUR P. (1977) propôs que durante o congelamento lento o dano celular era causado pelo longo período de tempo em que a célula permanecia exposta às propriedades alteradas dos meios intra e extracelulares, como resultado da formação de gelo. Este fenômeno é conhecido como efeito solução apresentando: desidratação excessiva; elevada concentração de

solutos, solução tóxica à célula; e mudança de pH celular, alterando o metabolismo da célula.

Quando a célula é congelada em uma taxa de congelamento muito rápida, há a formação de gelo extracelular, levando ao aumento na concentração dos solutos extracelulares de forma muito rápida, não permitindo que a célula desidrate o suficiente, conseqüentemente ocorre maior formação de cristais de gelo intracelular, letais para a célula.

2.2. Plasma seminal caprino

A produção espermática dos caprinos sofre influência de vários fatores como raça, idade, nutrição, fotoperíodo, temperatura ambiente e umidade, que são responsáveis pela variação das características espermáticas (CHEMINEAU, 1986) e conseqüentemente altera a qualidade do sêmen congelado. A célula espermática sofre inúmeros fatores estressantes, que podem estar ligados ao choque térmico durante o resfriamento do sêmen, à formação de cristais intracelulares de gelo ou ao choque osmótico durante o congelamento e descongelamento, ou ainda à toxicidade devido à adição do crioprotetor (WATSON, 2000). A resposta ao processo de criopreservação varia de espécie para espécie (HOLT, 2000).

No sêmen caprino existem algumas peculiaridades em relação ao sêmen de outras espécies, sendo a mais característica a síntese e secreção no plasma seminal de enzimas com atividade fosfolipase pelas glândulas bulbouretrais (SIMPLÍCIO & MACHADO, 1989; LEBOEUF, 2000).

De acordo com IRITANI & NISHIKAWA (1964), essas enzimas hidrolisam os triglicerídeos das membranas plasmáticas dos espermatozoides e as tornam mais fusogênicas, induzindo assim à reação acrossômica (UPRETI *et al.*, 1999). Além disso, ela também hidrolisa a lecitina da gema do ovo em lisolecitina, que têm ação detergente sobre lipídios de membrana, que é tóxica aos espermatozoides (PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997). Sendo a lecitina também presente nas membranas plasmáticas dos espermatozoides, a composição enzimática do sêmen do bode e dos diluidores assumem grande importância no processo de conservação do sêmen congelado (SIMPLÍCIO & MACHADO, 1989).

A retirada do plasma seminal, por meio da centrifugação, antes do processo de congelamento, é um processo demorado e que pode danificar as células se realizado de forma inadequada. Alguns trabalhos indicam que a remoção do plasma seminal é

necessário para maximizar a motilidade e preservar a integridade acrossomal na descongelação (MEMON et al., 1985; RITAR & SALAMON, 1991), enquanto outros relatam resultados positivos para o sêmen congelado sem passar pelo processo de lavagem (AZERÊDO et al., 2001; RITAR & SALAMON, 1982). Coloma et al. (2010) ao remover o plasma seminal de bodes (*Capra pyrenaica*) observou o efeito benéfico durante a época de fotoperíodo decrescente, mostrando que o sêmen caprino apresenta um aumento da atividade fosfolipase durante a época da estação reprodutiva. Desta forma, os efeitos negativos do congelamento-descongelamento sobre a qualidade espermática (motilidade, integridade da membrana plasmática e do acrossoma) foram mais graves nas amostras de sêmen não lavadas do que naquelas da qual foi removido o plasma seminal.

Como possível solução desse problema, RITAR & SALAMON (1982) propuseram utilizar no diluente 1,5% de gema de ovo na sua concentração final, enquanto TULI & HOLTZ (1992) utilizaram 16,8%. No entanto EVANS & MAXWELL (1987) recomendaram 2,5% no total do volume do diluente. Diferentes graus de resistência da célula espermática ao processo de criopreservação são observados entre as espécies. Exames da ultra-estrutura espermática em microscopia eletrônica de transmissão (MET), antes e após o congelamento, mostraram que as ultraestruturas de espermatozoides bovinos eram quase idênticas antes e depois do processo. Contudo, espermatozoides de ovinos e suínos apresentaram danos consistentes na membrana externa e no complexo acrossomal, com formação de edema de acrossoma e remoção total de regiões citoplasmáticas. Em cães houve danos ultraestruturais na cabeça e peça intermediária, afetando a estrutura básica das mitocôndrias (SILVA *et al.*, 2007). HASHIDA *et al.* (2005) concluíram que o processo de criopreservação causou danos na morfologia do espermatozoide caprino, com subsequente comprometimento da fertilidade.

2.3 - Meios diluidores e crioprotetores

O sêmen caprino é extremamente sensível ao choque térmico, às variações de pH e pressão osmótica da solução diluente (DEKA & RAO, 1985). Para que o espermatozoide ejaculado sobreviva a longos períodos, é necessária a adição de agentes protetores no sêmen que proporcionem nutrientes como fonte de energia, o tamponamento do pH, a pressão osmótica adequada, o equilíbrio eletrolítico e o aumento do volume do ejaculado, aumenta o número de doses para a IA (AISEN,

2008). Os meios para criopreservação do sêmen caprino são constituídos à base de citrato de sódio, gema de ovo, lactose, água de coco, Tris e leite bovino desnatado em pó e reconstituído por um crioprotetor interno ou penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfóxido), sais (citrato de sódio ou ácido cítrico) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina) (PURDY, 2006).

Os crioprotetores externos, são substâncias constituídas por macromoléculas, lipídios e proteínas que não atravessam a membrana plasmática. As mais utilizadas 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). Essas substâncias tornam o meio hipertônico com o aumento da osmolaridade do meio extracelular, permitindo assim a passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo, desta forma, a formação de cristais de gelo no interior na célula durante a criopreservação (GONZALEZ, 2004).

A gema de ovo é um diluente usado rotineiramente na criopreservação de sêmen dos animais domésticos. O efeito protetor da gema de ovo sobre a membrana plasmática da célula espermática ocorre devido à presença das frações lipoproteicas de baixa densidade na sua composição. As lipoproteínas, como a fosfatidilcolina, presentes na gema de ovo, interagem com a estrutura lipídica da superfície celular, restaurando a perda de fosfolipídios que ocorre durante a mudança brusca de temperatura durante o resfriamento, prevenindo assim, a ruptura da membrana celular (FARSTARD, 1996). Essa interação ocorre principalmente na fase de equilíbrio (processo de resfriamento a cinco graus celsius).

A proteção promovida pelos lipídios com relação ao choque térmico parece estar relacionada à quelação do íon Ca^{+2} do meio, evitando sua entrada no espermatozoide. É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelamento que afetem a tonicidade ou a fração da água não congelada durante a criopreservação (WILHELM *et al.*, 1996).

A gema de ovo previne também a liberação da enzima hialuronidase pela célula espermática (FOULKES, 1977). ABOAGLA & 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 o descongelamento. BISPO *et al* (2011) avaliaram por meio de testes *in vitro* e de fertilidade *in vivo*, quais as concentrações de gema de ovo (Baixa: 2,5% ou Alta 20%) no diluidor

glicose-EDTA preservam melhor o sêmen caprino congelado. Após o descongelamento, o diluente contendo baixa concentração de gema de ovo (2,5%) melhorou o congelamento do sêmen caprino, independentemente da estação reprodutiva.

O leite desnatado é considerado um dos diluentes de eleição para a espécie caprina, devido à presença de caseínas e pela fração lipídica. A eficiência das proteínas (caseínas) do leite na criopreservação do sêmen se assemelha ao da gema de ovo, por meio da sua composição proteica, que atua como tampão, e da propriedade quelante diante dos metais pesados, diminuindo os efeitos deletérios causados pela diminuição da temperatura (SALOMON & MAXWELL, 2000).

A viabilidade do sêmen na presença de diluente à base de leite é de aproximadamente 12 a 24 horas. O fosfocaseinato nativo é composto pelas caseínas do leite (a, b), foi destacado como sendo o componente mais eficiente em preservar a motilidade e manter a fertilidade do sêmen caprino estocado durante três dias, quando comparado a outros tipos de diluente (LEBOEUF *et al.*, 2003).

Apesar dos efeitos benéficos atribuídos ao leite, assim como na gema de ovo ocorre um efeito deletério entre o diluente a base de leite e a fração glicoprotéica do plasma seminal caprino (SBUIII) identificada por NUNES (1982), que é responsável por hidrolisar triglicerídeos de membrana plasmática e triglicerídeos no leite desnatado, resultando em um ácido graxo, o ácido oléico, que é tóxico aos espermatozoides (PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997).

Em geral são formados por moléculas com a capacidade de atravessar a membrana plasmática promovendo uma proteção intracelular das células espermáticas, porém, também atuam no meio extracelular, diminuindo as lesões de natureza química ou mecânica que o congelamento provoca no espermatozoide.

Possuem funções coligativas, diminuindo o ponto crioscópico intracelular permitindo assim a permanência da água no estado líquido sob baixas temperaturas. Além de diminuir a água intracelular e, conseqüentemente, o tamanho e o número de cristais de gelo (WATSON, 1995). São classificados em dois grupos: os alcoóis (etanol, glicerol, etilenoglicol, entre outros) e as amidas. Um bom agente crioprotetor permeável deve possuir baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (MEDEIROS *et al.*, 2002).

