



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**EFEITO DA MELATONINA SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CONGELADO DE  
CAPRINOS**

**MILLENA MARIA MONTEIRO**

**RECIFE – PE**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**EFEITO DA MELATONINA SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CONGELADO DE  
CAPRINOS**

**MILLENA MARIA MONTEIRO**

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra

**RECIFE – PE**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

M775e Monteiro, Millena Maria  
Efeito da melatonina sobre a qualidade do sêmen caprino / Millena Maria Monteiro. –  
2017.  
64 f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2017.  
Inclui referências.

1. Criopreservação 2. Caprinos 3. Antioxidante 4. Melatonina I. Guerra, Maria Madalena  
Pessoa, orient. II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica

**EFEITO DA MELATONINA SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CONGELADO DE CAPRINOS**

---

MILLENA MARIA MONTEIRO

Dissertação aprovada em 24 de fevereiro de 2017

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra (DMV/UFRPE)

Orientadora

---

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro (UFRPE - UAG)

Membro Titular

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sildivane Valcácia Silva (CBiotec/UFPB)

Membro Titular

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ellen Cordeiro Bento da Silva (DMFA/UFRPE)

Membro Suplente

**Dedico esta dissertação aos meus pais (Célia e Walter),  
meu marido (Sérgio Tavares)  
e meu pequeno Lucca.**

**Com todo amor a vocês!**

**“E aprendi que se depende sempre de tanta, muita, diferente gente, toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas. É tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá. É tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho por mais que pense estar...”**

**(Caminhos do coração- Gonzaguinha)**

**“A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”**

**(Chico Xavier)**

## **AGRADECIMENTOS**

Considero uma parte extremamente delicada de escrever, pois jamais conseguirei expressar em palavras a importância que cada um tem em minha vida.

Agradeço primeiramente à Deus, pois sem a fé que Nele deposito, eu nada seria. E não posso esquecer da espiritualidade amiga que também me mantém de pé nas dificuldades da vida.

Aos meus pais, Célia e Walter, que sempre me motivaram com muito amor a nunca desistir e me deram todas as oportunidades e ferramentas para conquistar tudo o que hoje tenho.

À minha irmã, Marília, e meus sobrinhos, Marquinho e Artur, por todo amor e carinho.

Ao meu marido, Sérgio, por toda a paciência em aguentar as minhas crises com o Mestrado, por cuidar tão bem de mim com o maior mimo e atenção do mundo. E principalmente por ter me concedido meu menino, Lucca, que foi meu maior incentivo para finalizar essa fase da minha vida. Amo vocês!

À Prof<sup>a</sup> Madalena Guerra (orientadora) pela oportunidade e confiança em realizar mais esse trabalho junto a essa equipe incrível!

À toda família AndroLab (Pierre, Lucinha, Helder, Igor, Aline, Bruna, Thalles, Mergulhão, Julianne) por todo apoio, ensinamento e amizade. Especialmente à meus amigos que desde o início dessa jornada estiveram ao meu lado, sem vocês esses anos não teriam sido tão felizes.

Ao meu eterno professor, orientador e amigo, André Mariano, que palavras nunca serão suficientes para expressar minha gratidão, mas mesmo assim eu tento. Muitíssimo obrigada por tudo.

Agradeço a todos de coração que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho!

## **APOIO FINANCEIRO**

Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq



## SUMÁRIO

Página

<b>DEDICATÓRIA</b>	
<b>AGRADECIMENTOS</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Sêmen Caprino.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Diluidores Para o Sêmen Caprino.....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Diluidor a base de gema de ovo.....	17
2.2.2 Diluidor a base de leite desnatado.....	18
<b>2.3 Criopreservação de Sêmen Caprino.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Estresse Oxidativo e Antioxidantes.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Melatonina.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6 Sistema Computadorizado de Avaliação (CASA).....</b>	<b>24</b>
<b>2.7 Citometria de Fluxo.....</b>	<b>26</b>
2.7.1 Sondas fluorescentes utilizadas na citometria de fluxo.....	26
<b>3 REFERÊNCIAS</b>	
<b>BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	
<b>4 ARTIGO.....</b>	<b>45</b>
4.1 Efeitos da melatonina em diferentes diluidores de sêmen caprino.....	

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Fluxograma do delineamento experimental desde a obtenção do <i>pool</i> de sêmen, à formação dos grupos experimentais. LD: diluidor à base de leite desnatado. TGO: diluidor à base de Tris-gema de ovo.	49
<b>Figura 2.</b> Efeito de diferentes diluidores, suplementados ou não com melatonina, sobre a motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) do sêmen congelado-descongelado de caprinos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão da média). A, B: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diluidores (LD vs. TGO); x, y: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de incubação (T0 vs. T2); * quando presente, representa diferença ( $p < 0,05$ ) entre concentração de antioxidante (controle vs. tratamentos).	62
<b>Figura 3.</b> Efeito de diferentes diluidores, suplementados ou não com melatonina, sobre a cinética espermática do sêmen congelado-descongelado de caprinos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão da média). A, B: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diluidores (LD vs. TGO); x, y: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de incubação (T0 vs. T2); * quando presente, representa diferença ( $p < 0,05$ ) entre concentração de antioxidante (controle vs. tratamentos).	63
<b>Figura 4.</b> Efeito de diferentes diluidores, suplementados ou não com melatonina, sobre a qualidade do sêmen congelado-descongelado de caprinos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão da média). A, B: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diluidores (LD vs. TGO); x, y: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de incubação (T0 vs. T2); * quando presente, representa diferença ( $p < 0,05$ ) entre concentração de antioxidante (controle vs. tratamentos).	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

IA- Inseminação Artificial

CASA- Sistema de Análise Espermática Computadorizada

PBS- Fosfato Salino Tamponado

iPMA- integridade das membranas plasmática e acrossomal

PNA-*Peanut agglutinin*

DMSO- Dimetilsulfóxido

IP- Iodeto de Propídio

mV- milivolts

LIN - linearidade

MP- motilidade progressiva

MT – motilidade total

ROS – espécies reativas ao oxigênio

STR - retilinearidade

VAP – velocidade média da trajetória

VCL - velocidade curvilínea

VSL – velocidade em linha reta

RAP- Percentual de espermatozoides rápidos

ATP- adenosina trifosfato

DNA – ácido desoxirribonucleico

pH – potencial hidrogeniônico

## RESUMO

Objetivou-se neste estudo determinar o efeito da adição da melatonina a diferentes diluidores de criopreservação do sêmen caprino, sobre os parâmetros de cinética e viabilidade espermática pós-descongelamento. Cinco *pools* de sêmen, obtidos de 3 reprodutores caprinos, foram congelados em diluidor à base de leite desnatado (LD) ou gema de ovo (TGO) e suplementados com diferentes concentrações de melatonina (0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM). Após a descongelamento, as amostras foram avaliadas nos momentos 0 e após 2 horas de incubação (37 °C), quanto aos parâmetros cinéticos e de viabilidade (integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e produção intracelular de ROS). Os dados foram analisados usando o procedimento Glimmix do SAS. O sêmen congelado-descongelado em LD demonstrou maiores ( $p < 0,05$ ) valores de cinética espermática, quando comparado ao TGO. Em relação aos parâmetros de viabilidade observou-se que o TGO proporcionou maior ( $p < 0,05$ ) valor de alto potencial de membrana mitocondrial que o LD, não sendo demonstrado diferenças entre os diluidores nos demais parâmetros avaliados. A suplementação da melatonina influenciou ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros de cinética e viabilidade do sêmen caprino congelado-descongelado, sendo os valores obtidos na concentração de 4 mM de melatonina inferior ( $p < 0,05$ ) ao do grupo controle. Em conclusão, os parâmetros cinéticos pós-descongelamento e a viabilidade após duas horas de incubação foram aceitáveis em ambos os diluidores e isso sugere a potencial utilidade do sêmen caprino criopreservado. Verificou-se que o diluidor a base de leite desnatado resulta em melhor desempenho *in vitro* em comparação ao de gema de ovo. Além disso, a adição de 4 mM de melatonina em qualquer meio diluidor é deletéria a qualidade do sêmen pós descongelamento. Menores concentrações de melatonina testadas, apesar de não deletérias não influenciam a qualidade espermática.