O glicerol é o crioprotetor de maior eleição para a criopreservação do sêmen caprino (RITAR *et al.*, 1990; KUNDU *et al.*, 2000; LEBOEUF *et al.*, 2000). O seu

mecanismo de ação se dá pela redução da concentração do soluto nos meios intra e extracelulares, diminuindo a formação e tamanho de cristais de gelo (DALIMATA & GRAHAM, 1997) por meio de ligações de hidrogênio entre moléculas de água e seus três grupos funcionais de hidroxilas.

O crioprotetor pode causar danos osmóticos aos espermatozoides, mas cada espécie responde de maneira diferente em relação ao efeito do crioprotetor. Os espermatozoides caprino são ligeiramente tolerantes a essas condições e resistem de forma mais efetiva ao glicerol (MEDEIROS *et al.*, 2002). Apesar disso, o glicerol pode também produzir danos aos espermatozoides caprinos, por apresentar graus de toxicidade em concentrações acima de sete por cento (LEBOEUF *et al.*, 2000). Esses danos incluem mudanças nas estruturas citoplasmáticas, alteração da polimerização da tubulina e interferência direta nas proteínas da membrana plasmática (PARKS & GRAHAM, 1992).

Com isso, algumas substâncias têm sido utilizadas como uma alternativa para os diluidores de congelamento de sêmen, como os crioagentes do grupo dos alcoóis: etanol, etilenoglicol, metanol, polietilenoglicol e propilenoglicol; e as amidas, incluindo a acetamida, formamida, lactamida e dimetil-sulfóxido, além de outras (SNOEK, 2003).

2.4. Concentração espermática e viabilidade do sêmen

Alguns estudos correlacionam à concentração espermática com a viabilidade celular pós-descongelamento.

Os processos de congelamento e descongelamento causam diminuição do número de espermatozoides viáveis por dose inseminante (BAILEY *et al.*, 2000). Segundo Watson (2000), 40 a 50% dos espermatozoides não sobrevivem aos protocolos de criopreservação, o que reduz a fertilidade nos programas de IA. Na espécie bovina, poucas células espermáticas, cerca de 20 milhões, são necessárias para alcançar níveis aceitáveis de fertilização pós-inseminação, mas em outras espécies dos animais domésticos essa concentração compromete a eficiência dos procedimentos (BAILEY *et al.*, 2000; HOLT, 2000b; WATSON, 2000).

O número total de espermatozoides contidos em uma dose de sêmen para efetuar inseminações é um dos fatores que afetam a fertilidade em programas de sincronização e IA em pequenos ruminantes. A utilização da técnica de inseminação laparoscópica intrauterina com sêmen criopreservado permite a redução da dose

espermática usual de 100 milhões para 5 a 20 milhões de espermatozoides móveis (LEBOUEF et al., 2000). Contudo, uma concentração espermática excessivamente baixa conduzirá a problemas nas taxas de prenhez pós-inseminação. Salomon e Maxwell (2000) recomendam concentração mínima de um milhão de células espermáticas com motilidade para manter níveis aceitáveis de prenhez com IA intrauterina em ovelhas com estro sincronizado e utilizando sêmen criopreservado.

Altas taxas de diluição como as que ocorrem durante o processamento do sêmen para a produção de doses sexadas, podem reduzir a motilidade e viabilidade seminal. A carência do plasma seminal nas amostras irá provocar a desestabilização das membranas, dando início à capacitação espermática, que irá promover a prematura morte celular, se o local de deposição do sêmen na IA for distante do sítio de fertilização. Esse efeito de diluição pode ser minimizado quando se utilizam meios diluentes isotônicos com adequadas concentrações de sais, energia e soluções-tampão (MAXWELL & JOHNSON, 1999).

Por outro lado, uma elevada concentração espermática determina intensa atividade metabólica, com rápido acúmulo de catabólitos extremamente prejudiciais à célula espermática. A diminuição da concentração, até certos limites, resultaria numa maior proporção diluente/espermatozoide, o que significa maior proteção celular. Elevadas diluições, porém, não levam a uma congelabilidade adequada. Um parâmetro de eficiência a ser considerado na criopreservação do sêmen é o número mínimo de espermatozoides móveis que deverá conter a dose inseminante, tornando muito mais efetivo o aproveitamento do ejaculado (CASTELO *et al.*, 2008).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) estabelece que uma dose inseminante deve conter um mínimo de 40 milhões de espermatozoides viáveis (CBRA, 1998).

Tem sido demonstrada uma relação linear entre concentração espermática da dose inseminante e taxa de concepção (Ritar & Salamon, 1982). A taxa de concepção aumenta linearmente com o incremento do número de espermatozoides, a partir de um valor mínimo.

Quando a fertilidade atinge um valor máximo, a curva que relaciona o número de espermatozoides com a taxa de concepção atinge um platô. A partir deste, não se consegue qualquer incremento na taxa de concepção, mesmo que se aumente o número de espermatozoides na dose inseminante.

Ritar & Salamon (1962), considerando um intervalo de 28 a 128 milhões de espermatozoides por dose inseminante constatou que, a adição de cada 25 milhões de espermatozoides à mesma, aumentava a taxa de nascimento em 13%.

De acordo com Evans e Maxwell (1987) o local de deposição, bem como a condição de conservação do sêmen influenciam a concentração necessária por dose inseminante.

Assim, para inseminação vaginal, é recomendável utilizar apenas sêmen fresco, com uma dose de 300×10^6 espermatozoides/ml. Para IA cervical, a concentração espermática varia de 100, 150 e 180×10^6 espermatozoides/ml, para o sêmen a fresco, resfriado e congelado, respectivamente. Finalmente, para IA intra-uterina, via cérvix, a concentração recomendada é de 60 milhões de espermatozoides, para qualquer tipo de sêmen utilizado (EVANS & MAXWELL, 1987).

2.5. Estresse oxidativo e fertilidade

A célula espermática, durante o seu metabolismo, produz espécies reativas ao oxigênio (ROS, *de reactive oxygen species*), entre eles: o radical superóxido (O_2^*), o radical hidroxila (OH^*) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAIA & BICUDO, 2009).

O ânion superóxido (OH^*) é um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular, pela adição de um elétron. São gerado de forma espontânea, especialmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória e também por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases. É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento aonde é produzido (NORDBERG & ARNER, 2001).

O radical hidroxila (OH^*) é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ROS. É formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o radical OH^* . É gerado a partir da dismutação enzimática do O_2^* pela superóxido dismutase, tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Além destes, existem ainda os oxidantes derivados do nitrogênio, que podem ser denominados de RNS (TURRENS, 2003), com destaque para o óxido nítrico (ON^-) e o peroxinitrito (ONOO^-).

As ROS, em pequenas quantidades, são fisiologicamente necessárias por induzir a cascata de fosforilação da tirosina, associada à capacitação espermática, hiperativação da motilidade, reação acrossomal e fusão dos gametas. No entanto a geração excessiva de ROS pode subjugar o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide, que é fraco, devido à escassez de citoplasma, tornando-o susceptível ao estresse oxidativo (MAIA & BICUDO, 2009).

Além disso, altas concentrações de ROS desencadeiam o processo de peroxidação lipídica, que ao ter contato com os ácidos graxos poli-insaturados da membrana espermática, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez irá agir em outro ácido graxo poli-insaturado. Este processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando alterações estruturais na membrana plasmática, com perda de fluidez e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático, mudanças no metabolismo celular e perda da capacidade de fertilização do espermatozoide. A geração de radicais livres também pode atingir o DNA do núcleo espermático, promovendo fragmentação.

Esses danos decorrentes do estresse oxidativo não só diminui a fertilidade espermática como prejudica a capacidade desses espermatozoides em gerarem embriões viáveis (AITKEN *et al.*, 2010). Essa fragmentação é comumente observada nos espermatozoides de indivíduos inférteis e há fortes evidências que esses danos mediados pela ação dos radicais livres sejam induzidos por estresse oxidativo (NICHII, 2003).

2.6. Efeito antioxidante da melatonina

A descoberta da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) como antioxidante (POEGGELER & MANCHESTER, 1993) estimulou o desenvolvimento de várias pesquisas que verificaram a capacidade desta indolamina como quelante de radicais livres e redutora da agressão molecular (KORKMAZ & TAN, 2009).

A proteção celular aos radicais livres pode realizar-se pela redução da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, prevenção da depleção de enzimas intracelulares antioxidantes, inibição da sobreativação das espécies reativas de

nitrogênio, destoxificação de espécies baseadas em nitrogênio, redução das citocinas, limitação da peroxidação lipídica e a oxidação protéica. Tanto a melatonina como os seus metabólitos tem a capacidade de destoxificação de radicais livres, inclusive possuem ação antioxidante quatro vezes mais eficiente que o trolox, um análogo da vitamina E, na peroxidação lipídica, diminuindo assim a concentração necessária para o seu efeito antioxidante (ROSALES-CORRAL, *et al.*, 2003).

O efeito antioxidante da melatonina ocorre em função da capacidade quelante de radicais de oxigênio e nitrogênio, incluindo o radical hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), molécula de oxigênio (O_2), óxido nítrico (NO) e ânion de peroxinitrito (ONOO^-) (RAO & GANGADHARAM, 2008).