**Palavras-chave:** Criopreservação, bode, antioxidante, melatonina.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was determine the effects of the addition of melatonin on different cryopreservation diluents for goat semen, and its effects on the kinetic parameters and post-thawing sperm viability. Five semen pools, obtained from three male goats, were frozen using extenders based on skimmed milk (SM) or egg yolk (EY), and supplemented with different concentrations of melatonin (0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM and 4 mM). After thawing, samples were evaluated at 0 and after 2 h incubation at (37 °C) for kinetic and viability parameters (plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential and intracellular production of ROS). Data were analyzed using the Glimmix SAS procedure. The frozen-thawed semen in SM showed higher ( $p < 0.05$ ) sperm kinetic values when compared to EY. Regarding the viability parameters, it was observed that the EY provided a higher ( $p < 0.05$ ) high mitochondrial membrane potential value than the SM, and no differences were found among the extenders in the other parameters evaluated. The melatonin supplementation influenced ( $p < 0.05$ ) the kinetic and viability parameters of the frozen-thawed goat semen, being the values obtained in the concentration of 4 mM melatonin lower than in the control group ( $p < 0.05$ ). In conclusion, post-thaw kinetic parameters and viability after two hours of incubation were acceptable in both extenders, this suggests the potential utilization of cryopreserved goat semen. Was found that the skimmed milk extender improved *in vitro* performance better than egg yolk. Moreover, the addition of 4 mM melatonin in any extender is deleterious to post-thaw semen quality. Lower concentrations of melatonin tested, despite no deleterious effects observed, did not improve the sperm quality.

**Keywords:** Cryopreservation, buck, antioxidant, melatonin.

## 1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura no Brasil vem se destacando nas últimas décadas, e a falta de aplicação adequada de biotécnicas reprodutivas nos rebanhos acarreta o comprometimento da lucratividade da exploração (SILVA, 2011). Devido à existência de criatórios distantes, houve a necessidade de estimular o desenvolvimento de técnicas de transporte e estocagem de sêmen (SALAMON; MAXWELL, 2000), onde o processo de criopreservação espermática possibilita a rápida difusão do material genético e a utilização do sêmen por tempo indeterminado, reduzindo os custos e riscos com o transporte de reprodutores (CASTELO et al., 2008).

Os procedimentos de criopreservação do sêmen determinam danos oxidativos à célula espermática, em virtude do desequilíbrio entre os sistemas oxidante-antioxidante que é causado pelo aumento de espécies reativas ao oxigênio (ROS) ou até mesmo pela diminuição dos sistemas antioxidantes presentes no sêmen (GUERRA et al., 2004). O aumento das ROS causa danos à membrana espermática, pois esta estrutura é rica em ácidos graxos poli-insaturados, tornando-a ainda mais sensível a ação dos agentes oxidantes (COMHAIRE et al., 1999; OCHSENDORF, 1999).

No entanto, moléculas antioxidantes podem agir diminuindo o impacto dos danos oxidativos, melhorando a qualidade espermática após o processo de criopreservação (BERRA e RIZZO, 2009). Neste contexto, a adição de antioxidantes aos diluidores de preparação, manutenção e criopreservação espermática visam reduzir a produção de ROS e prevenir o estresse oxidativo (MORTIMER, 2000).

A melatonina (N-acetil-5-metoxi triptamina), produzida e secretada principalmente pela glândula pineal (AWAD et al., 2006), tem sido implicada na estimulação das atividades de enzimas antioxidantes e, conseqüentemente, na redução do número de radicais livres, além do aumento na produção de moléculas que protegem as células dos efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo (KARBOWNIK e REITER, 2000). A melatonina também é produzida em outros órgãos, como retina, trato gastrointestinal, medula óssea, pele, linfócitos, ovário e testículos (HARDELAND, 2005). A propriedade da melatonina como antioxidante em vários tecidos, a presença comprovada de receptores de melatonina na membrana espermática (FUJINOKI, 2008), assim como a descoberta deste hormônio no plasma seminal (CASAO et al., 2010) levantaram a hipótese de que este neuro-hormônio possa ter um papel fundamental na viabilidade das células espermáticas.