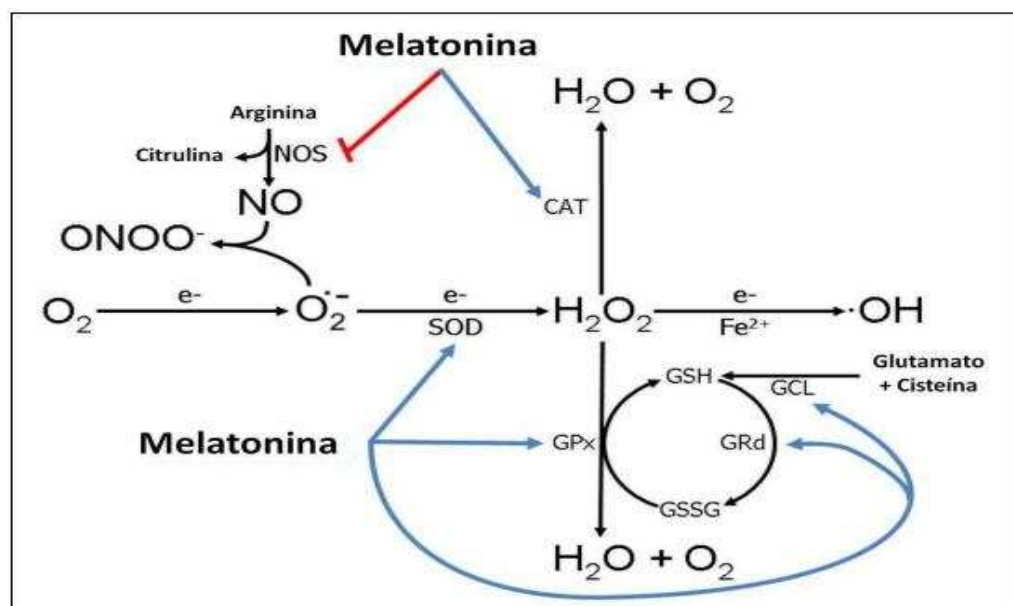


Figura 1: Ações da melatonina reduzindo radicais livres. A melatonina estimula muitas enzimas antioxidantes incluindo a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GRd) e glutamilglicina ligase (GCL); e também, inibe enzimas pró oxidativas como, óxido nítrico sintase (NOS). O radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) 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 possui vários efeitos a nível mitocondrial que melhoram o bem estar celular, impedindo a apoptose e realizando também a mediação da cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, causando o aumento da produção de ATP em células normais.

O possível papel da melatonina como agente bioenergético de manutenção da função mitocondrial tem também algum interesse. A maior parte do oxigênio molecular inalado é processado na cadeia de transferência de elétrons mitocondrial, sendo convertido em água após quatro reduções eletrônicas. Contudo, neste processo de redução as espécies parcialmente reduzidas de oxigênio produzem espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, tais como o óxido nítrico, através da enzima mitocondrial NOS (óxido nítrico síntase). O óxido nítrico, apesar de atuar como regulador fisiológico da respiração e do ritmo de síntese de ATP, quando atinge níveis elevados pode inibir os complexos I e III. Neste caso, a transferência de elétrons fica comprometida, ocorrendo uma perda de elétrons e conseqüente formação de O_2^- e outros oxidantes. A importância da melatonina na viabilidade espermática foi verificado com a presença deste hormônio no plasma seminal tanto de humanos (LUBOSHITZKY & LAVIE, 2002) como de carneiros (CASAO, et al., 2010).

A adição de melatonina (em concentrações de 0,001 a 1mM) no diluente de congelamento de carneiros, apresentou maiores porcentagens de espermatozoides viáveis na concentração de 1mM (SUCCU, *et al.*, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comissão de ética

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, sob o número de processo do projeto nº81/2014 e foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a legislação vigente.

3.2. Local e período de experimentação

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Setor de Caprinocultura e no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, nas coordenadas geográficas de 20°45'14'', latitude sul, e meridiano 42°52'54'' longitude oeste, altitude média de 752,5 m de altitude. A temperatura média anual é de 18,5 °C, índice pluviométrico anual de 1221,4 mm e o clima da região é, segundo a classificação de Köppen, do tipo Cwa - clima tropical de altitude com inverno seco e verão chuvoso. O período experimental foi de outubro a novembro de 2015, período este em que os animais se encontravam em estação de monta induzida.

3.3. Animais, alimentação e sanidade.

Foram utilizados como doadores de sêmen quatro reprodutores caprinos adultos com idade variando entre um ano e meio e três anos, das raças Alpina (n = 2) e Saanen (n = 2), hípidos e com histórico de fertilidade comprovada. Antes do período experimental, os animais foram submetidos ao exame andrológico e aprovados para reprodução, de acordo com os padrões seminais para a espécie do Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Os animais foram mantidos em baias individuais, com alimentação volumosa fornecida duas vezes ao dia composta de silagem de milho e concentrado protéico (550 g/ dia), bem como mistura mineral e água *ad libitum*, atendendo às exigências nutricionais da categoria de acordo com o National Research Council – NRC (2007). Os animais foram submetidos a exame clínico periodicamente.

3.4. Delineamento experimental

Seis partidas (ejaculados) foram coletados e fracionados de quatro reprodutores caprinos, saudáveis e com fertilidade comprovada. Foi utilizado o diluente comercial Botu-bov^{®1}, constituindo esse o diluente base para os tratamentos 1 a 9. Os tratamentos testados diferiram quanto às concentrações espermáticas associadas ou não à melatonina². Desta forma, os tratamentos foram distribuídos conforme segue:

1. Botupharma, Botucatu, SP, Brasil

2. M5250, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA

Tratamento 1: 40×10^6 espermatozoides sem antioxidante(Controle)

Tratamento 2: 40×10^6 espermatozoides com $1\mu\text{M}$ de Melatonina

Tratamento 3: 40×10^6 espermatozoides com $100\mu\text{M}$ de Melatonina

Tratamento 4: 80×10^6 espermatozoides sem antioxidante

Tratamento 5: 80×10^6 espermatozoides com $1\mu\text{M}$ de Melatonina

Tratamento 6: 80×10^6 espermatozoides com $100\mu\text{M}$ de Melatonina

Tratamento 7: 100×10^6 espermatozoides sem antioxidante

Tratamento 8: 100×10^6 espermatozoides com $1\mu\text{M}$ de Melatonina

Tratamento 9: 100×10^6 espermatozoides com $100\mu\text{M}$ de Melatonina

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 09X02 (09 tratamentos x 02 raças)

3.5. Colheita de sêmen

O esgotamento das reservas extra-gonádicas de todos os bodes foi obtido mediante colheitas de sêmen diárias, por cinco dias consecutivos seguidos por dois dias de descanso sexual. As coletas de sêmen foram realizadas com intervalo de 48 horas, durante o período matutino, nos meses de agosto e setembro de 2015. Foram coletados seis ejaculados por animal, totalizando 24 ejaculados. Foram utilizadas como manequim, fêmeas em estro induzido pela aplicação semanal de 1 mg de cipionato de estradiol pela via intramuscular. As fêmeas foram mantidas em tronco de contenção adequado para a espécie.

O método de coleta empregado foi o da vagina artificial modelo curto (Modificado de MIES FILHO, 1987) com água aquecida entre 42°C e 44°C no momento da colheita. Como revestimento da mucosa da vagina artificial, foram utilizados sacos plásticos em forma de funil (camisa sanitária), onde na extremidade mais estreita foi inserido um tubo de centrífuga de plástico graduado (15ml). Esse mesmo tubo foi revestido externamente com papel alumínio para evitar mudanças bruscas de temperatura e radiação solar. O tubo com o ejaculado foi encaminhado o

mais rápido possível ao laboratório, para realizar avaliações físicas e logo após o processamento do sêmen para a criopreservação.

3.6. Análises físicas do sêmen

Os tubos de coleta de sêmen ficaram em suportes sobre a bancada do laboratório, em temperatura ambiente, juntamente com o diluente de cada tratamento, os quais foram retirados do banho-maria a 37°C assim que o sêmen coletado chegou ao laboratório.

Todo material utilizado como lâminas, lamínulas, ponteiras e recipientes durante a avaliação do sêmen foi previamente aquecido a 37°C em uma placa aquecedora.

O volume da amostra foi verificado por meio de leitura direta no tubo de coleta (graduado) e registrado em mililitros (mL).

O aspecto e coloração do ejaculado foram verificados visualmente e inferido valor de acordo com escalas pré-definidas para aspecto (1: aquoso, 2: leitoso, 3 cremoso) e coloração (1: branca, 2: branco-amarelada, 3: amarelada).

O turbilhonamento foi avaliado por meio da deposição de uma gota de sêmen (10µL) em lâmina, observando em microscópio de luz no aumento de 100X para posterior classificação em escala de zero a cinco, admitindo-se zero como ausência de parâmetro e cinco, como valor máximo para o movimento de massa.

Em uma lâmina escavada foi colocado 10µL do sêmen e 100 µL do diluente, que depois de homogeneizado, foi retirada uma alíquota de 10 µL para realizar a avaliação da motilidade e vigor. A observação foi feita em microscópio de luz, no aumento de 200X, utilizando-se lâminas e lamínulas pré-aquecidas.

No parâmetro motilidade foram atribuídas notas percentuais subjetivas de zero a 100% em relação à quantidade de espermatozoides móveis totais, enquanto para o vigor, os valores de zero a cinco foram atribuídos conforme a intensidade e velocidade do movimento.

Para realização da concentração espermática, o sêmen foi diluído em água destilada, na proporção de 1:400 (água:diluidor), utilizando-se a pipeta de volume variável. Preenchida a câmara de Neubauer, o material foi levado ao microscópio de contraste de fase em aumento de 40 vezes para quantificação do número de células espermáticas por mL (FONSECA et al., 1992).

3.7. Diluição do sêmen

Os tubos que continham o diluente para os diferentes tratamentos foram retirados do banho-maria e colocados sobre a bancada do laboratório (temperatura ambiente), juntamente com o sêmen recém - coletado. Após as avaliações físicas e cálculo da concentração do ejaculado, o diluente foi adicionado à amostra de sêmen de acordo com as concentrações de cada tratamento.

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 mL, e lacradas com massa de modelar atóxica.

3.8. Resfriamento do sêmen

Após o envase, as palhetas foram colocadas em tubos de ensaio de vidro (15 mL). Em seguida, os tubos de ensaio revestidos por um refil (saco plástico) foram acondicionados em recipientes plásticos (240 mL) contendo 120 mL de álcool absoluto, e mantidos em temperatura ambiente. Logo após, o conjunto foi levado ao interior de uma geladeira, permanecendo na posição horizontal em temperatura de cinco graus Celsius, por três horas.

3.9. Congelamento do sêmen

Após o período de resfriamento e equilíbrio, as palhetas (IMV^{®3}) foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido, sendo as mesmas colocadas, rapidamente, à altura de 5 cm do nitrogênio líquido, na posição horizontal, em uma grade de suporte, por 15 minutos. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido e, em seguida, acondicionadas em raques identificadas para serem armazenadas em botijão criogênico até a sua avaliação.

3. 10. Descongelamento e análises do sêmen

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, por 30 segundos e, posteriormente, secas em papel toalha evitando o atrito entre o papel e a palheta. Em seguida, realizaram-se as avaliações de rotina de acordo com os parâmetros mínimos exigidos pelo CBRA para o sêmen caprino descongelado, conforme a tabela 1, bem como a avaliação por meio de testes complementares, como o teste de termorresistência, morfológico e o hiposmótico.

3. IMV, Aigle, França.

Tabela 1 -Valores mínimos para características seminais pós-descongelamento parabodes doadores de sêmen (CBRA, 2013).

PARÂMETROS	VALOR
Motilidade (%)	30
Vigor	2
Espermatozoides normais (%)	80
Concentração de espermatozoides /mL com motilidade progressiva	40 x 10 ⁶

Fonte:CBRA,2013.

3. 11. Teste de termorresistência

A longevidade dos espermatozoides foi avaliada pelo teste de termorresistência (TTR), que consistiu em colocar uma amostra de sêmen de 0,25 mL, referente a cada tratamento a ser avaliado, em micro tubo do tipo ependorff de 1,5mL, e incubando a 37°C por um período de até 90minutos. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados pelo TTR nos tempos de cinco, 30,60 e 90 minutos.

Para observação da motilidade e do vigor, os procedimentos adotados foram os mesmos descritos anteriormente para análise do sêmen fresco. No tempo de cinco minutos também foi retirada alíquota do sêmen para o teste de funcionalidade da membrana (teste hiposmótico).

3. 12. Teste morfológico

Em um microtubo plástico de 1,5mL contendo 1mL de solução fixadora de formol salina tamponada (HANCOCK, 1957) foram acondicionadas alíquotas do sêmen suficiente para turvar a solução, para análise morfológica dos espermatozoides por meio de preparação úmida e com auxílio de contraste de fase em aumento de 1000 X. Foram contabilizadas 100 células segundo os critérios adotados por Blom (1973) quanto às anormalidades totais.

3. 13. Teste hiposmótico

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo Teste hiposmótico, utilizando-se solução hiposmótica de 100 mOsmol/Kg como preconizado por SOUZA *et al.*, (2000) e por FONSECA *et al.*, (2001). Para o preparo da solução hiposmótica foram dissolvidos em 1000 mL de água deionizada, nove gramas de frutose e 4,9 g de citratotrisódico (REVELL & MRODE, 1994).

Uma alíquota de 20µL de sêmen foi adicionada a uma mL de solução hiposmótica e incubada por meia hora em banho-maria a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL de solução de formol-salina tamponada às amostras de sêmen para fixação das mesmas.

Posteriormente uma amostra foi montada entre lâmina e lamínula e analisada em microscopia de contraste de fase, em aumento de 400X, onde foram analisados 200 espermatozoides por amostra. Os espermatozoides foram classificados quanto à presença ou não de cauda enrolada, sendo classificados como normais aqueles que apresentaram cauda enrolada (reativos ao teste) e aqueles com cauda reta, foram classificados como membrana lesada.

3. 14. Citometria de fluxo

Embora o uso de sondas fluorescentes pela microscopia óptica de fluorescência venha sendo um método para avaliação da célula espermática bastante utilizado, o número de espermatozoides normalmente examinados por análise não excede 200. A citometria de fluxo surge como técnica vantajosa sobre as outras convencionais para avaliação da viabilidade e integridade espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar mais de 10.000 espermatozoides em menos de um minuto, permitindo maior exatidão nos resultados e diminuição no tempo de preparação requerido em outras técnicas fluorescentes (ARRUDA et al., 2007).

A análise por citometria de fluxo das amostras foi realizada em aparelho BD FACSVersTM 4, 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 700/54nm), 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 bode de fertilidade comprovada, diluídas em DMPBS a 5×10^6 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 também foram excluídas (FREITAS, 2015).

As amostras foram primeiramente analisadas sem corantes, para que assim fosse determinado 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 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 era estipulado como padrão (FREITAS, 2015).

3. 15. 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 isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), uma 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 (CELEGUINI *et al.*, 2007).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, foi seguido o protocolo proposto por Oliveira *et al.* (2012) modificado. Uma alíquota de 150 μ L de sêmen diluído em DMPBS⁵ (5×10^6 sptz/mL) foi incubada com 10 μ L de FITC-PSA⁶ (100 μ g/mL; anexo A) e 3 μ L de IP⁷ (0,5 mg/mL; anexo A) em microtubos plásticos (2mL) dispostos em banho maria a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 μ L de PBS e a amostra destinada à leitura no aparelho. Em cada amostra foram analisadas 10.000 células, numa taxa de aproximadamente 200 células segundo, nos filtros A (FITC-PSA, lesão acrossomal) e C (IP, lesão de membrana plasmática) e excitação de 488nm.

5. DMPBS, Flush, Nutricell®, Campinas, SP, Brasil.

6. L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA

7. P-4170, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA

Foi possível a observação de quatro categorias celulares (figura 1), de acordo com as combinações de lesão de membrana plasmática e de acrossoma: (UL) IP+PSA-, espermatozoides com membrana plasmática lesionada; (UR) IP+PSA+, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionada; (LR) IP-PSA+, espermatozoides com acrossoma lesionado; e (LL) IP-PSA-, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras.

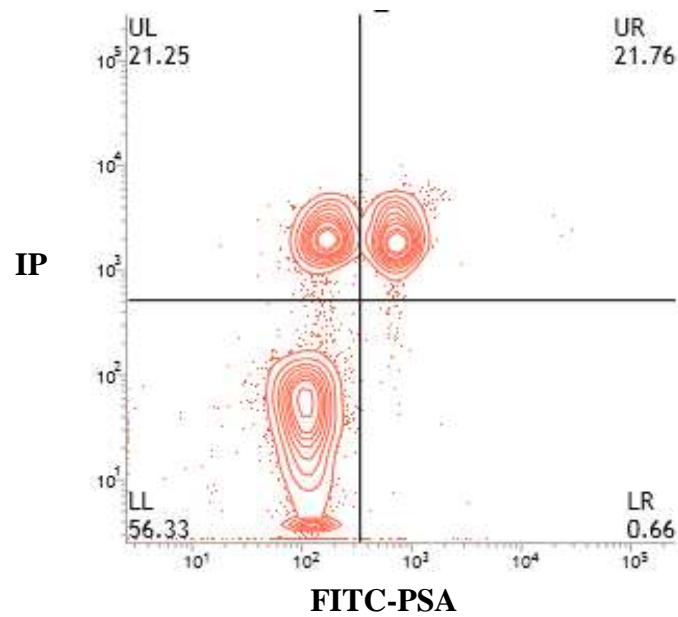


Figura 2: Classificação de espermatozoides em quatro categorias: LL, células com membrana plasmática e acrossomal íntegras; UL, células com membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro; UR, células com lesão de membrana e acrossomal; LR, células com membrana plasmática íntegra e acrossoma lesionado.

3. 16. Avaliação do potencial de membrana (JC-1)

O potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) espermático foi avaliado mediante a utilização da sonda JC-1⁸(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 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 determinado 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 DMPBS (5×10^6 spz/mL) foi incubada com 0,5 μ L JC-1 (153 μ M; anexo A) 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 médio (figura 2).