Além da atividade da melatonina como antioxidante, sua ação fisiológica baseia-se na interação com os receptores de membranas MT1 e MT2, e proteínas intracelulares em células do sistema nervoso central e de órgãos periféricos, como vasos sanguíneos, rins e órgãos reprodutores (PANDI-PERUMAL et al., 2008). Os receptores de melatonina MT1 e MT2 são da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR) (DUBOCOVICH et al., 2009). Nos mamíferos, a ativação desses receptores obrigatoriamente modula funções circadiana, reprodutivas e endócrinas (DUBOCOVICH et al., 2003).

Pesquisas evidenciaram a ação antioxidante da melatonina sobre a conservação da função espermática de mamíferos e a melhora dos espermatozoides em diversos parâmetros (FUJINOKI, 2008; RAO; GANGADHARAN, 2008). Foi relatado que a motilidade progressiva espermática melhorou após o tratamento com a melatonina (COYAN et al., 1998; KAYA et al., 2000), além proteger as células de danos oxidativos, por ser quelante de radicais livres (RAO; GANGADHARAN, 2008).

Embora evidências sugiram que a melatonina exerça papel na proteção dos espermatozoides, essas informações são inexistentes no caso de espermatozoides caprinos. Portanto, investigações dos efeitos da melatonina ao diluidor do sêmen caprino devem ser realizados, a fim de proporcionar uma ferramenta tecnológica para melhoria da qualidade espermática após processo de criopreservação, conseqüentemente contribuindo para o sucesso da inseminação artificial desta espécie.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Sêmen Caprino**

O conhecimento das especificidades do sêmen caprino é essencial para obtenção de altas taxas de fertilidade, ou seja, resultados satisfatórios no uso da criopreservação do sêmen desta espécie (PURDY, 2006; GUERRA et al., 2009).

O sêmen caprino possui algumas particularidades em relação ao de outras espécies, que levam a uma limitação no uso de diluentes ricos em fosfolipídeos, como aqueles à base de leite ou de gema de ovo. Essas limitações ocorrem devido a uma interação deletéria entre os componentes lipídicos dos diluidores de sêmen e enzimas contidas no plasma seminal destes animais (SIMPLÍCIO; MACHADO, 1989).

Tais enzimas, oriundas das glândulas bulbouretrais dos caprinos, foram identificadas e classificadas inicialmente como enzimas coaguladoras de gema de ovo (EYCE) e fração proteica da secreção bulbouretral do caprino (SBU- III), que interage com o diluidor à base de leite. Posteriormente, essas duas enzimas foram identificadas como possuindo a mesma estrutura molecular, sendo classificada como Fosfolipase A (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000). Essa enzima atua hidrolisando os fosfolipídeos presentes nos diluidores de sêmen, formando lisolecitinas e ácidos graxos, que levam à morte espermática (PURDY, 2006).

Com o intuito de evitar as interações deletérias entre os componentes dos diluidores e o plasma seminal do caprino, buscou-se utilizar protocolos de criopreservação que removessem o plasma seminal através de centrifugação (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995).

No entanto, alguns trabalhos relatam resultados positivos para congelamento do sêmen caprino sem utilizar o processo de lavagem (RITAR; SALAMON, 1982; AZERÊDO et al., 2001). Em outros, foi observado que o sêmen caprino apresenta um aumento da atividade da Fosfolipase A durante a estação reprodutiva, desta forma, os efeitos negativos da criopreservação são maiores nas amostras do sêmen que não foi removido o plasma seminal (COLOMA et al., 2010).



## 2.2 Diluidores Para o Sêmen Caprino

A interação entre os espermatozoides e o meio diluidor é fator imprescindível para a preservação da capacidade fecundante desta célula (MANJUNATH et al., 2002).

Os meios diluidores para criopreservação de sêmen são normalmente constituídos por açúcares, (como a glicose e frutose, que servem como fonte de energia aos espermatozoides, além de auxiliar na manutenção da pressão osmótica), crioprotetores não penetrantes (como a gema de ovo ou leite, que atuam protegendo extracelularmente), crioprotetores penetrantes (como o glicerol, que atua protegendo a célula, reduzindo o ponto de congelação da água), substância tampão e sais (como o Tris e citrato de sódio, para manter o potencial Hidrogeniônico do meio - pH), e antibióticos (penicilina e estreptomicina, que atuam inibindo o crescimento microbiano) (GIBBONS, 2002; PURDY, 2006). Além desses componentes, substâncias antioxidantes podem ser adicionadas aos meios diluidores para diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo na criopreservação de sêmen (GUERRA et al., 2004).