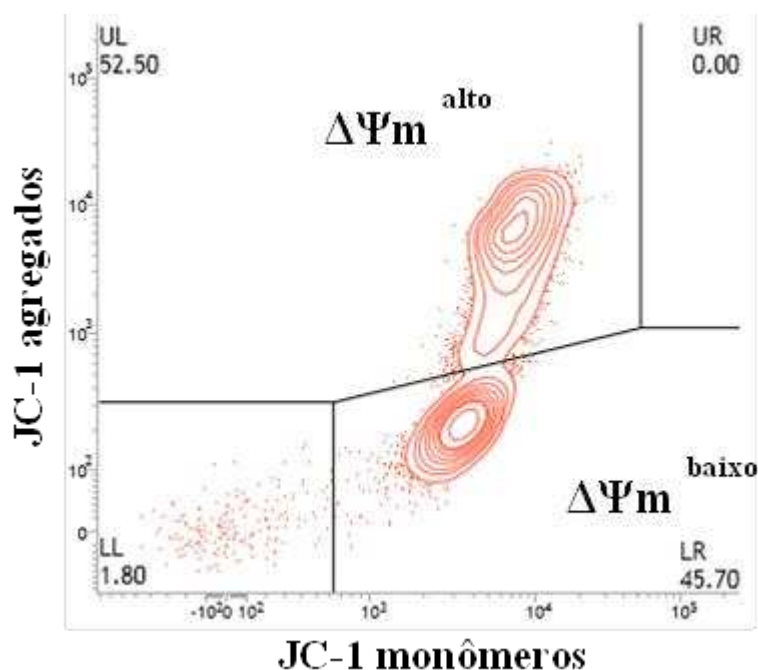


Figura 3: Gráfico de contorno (contour plot) gerado pela análise do sêmen caprino por citometria de fluxo, em amostra corada com JC-1, permitindo a classificação de

espermatozoides com alto potencial mitocondrial (UR, $\Delta\Psi_m^{\text{alto}}$) e baixo potencial mitocondrial (LR, $\Delta\Psi_m^{\text{baixo}}$).

3. 17. 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 diclorodihidrofluorosceína (DCFDA⁹), 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 protocolo proposto por Marcias-Garcia et al. (2012a). Uma alíquota de 500 μL da amostra diluída em meio PBS (5×10^6 sptz/mL) foi adicionada a um microtubo (2,0 mL) aquecido em banho Maria a 37 °C, e corada com 0,5 μL DCFDA (1 mg/mL; anexo A) durante 30 minutos. Após esse período, 150 μL da amostra incubada foi corada com 3 μL de IP, permanecendo incubada por 5 minutos. Foram então adicionados 150 μL de PBS e seguiu-se a leitura no citômetro de fluxo, sendo contabilizadas 10.000 células de cada amostra, numa taxa de 400 células/segundo, com os filtros A (CFDA oxidado) e C (IP, células não viáveis) e excitação de 488 nm.

Foram observadas quatro populações celulares (figura 4a): (UL) IP+DCFDA-, espermatozoides mortos sem peróxido de hidrogênio intracelular; (UR) IP+DCFDA+, espermatozoides mortos com peróxido de hidrogênio intracelular; (LR) IP-DCFDA+, espermatozoides vivos com peróxido de hidrogênio intracelular; (LL) IP-DCFDA-, espermatozoides vivos sem peróxido de hidrogênio intracelular.

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 viáveis captada no filtro A em relação a essa população (figura 4b).

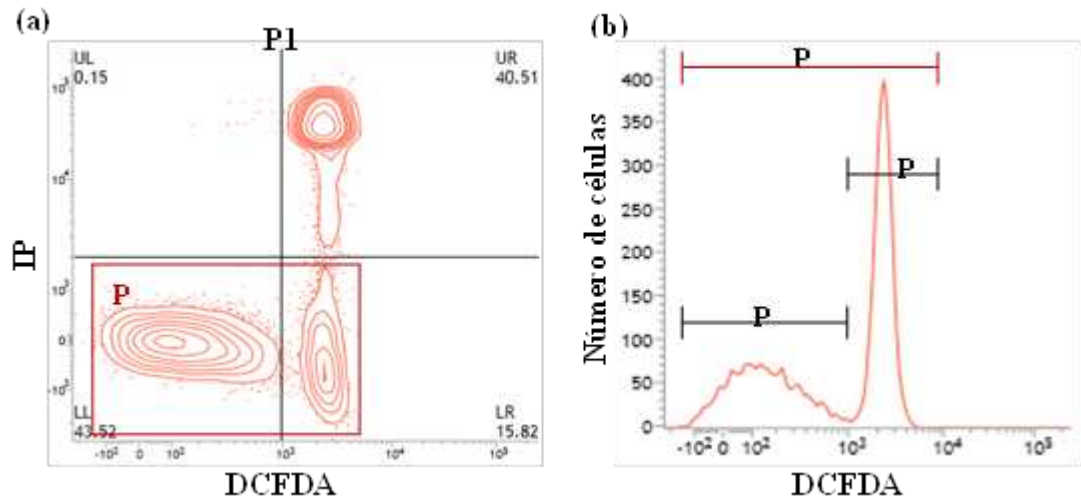


Figura 4: (a) Gráfico de contorno (contour plot) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com IP e DCFDA, permitindo a classificação de espermatozoides em quatro categorias: LL, células com membrana plasmática íntegra sem peróxido de hidrogênio intracelular; UL, células com membrana 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.

3.18. Análises estatísticas

Para a análise dos dados foi utilizado o *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas (*split plot*) e arranjo fatorial 3 x 3, sendo a raça considerada o fator primário e as concentrações espermáticas e de melatonina os fatores secundários, de acordo com o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + e(R)_i + M_j + C_k + (RM)_{ij} + (RC)_{ik} + (MC)_{jk} + (RMC)_{ijk} + e(S)_{jk}$$

Y_{ij} = resposta observada;

μ = constante geral;

R_i = efeito referente à raça;

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

M_j = efeito referente às concentrações de melatonina;

C_k = efeito referente às concentrações de espermatozoides;

$(RM)_{ij}$ = efeito de interação da raça e concentrações de melatonina;

$(RC)_{ik}$ = efeito de interação da raça e concentrações de espermatozoides;

$(MC)_{jk}$ = efeito de interação das concentrações de melatonina e de espermatozoides;

$(RMC)_{ijk}$ = efeito de interação tripla;

$e(s)_j$ = erro aleatório referente aos efeitos secundários (resíduo b).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, as características de todos ejaculados obtidos durante o período experimental apresentaram-se dentro dos padrões preconizados pelo CBRA (2013). Em conjunto, essas características auxiliam na análise dos parâmetros seminais para processamento e utilização *in vivo* ou *in vitro* do mesmo. (tabela 2).

Tabela 2: Médias \pm erros padrão da média das características físicas de sêmen a fresco obtidos de reprodutores caprinos.

Parâmetros	Reprodutores			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
Volume	1.72 \pm 0.16 ^b	1.50 \pm 0.22 ^{bc}	3.00 \pm 0.13 ^a	0.97 \pm 0.13 ^c
Aspecto	1.83 \pm 0.17 ^A	1.67 \pm 0.21 ^A	1.83 \pm 0.31 ^A	2.00 \pm 0.26 ^A
Col	1.83 \pm 0.17 ^{AB}	1.33 \pm 0.21 ^B	2.00 \pm 0.00 ^A	2.00 \pm 0.00 ^A
Turb	2.33 \pm 0.33 ^A	3.17 \pm 0.17 ^A	3.00 \pm 0.26 ^A	3.00 \pm 0.26 ^A
Motf	71.67 \pm 1.67 ^b	78.33 \pm 1.67 ^{ab}	76.67 \pm 2.11 ^{ab}	80.00 \pm 2.58 ^a
Vigf	3.00 \pm 0.00 ^A	3.00 \pm 0.00 ^A	3.00 \pm 0.00 ^A	3.17 \pm 0.17 ^A
Conc	3.79 \pm 0.63 ^a	3.78 \pm 0.78 ^a	2.67 \pm 0.48 ^a	3.35 \pm 0.96 ^a
Morff	36.00 \pm 1.53 ^a	25.67 \pm 2.17 ^b	22.17 \pm 1.94 ^b	21.33 \pm 1.20 ^b
Hostf	60.00 \pm 3.42 ^b	79.17 \pm 1.80 ^a	81.67 \pm 0.95 ^a	83.50 \pm 0.92 ^a

Na mesma linha, letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey; letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis.

A motilidade progressiva (0-100%) apresentou diferença ($P < 0.05$) e o vigor (0-5) apresentou médias semelhantes entre os animais, porém as médias ficaram dentro do recomendado pelo CBRA (2013) para sêmen fresco de caprinos, que é de 80 (70-90)% e 3 para vigor espermático. O mesmo foi verificado por Coloma et al. (2011). A motilidade e o vigor espermático são os principais e mais comuns parâmetros utilizados na avaliação seminal para predizer a qualidade seminal, pois apresentam correlação positiva com a fertilidade do sêmen (CORREA et al., 1997).

Os valores médios entre os animais verificados nesse trabalho para a concentração espermática, durante o período experimental, estão de acordo com Castelo et al (2008), que descreveram como normal uma concentração variando de 2,5 – 5,0 X 10⁹ espermatozoides/mL para caprinos. Esses valores também ficaram acima do mínimo recomendado pelo CBRA (2013), que é de 2 x 10⁹ espermatozoides/mL.