Entretanto, o sêmen caprino tem uma sensibilidade maior a sofrer choque térmico, variações de pH e pressão osmótica pela composição do diluidor (DEKA; RAO, 1985). Então, para proteger os espermatozoides desta espécie, o diluidor ideal precisa ter substâncias que não sejam tóxicas à célula espermática, apresentem uma osmolaridade adequada (entre 425 e 525 mOsm), tenha poder nutritivo e tampão eficazes, contenha estabilizadores de membrana, o pH entre 6 e 8 para proporcionar aos espermatozoides um ambiente que garanta manter sua funcionalidade, além disso, deve ter um baixo custo e ser de fácil preparo (CONCANNON; BATTISTA, 1989; PURDY, 2006; MAIA, 2010).

Existem vários diluidores de sêmen caprino, compostos por diferentes ingredientes, entretanto, a gema de ovo e/ou leite são compostos importantes para preservação espermática. O diluidor mais utilizado é à base de Tris-gema de ovo (NEVES et al., 2008), no entanto, o leite desnatado é considerado um bom diluidor para a espécie caprina e utilizado com grande sucesso (BARBOSA, 1999).

### 2.2.1 Diluidor à base de gema de ovo

Em 1940, Phillips e Lardy obtiveram resultados satisfatórios na utilização da gema de ovo na criopreservação do sêmen bovino, desde então esse componente é

utilizado rotineiramente na composição de diluidores de diversas espécies, pois protege estabilizando a membrana espermática, restaurando os fosfolípidios perdidos devido a mudanças bruscas de temperatura, durante a refrigeração (HAMMERSTEDT et al., 1990; HOLT, 2000).

A composição da gema de ovo sofre grandes variações por ser um componente de origem animal composto por proteínas, vitaminas, fosfolípidios, glicose, antioxidantes e componentes bactericidas, dificultando a produção de meios quimicamente definidos (HOUPALATHI et al., 2007; FARSTAD, 2009).

A gema de ovo geralmente é utilizada na concentração de 20% no diluidor. Por causa da interação deletéria que ocorre entre a Fosfolipase A e os fosfolípidios da gema de ovo (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995), essa reação fez com que definissem a utilização de 2,5% de gema de ovo nos diluidores da espécie caprina em sêmen não lavado, um valor muito mais baixo quando comparado a outras espécies (EVANS; MAXWELL, 1987; BISPO et al., 2011).

No entanto, vários componentes da gema de ovo tem sido investigados para identificar o componente responsável pelo efeito de proteção à célula espermática (WATSON, 1976; FOULKES, 1977).

Estudos demonstram que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são o componente da gema de ovo que apresenta maior proteção ao espermatozoide, interagindo com a membrana espermática fornecendo proteção e prevenindo a ruptura da mesma (PACE; GRAHAM, 1974; FARSTAD, 1996). Outro estudo ressalta que é uma fração fosfolipídica presente no LDL que protege os espermatozoides, formando uma película protetora na superfície espermática (QUINN et al., 1980) ou substituindo os fosfolípidios da membrana espermática perdidos ou danificados durante o processo de criopreservação (FOULKES et al., 1980, GRAHAM; FOOTE, 1987).

No entanto, a proteção proporcionada pela gema de ovo durante a criopreservação espermática é complexa e ainda precisa ser melhor elucidada (MANJUNAHTH, 2012).

### *2.2.2 Diluidor à base de leite desnatado*

O sêmen caprino apresenta particularidades que limitam o uso de diluidores ricos em fosfolípidios, como os à base de leite. Esse tipo de diluidor é utilizado de forma eletiva para esta espécie (BARBOSA, 1999). No entanto, para alguns

pesquisadores o diluidor à base de leite desnatado é o mais indicado na criopreservação de sêmen caprino (VOSS; PICKETT, 1976).