Tabela 3: Médias \pm erros padrão das características físicas de sêmen a fresco obtidos de reprodutores caprinos da raça Alpina e Saanen.

Parâmetros	Raça	
	Alpina	Saanen
Volume	1.61 \pm 0.14 ^a	1.98 \pm 0.32 ^a
Aspecto	1.75 \pm 0.13 ^A	1.92 \pm 0.19 ^A
Cor	1.58 \pm 0.15 ^B	2.00 \pm 0.00 ^A
Turb	2.75 \pm 0.22 ^A	3.00 \pm 0.17 ^A
Motf	75.00 \pm 1.51 ^a	78.33 \pm 1.67 ^a
Vigf	3.00 \pm 0.00 ^A	3.08 \pm 0.08 ^A
Conc	3.78 \pm 0.48 ^a	3.01 \pm 0.52 ^a
Morff	30.83 \pm 2.01 ^a	21.75 \pm 1.09 ^b
Hostf	69.58 \pm 3.43 ^b	82.58 \pm 0.69 ^a

Na mesma linha, letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey; letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis.

Na morfologia espermática (tabela 3), a raça alpina apresentou um maior número de anormalidades espermáticas em relação à raça saanen e uma menor porcentagem de células com membranas funcionais (HOST).

Na motilidade progressiva pós-descongelamento, foi encontrada diferença ($P < 0,05$) entre as concentrações de melatonina zero, com $33,19 \pm 1,02$; 1 μM de melatonina, com $35,42 \pm 0,95$ e 100 μM de melatonina, com $40,28 \pm 1,10$, como se observa na Tabela 4.

Tais resultados corroboram com estudos conduzidos por Casao et al. (2010) ao incubar o sêmen de carneiro com melatonina nas concentrações de 1 μM , 10nM e 100pM e verificaram que não houve influência da melatonina nos parâmetros de motilidade e de viabilidade espermática, mas são inferiores aos descritos por El-Raey (2015), que obtiveram motilidade de $60.0 \pm 2,9$ quando utilizaram concentração de 1mM de melatonina.

Succu et al. (2011) adicionaram melatonina (em concentrações de 0,001 a 1mM) no diluente de congelação de carneiros e verificaram que a concentração de 1mM apresentou maior motilidade progressiva de $45,9 \pm 3,1$.

Tabela 4: Médias \pm erros padrão da motilidade espermática total de amostras de sêmen de bodes congelado com diferentes concentrações de melatonina e avaliadas pelo teste de termo resistência em intervalos de 60 minutos após descongelamento.

Tempo do TTR	Melatonina		
	0	1 μ M	100 μ M
0	33.19 \pm 1.02 ^c	35.42 \pm 0.95 ^b	40.28 \pm 1.10 ^a
60	19.38 \pm 1.18 ^b	20.18 \pm 1.10 ^b	25.56 \pm 1.47 ^a
120	8.33 \pm 0.83 ^b	6.81 \pm 0.63 ^b	15.14 \pm 1.32 ^a
180	3.40 \pm 0.51 ^a	1.60 \pm 0.42 ^b	4.24 \pm 0.70 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey

Tabela 5: Médias \pm erros padrão da motilidade espermática total de amostras de sêmen de bodes congelado com diferentes concentrações espermáticas (10^6 espermatozoides/dose) e avaliadas pelo teste de termo resistência em intervalos de 60 minutos após descongelamento.

Tempo do TTR	Concentração		
	40	80	100
0	40.56 \pm 0.97 ^a	36.39 \pm 1.03 ^b	31.94 \pm 1.00 ^c
60	27.54 \pm 0.95 ^a	22.29 \pm 1.29 ^b	15.28 \pm 1.20 ^c
120	11.74 \pm 1.12 ^a	12.29 \pm 1.22 ^a	6.25 \pm 0.57 ^b
180	3.06 \pm 0.50 ^{ab}	4.31 \pm 0.70 ^a	1.88 \pm 0.44 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey.

O teste de termorresistência permitiu avaliar a motilidade e vigor das amostras criopreservadas durante três horas, em intervalos de uma hora, a uma temperatura de 37 °C, mimetizando a permanência do sêmen nos órgãos genitais femininos. Os valores encontrados para a motilidade estão dispostos nas Tabelas 4 e 5. Em todos os tempos avaliados, a concentração de 100 μ M de melatonina apresentou maiores valores médios ($P < 0,05$) em relação às demais concentrações avaliadas

Peixoto et al. (2008), em seus experimentos de criopreservação de sêmen ovino com meio diluente tris-gema acrescido ao ácido ascórbico e Trolox, encontraram motilidade progressiva após uma hora de incubação das amostras de sêmen a 37 °C de 20,0% \pm 5,0 e 15,0% \pm 5,0 para o grupo controle e o grupo suplementado com 600M/L de ácido ascórbico, respectivamente.

Esses achados são inferiores aos obtidos por D'Alessandro et al. (2001), que encontraram motilidade da ordem de 44,5%, 59,9% e 52,6% para o final da incubação em três horas em doses de sêmen ovino criopreservado, em meio tris-

gema nas concentrações de 20, 40 e 80 milhões de espermatozoides, respectivamente.

Os resultados de motilidade espermática progressiva encontrados neste ensaio para o TTR estão de acordo com as exigências do CBRA (1998), que aponta motilidade de 30% e vigor 2 após 5 minutos de avaliação do sêmen descongelado em banho-maria a 37 °C, para atestar como viáveis amostras seminais criopreservadas provenientes da espécie caprina.

Observando esses achados, outro fator que pode ter interferido na não observação das ações antioxidativas da inclusão da melatonina ao meio diluente é o fato de ter trabalhado com sêmen com poucas alterações morfológicas, pois de acordo com Agarwal et al. (2005) e Castro (2010), a produção de ROS acontece de maneira mais evidenciada quando ocorre grande quantidade de espermatozoides com gota protoplasmática e/ou uma grande quantidade de leucócitos.

Os neutrófilos produzem e liberam elevadas concentrações de ROS próximo às células e patógenos para formar reações citotóxicas, sendo essa síntese de ROS a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores. Outra importante fonte de ROS no sêmen são os espermatozoides imaturos, Os resíduos citoplasmáticos dessas células contêm elevados níveis da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase, que forma o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida). O NADPH posteriormente forma ROS via NADPH oxidase na membrana espermática (BAUMBER et al., 2000; BARBOSA, 2009).

Talvez a ação antioxidante da melatonina se apresente e melhore as qualidades seminais de bodes com baixo padrão de qualidade do sêmen a ser criopreservado, conforme mostraram Garcez et al. (2010), congelando sêmen humano, em que foram observadas melhoras nas atividades antioxidativas das enzimas superóxido dismutase e catalase no material processado proveniente de homens inférteis quando utilizaram o agente antioxidante resveratrol para suplementar o meio diluente.

Essa observação foi feita também por Borges (2008), quando experimentou o antioxidante Trolox na suplementação do meio tris-gema para congelar sêmen bovino. Quando analisou o grupo com e sem antioxidante, esse autor não observou diferença ($P > 0,05$) nas características seminais e fertilidade pós-inseminação, mas, quando separou os touros pela qualidade espermática, percebeu melhora significativa na fertilidade in vitro e in vivo do sêmen criopreservado com o antioxidante.

As concentrações espermáticas utilizadas no experimento não afetou os parâmetros seminais avaliados in vitro. Esses resultados corroboram os achados de Silva (2013), que não encontrou diferenças significativas nos testes de fertilidade in vitro e in vivo, recomendando a possibilidade de se trabalhar com doses mais baixas de espermatozoides, aumentando a quantidade de doses produzidas na criopreservação.

De acordo com Leahy et al. (2010), doses criopreservadas com altas concentrações espermáticas afetam negativamente a fertilidade pela elevada produção de metabólitos que irão promover o estresse oxidativo naquele meio, enquanto doses mais diluídas, de acordo com Gundongan et al. (2010) perdem sua proteção antioxidativa natural presente no plasma seminal, sendo eles expostos também à ação nociva das ROS.

Tabela 5: Médias \pm erros padrão da motilidade espermática total de amostras de sêmen de bodes congelado com diferentes concentrações espermáticas (10^6 espermatozoides/dose) e avaliadas pelo teste de termo resistência no tempo 5' após descongelamento.

Melat	Parda			Saanen		
	Concentração			Concentração		
	40	80	100	40	80	100
0	32.5 \pm 1.7 ^{abB2}	27.5 \pm 1.7 ^{abB1}	24.1 \pm 1.4 ^{baA2}	43.3 \pm 1.8 ^{aAB1}	33.3 \pm 1.8 ^{bbB1}	38.3 \pm 1.6 ^{abA1}
1 μ M	35.8 \pm 1.9 ^{aAB1}	30.8 \pm 0.8 ^{abB1}	25.8 \pm 1.4 ^{baA2}	40.0 \pm 2.1 ^{aB1}	38.3 \pm 1.6 ^{abB1}	41.6 \pm 2.0 ^{aA1}
100 μ M	42.5 \pm 2.1 ^{aA1}	40.8 \pm 2.2 ^{aA1}	27.5 \pm 1.3 ^{baA1}	49.1 \pm 0.8 ^{aA1}	47.5 \pm 1.3 ^{aA1}	34.1 \pm 1.4 ^{baA1}

Letras minúsculas na linha mostram diferença dentro de cada raça;

Letras maiúsculas na coluna diferem;

Números na linha mostram diferença entre raças para cada concentração.

Melat, concentrações de melatonina.

De acordo com os dados apresentados na tabela 5, houve interação tripla ($p < 0,05$) de melatonina, concentração e raça. Sendo que os valores médios da raça saanen se mostraram superiores tanto para concentração espermática, quanto para as concentrações de melatonina em relação aos valores de motilidade espermática da raça alpina.

Tabela 6. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio, de sêmen criopreservado de reprodutores caprinos, avaliadas por citometria de fluxo

DCFDA/IP	Melatonina		
	0	1 μ M	100 μ M
IP+DCFDA-	1.31 \pm 0.13	1.35 \pm 0.13	1.29 \pm 0.12
IP+DCFDA+	72.45 \pm 1.56	71.93 \pm 1.64	72.91 \pm 1.37
IP-DCFDA+	22.87 \pm 1.55	22.86 \pm 1.57	22.07 \pm 1.25
IP-DCFDA-	3.37 \pm 0.22	3.85 \pm 0.61	3.76 \pm 1.10
DCFDA-	4.68 \pm 0.21	5.20 \pm 0.59	5.05 \pm 1.06
IP-	26.24 \pm 1.59	26.71 \pm 1.68	25.84 \pm 1.41

P > 0.05; IP+DCFDA-, espermatozoides mortos sem peróxido de hidrogênio intracelular; IP+DCFDA+, espermatozoides mortos com peróxido de hidrogênio intracelular; IP-DCFDA+, espermatozoides vivos com peróxido de hidrogênio intracelular; IP-DCFDA-, espermatozoides vivos sem peróxido de hidrogênio intracelular.

As populações de células com ou sem peróxido de hidrogênio intracelular com ou sem membrana lesionada (tabela 6) não apresentaram diferenças entre as concentrações de melatonina (p>0,05)

A inibição da motilidade espermática em função do aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio intracelulares é consequência da redução na fosforilação de proteínas axonemais necessárias para o movimento espermático (LAMIRANDE & GAGNON, 1992). Esse processo ocorre antes de qualquer perda de integridade de membrana ou aumento na peroxidação lipídica (HYSLOP et al., 1986).

Tabela 7. Médias \pm erros padrão das porcentagens de concentrações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio, de sêmen criopreservado de reprodutores caprinos, avaliadas por citometria de fluxo

Concentração	DCFDA-PI+	DCFDA+PI+	DCFDA+PI -	PI -
40	1.35 \pm 0.14 ^a	71.43 \pm 1.58 ^a	23.84 \pm 1.59 ^a	.26 \pm 1.62 ^a
80	1.27 \pm 0.13 ^a	72.82 \pm 1.58 ^a	23.28 \pm 1.50 ^{ab}	.91 \pm 1.60 ^a
100	1.34 \pm 0.12 ^a	73.04 \pm 1.42 ^a	20.68 \pm 1.26 ^b	.62 \pm 1.46 ^a

Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

IP+DCFDA-, espermatozoides mortos sem peróxido de hidrogênio intracelular; IP+DCFDA+, espermatozoides mortos com peróxido de hidrogênio intracelular; IP-DCFDA+, espermatozoides vivos com peróxido de hidrogênio intracelular; IP-DCFDA-, espermatozoides vivos sem peróxido de hidrogênio intracelular.

Em relação à concentração espermática, foi observada maior proporção de células viáveis com presença de peróxido de hidrogênio intracelular nos tratamentos com concentração espermática de 40 e 80 x 10⁶ espermatozoide/mL, enquanto a menor proporção foi observada no tratamento com 100 x 10⁶ espermatozoide/mL (p<0,05) (tabela 7).

Tabela 8. Médias ± erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio, de sêmen criopreservado de reprodutores caprinos das raças Alpina e Saanen, avaliadas por citometria de fluxo.

Raça	DCFDA-PI+	DCFDA+PI+	DCFDA+PI -	PI -
Alpina	2.03 ± 0.11 ^a	78.10 ± 0.85 ^a	18.17 ± 0.85 ^a	19.90 ± 0.84 ^b
Saanen	0.61 ± 0.03 ^b	66.76 ± 1.32 ^b	27.03 ± 1.32 ^b	32.63 ± 1.33 ^a

Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

IP+DCFDA-, espermatozoides mortos sem peróxido de hidrogênio intracelular;
 IP+DCFDA+, espermatozoides mortos com peróxido de hidrogênio intracelular; IP-
 DCFDA+, espermatozoides vivos com peróxido de hidrogênio intracelular; IP-
 DCFDA-, espermatozoides vivos sem peróxido de hidrogênio intracelular

Em relação à raça, foi observado maior viabilidade celular com presença de peróxido de hidrogênio intracelular na raça saanen comparada a raça alpina (p<0,05). (tabela 8).

Tabela 9. Médias ± erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal, de sêmen de reprodutores caprinos, criopreservado com diferentes concentrações de melatonina, avaliadas por citometria de fluxo

Variáveis	Melatonina		
	0	1µM	100µM
PSA-IP+	28.82 ± 1.25 ^a	31.15 ± 1.68 ^a	28.74 ± 1.26 ^a
PSA + IP +	41.21 ± 1.96 ^a	40.54 ± 2.12 ^a	43.05 ± 1.98 ^a
PSA+IP-	1.03 ± 0.29 ^a	0.84 ± 0.11 ^a	2.11 ± 0.74 ^a
PSA - IP -	28.94 ± 1.88 ^a	27.48 ± 1.81 ^a	26.10 ± 1.81 ^a
PSA-	57.76 ± 1.93 ^{ab}	58.63 ± 2.09 ^a	54.84 ± 1.93 ^b
IP -	29.97 ± 1.97 ^a	28.32 ± 1.86 ^a	28.21 ± 1.89 ^a

Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

PSA-IP+, espermatozoide com membrana plasmática lesionada;
 PSA+IP+, espermatozoide com membrana plasmática e acrossomal lesionada;
 PSA+IP-, espermatozoide com acrossoma lesionado; PSA-IP-, espermatozoide com membrana plasmática e acrossomal íntegras.

Em relação às concentrações de melatonina, não foram observados diferenças nos valores médios da população de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras (tabela 9).

Tabela 10. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal, de sêmen de reprodutores caprinos, criopreservado com diferentes concentrações espermáticas, avaliadas por citometria de fluxo

Concentração	PSA+IP+	PSA+IP-	PSA-
40	40.64 \pm 2.09	1.58 \pm 0.60	57.78 \pm 1.99
80	41.19 \pm 2.05	0.86 \pm 0.12	57.95 \pm 2.01
100	42.96 \pm 1.92	1.54 \pm 0.51	55.50 \pm 1.97

P > 0.05; PSA+IP+, espermatozoide com membrana plasmática e acrossomal lesionada; PSA+IP-, espermatozoide com acrossoma lesionado; PSA-, espermatozoide com membrana plasmática íntegra.

De acordo com a tabela 10 não houve diferença entre os tratamentos com relação as variáveis analisadas.

As médias e o erro-padrão das médias do teste com sonda fluorescente (JC – 1), verificando células com alto e baixo potencial mitocondrial, estão sumariados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação ao potencial mitocondrial de espermatozoides criopreservados de bodes, avaliadas por citometria de fluxo

Melatonina	APM	BPM
0	12.92 \pm 1.33	85.06 \pm 1.41
1 μ M	13.78 \pm 1.36	84.54 \pm 1.44
100 μ M	14.42 \pm 1.37	83.50 \pm 1.46

P > 0.05; APM, alto potencial mitocondrial; BPM, médio potencial mitocondrial.

Em relação ao potencial mitocondrial (tabela 11), observou-se que não houve diferença entre os tratamentos com melatonina (p>0,05). Por outro lado, o fato do potencial mitocondrial das amostras tratadas com melatonina ter se apresentado insatisfatório, pode ser indicativo que esse aditivo não tenha exercido o seu efeito antioxidante nessas concentrações.

Tabela 12. Médias \pm erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação ao potencial mitocondrial de espermatozoides caprinos, criopreservado em diferentes concentrações espermáticas, avaliadas por citometria de fluxo

Concentração	APM	BPM
40	16.88 \pm 1.39 ^a	80.45 \pm 1.41 ^b
80	12.13 \pm 1.31 ^b	86.54 \pm 1.35 ^a
100	12.11 \pm 1.27 ^b	86.12 \pm 1.45 ^a

Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). APM, alto potencial mitocondrial; BPM, baixo potencial mitocondrial.

Em relação à concentração espermática, foi observado maior potencial mitocondrial ($p < 0,05$) no tratamentos com concentração espermática de 40×10^6 espermatozoide/mL, enquanto a menor proporção foi observada nos tratamentos com 80 e 100×10^6 espermatozoide/mL ($p < 0,05$) (tabela 12).

Observou-se neste estudo que as avaliações complementares em citometria de fluxo associada às sondas fluorescentes, mostraram-se indispensáveis na avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, bem como para a atividade mitocondrial na detecção de possível ocorrência da peroxidação lipídica nos espermatozoides caprinos congelados/descongelados.

Embora a melatonina seja uma indolamina reconhecida com uma forte ação antioxidante, em determinadas concentrações podem exercer atividade pró-oxidante, assim como na presença de íons metais de transição (CAO & CUTLER, 1997). Existem evidências de que esses metais induzem à autoxidação de alguns compostos gerando radicais e resultando em aumento da atividade redox na produção de ROS, incluindo H_2O_2 , provocando assim a liberação de cálcio intracelular (BREITBART et al., 1985) . Sendo assim, essas substâncias podem evitar ou estimular a capacitação espermática prematura e reação acrossomal, uma vez que esses processos são regulados pelas concentrações de cálcio intracelular.

As concentrações de $1\mu M$ e $100\mu M$ foram ineficientes diante das concentrações espermáticas avaliadas, reduzindo assim a ação antioxidante da melatonina.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos quanto à ação da Melatonina não foram satisfatórios, porém as concentrações utilizadas neste experimento mantiveram a viabilidade seminal de acordo com as características preconizadas pelo CBRA, mas não foram superiores ao tratamento controle. Sendo necessários novos estudos quanto à concentração ideal e sua interação com diferentes concentrações espermáticas, no congelamento de 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**, v.62 p.1160-1172, 2004.

AISEN, E.G. **Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: MedVet, v.1, 203p., 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. 2415-2526. 2010.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.;

VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea &Febiger, p. 715-745, 1993.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**. v.7, p.145-173, 1987.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGUINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 31, p. 8-16, 2007.

AZERÊDO, G. A., ESPER, C. R., RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v.41, p. 257-263,2001.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1-7. 2000.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**, 1^o edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p.285, 1989.

- BEYGI, A; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, p.117, 2007.
- BISPO, C.A.S.; PUGLIESI, G.; GALVÃO, P.; RODRIGUES, M.T.; KER, P.G.; FILGUEIRAS, B.; CARVALHO, G.R. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.100, p.54-58, 2011.
- CASAO, A.; MENDOZA, N.; PEREZ-PE, R.; GRASA, P.; ABECIA, J.A.; Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. **Journal Pineal Research**, 48v1, 39-46.2010.
- CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R.; Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinária Brasileira**, v.2, p.67-75, 2008.
- 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 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. **Reproduction Nutrition Development**, v. 26, p. 453-460, 1986.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3ª ed. Belo Horizonte. 104p. 2013.
- COLOMA, M. A.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; LÓPEZ-SEBASTIAN, A.; SANTIAGO-MORENO, J. The influence of washing Spanish ibex (*capra pyrenaica*) sperm on the effects of cryopreservation in dependency of the photoperiod. **Theriogenology**, v.73, p.900-908, 2010.
- COMHAIRE, F.H.; MAHMOUD, A.M.A.; DEPUYDT, C.E.; ZALATA, A.A.; CHRISTOPHE A.B. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potencial: the andrologist's viewpoint. **Human Reproduction**. v. 05, p. 393-398, 1999.

- 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.
- DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. **Theriogenology**, v.49, 831-841, 1997.
- 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, p. 231-239, 1985.
- EL-RAEY, M.; BADR, M.R.; ASSI, M.M.; RAWASH, Z.M. Effect of melatonin on buffalo bull sperm freezability, ultrastructure changes and fertilizing potentials. **Assiut Vet. Med. J.** Vol. 61. pag 201-208. 2015.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Australia: Butterworths Pty Limited, 194p. 1987.
- FARSTARD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v.42, 251-260, 1996.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica brasileira**, v. 43, n.1, p.61-68, 1997.
- FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Editora Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 72p. 1992.
- FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; SANTOS, A.D.F.; ROVAY, H. Hypoosmotic swellingtest in goats spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**.v.25, p 436-438, 2001.
- FOULKES J. A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.49, 277-284, 1977.

FRACZEK, M.; PIASECKA, M.; GACZARZEWICZ, D.; 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. **Efeito de diferentes crioprotetores e aditivos no diluente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça mangalarga marchador** Tese de doutorado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento 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. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.

HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; MATNORR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrossome – reacted goat sperm. **Biomedical Research**, v.16, p.119 – 123, 2005.

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 sêmen. **Japanese journal of Zootecnical Science**, v.10, p.57-64, 1964.

JONES, R., MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**.v.50, p 255-260, 1977.

KODAMA, H.; KURBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v.17, p. 151-157,1996.

KORKMAZ, A., TAN, D.X. Melatonin: na established antioxidant worthy of use in clinical trials. **Molecular Medicine**, 15 (1-2), 43-50. 2009.

KUNDU, C.N., CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G.C. Development of a simple sperm cryopreservation

model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.40, p. 117-125, 2000.

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. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.

LEBOEUF, B.; GUILLOUET, P.; BATELLIER, F.; Effect of native phosphor caseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**. V.60, p. 867-877, 2003.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier. 4ed. São Paulo. 2005.

LUBOSHITZKY, R.; LAVIE, P. Melatonin administration alters semen quality in helthy men. **Journal Andrology**. 23 v. 4, 572-578. 2002.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.33, p.183-193, 2009.

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

MAXWELL, W.M.C, WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**. v42,1-4, p 55-65, 1996.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353-1362, 1999.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v.24, p. 251-272, 1977.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p. 327-344, 2002.

MEMON, M. A.; BRETZLAFF, K. N.; OTT, R. S. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, p.473-475, 1985.

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, v.2, 701p, 1987.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados**, MS. 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NORDBERG, J., ARNÉR, E. S.J. Reactive oxygen species, antioxidante and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biologic Medical**, v.31, p. 1287-1312, 2001.

NRC – National Research Council. Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids. **Washington: National Academy Press**, 2007. 362p.

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

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**. v. 5, p. 399-420, 1999.

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.

- OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. **Biotécnicas Reprodutivas em ovinos e caprinos**. 1. Ed. São Paulo: Editora Medvet., 305 p. 2013
- 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.
- PARKS, J.E; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, 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, p. 1023-1031, 1997.
- POEGGELER, B. MANCHESTER, L.C. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. **Journal Pineal Research**, 14(4), 151-168. 1993
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p. 215-225, 2006.
- RAO, M.V.; GANGADHARAN, B. Antioxidative potential of melatonin against Mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. **Toxicol in vitro**, 22 v. 4. 935-942.2008
- REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, p. 77-86, 1994.
- RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluents on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Australian Journal of Biological Science**, v. 35, p. 305-312, 1982.
- RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. **Small Ruminant Research**, v.4, p.29-37, 1991.

RITAR, A. J.; BALL, P.D.; O'MAY, P.J. Artificial insemination of cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. **Reproduction Fertility and Development**, v.2, p. 377-384, 1990.

ROSALES-CORRAL, S., TAN, D.X., REITER, R.J., VALDIVIA-VELAZQUEZ, M., MARTINEZ-BARBOZA, G., ACOSTA-MARTINEZ, J.P., Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid-beta peptide in rat brain: a comparative, in vivo study versus vitamin C and E. **Journal Pineal Research**, 35 v.2, 80-84.2003

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

SAS Institute Inc 2002: **SAS/STAT[®] 9.0** User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SILVA, A.R.; FONTENELE, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; LOPES, M.D. Descrição de danos ultra-estruturais em espermatozoides caninos criopreservados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba-PR. **Anais...Belo Horizonte- MG: CBRA**, v.1, p.168, 2007.

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

SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes, **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972.

SNOECK, P.P. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade**. 2003, 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

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.

SOUSA, J.P.F.; BARBAS, J.P.; FERREIRA, G.M.B.C.; HORTA, A.E.M. Variação anual das características seminais em bodes da raça Serrana. In: Congresso de Zootecnia – “Progressos Zootécnicos nos Países de Língua Portuguesa”, **Anais...Vale de Santarém**, p.87. 2000.

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**, v.9, 1999.

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

TULI, R.K.; HOLTZ, W. Seminal characteristics of Boer goat bucks as affected by months and seasons of the year. In: CONFERENCE INTERNATIONAL ON GOATS, New Delhi, India, 1992. **Proceedings...** New Delhi, India, p.311, 1992.

UPRETI, G. C.; HALL, E. L.; KOPPENS, D.; OLIVER, J. E.; VISHWANATH, R. Studies on the measurement of phospholipase A₂ (PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.56, p.107-121,1999.

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

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.

WILHELM, K. H.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 33, p. 320-329. 1996.

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 µL = 0.1 g = 1 M

0,1 g de melatonina + 430 µL DMSO

2. MELATONINA (1µM)

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

3. MELATONINA (1 mM)

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

4. MELATONINA (100 µM)

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

ANEXO B

Diluições das sondas utilizadas na citometria de fluxo

1. IODETO DE PROPÍDEO (IP)

Solução estoque (25mg/mL = 40mM)

25 mg PI + 1mL DMSO

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

20µL SE + 980 µL PBS

2. FITC-PSA

Solução estoque (0,5 mg/mL)

2 mg FITC-PSA + 4 mL PBS

Solução de trabalho (100 µg/mL)

2 mg FITC-PSA + 20mL PBS

3. JC-1

Solução estoque (1,53 mM)

5 mg JC1 + 5 mL DMSO

Solução de trabalho (153 µM)

100 µL SE + 900 µL DMSO

4. DCFDA

Solução estoque I (50 mg/mL)

1 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