Para esse diluidor fornecer bons resultados, ocorre um processo de aquecimento (90 °C / 10 min), para inativar os fosfolipídios presentes em grandes quantidades no leite (TREJO et al., 1987). O leite desnatado contém proteínas, chamadas de caseínas, que atuam como tampão, reduzindo os danos à célula espermática causados pela queda brusca de temperatura (SALOMON; MAXWELL, 2000).

Além das caseínas, a lactose parece ter envolvimento na proteção do sêmen diluído em leite, parece melhorar a eficiência do diluidor, porém não é suficiente para proteger os espermatozoides por si só. Por apresentar uma baixa permeabilidade celular, acredita-se que ela age extracelularmente (WATSON, 1990).

Entretanto, mesmo com os efeitos benéficos conferidos ao leite, também ocorrem efeitos deletérios entre o diluidor à base de leite e a fração glicoproteica do plasma seminal caprino (SBUIII) (NUNES et al., 1982). No entanto, na tentativa de evitar essas interações deletérias entre o plasma seminal e os componentes dos diluidores, protocolos que visam a remoção do plasma seminal através da centrifugação tem sido realizado (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995).

### **2.3 Criopreservação de Sêmen Caprino**

A criopreservação do sêmen é uma biotécnica reprodutiva que visa conservar o germoplasma masculino por tempo indeterminado, além de reduzir os riscos e custos com a aquisição de reprodutores e propagação de doenças, favorecendo a rápida difusão do material genético superior (WATSON, 2000).

O processo de criopreservação do sêmen representa um desafio para os programas de inseminação artificial (IA), pois resulta em danos ultraestruturais ou físicos, bioquímicos e funcionais, prejudicando assim a capacidade fertilizante da célula espermática, sendo o sucesso desta técnica, variável em função das espécies nas quais se aplica (HOLT, 2000).

Inicialmente o sêmen caprino foi congelado utilizando-se adaptações das técnicas de criopreservação de sêmen bovino, obtendo-se sucesso limitado (AMOA; GELAYDE, 1997), pois a influência de fatores como raça, idade, fotoperíodo, nutrição e temperatura ambiente são responsáveis por variações na qualidade espermática dos caprinos (CHEMINEAU, 1986), portanto, pesquisas tem buscado aprimorar o protocolo

para criopreservação do sêmen dessa espécie (BISPO et al., 2011; MAYA-SORIANO et al., 2013).

A congelação do sêmen mantém o espermatozoide à  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido, cessando seu metabolismo, evitando gastos energéticos e produção de catabólitos tóxicos, entretanto, também pode provocar injúrias à célula (WATSON, 1995; HOLT; 2000). Assim, durante o processo de refrigeração, congelação e descongelação, ocorrem alterações na célula espermática (PARKS; GRAHAM, 1992).

A baixa taxa de fertilidade do sêmen criopreservado pode estar relacionada à redução da temperatura (temperatura corporal para  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), momento no qual ocorre a fase de transição dos lipídeos da membrana, deixando-a com uma organização menos fluida, prejudicando a função celular. Portanto, a fase de refrigeração deve ser realizada de maneira cautelosa para os espermatozoides não sofrerem choque térmico (CHAKRABARTY et al., 2007; SILVA et al., 2013).

O choque térmico induz danos irreversíveis nas células. Tal fenômeno é provocado pela rápida redução da temperatura e caracteriza-se por alterações nos padrões normais de motilidade, como movimentação circular ou retrógrada e danos às membranas plasmática e acrossomal (GRAHAM, 1996; WATSON, 2000). Portanto, a utilização de curvas lentas de congelação é fundamental para minimizar esses efeitos (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Além desses danos, durante o processo de congelação, os cristais de gelo extracelulares começam a se formar a partir da água que se encontra no meio circundante e ocorre a cristalização. A troca de água ocorre para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular ocasionando a desidratação, que é necessária para diminuir a formação desses cristais que causariam danos aos espermatozoides. Por causa disso, esses processos podem ser deletérios para os espermatozoides, mas podem ser minimizados pelo uso de curvas adequadas para a congelação (SQUIRES, 1999).

Outro efeito deletério causado à célula espermática durante o processo de criopreservação é a produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (ROS), também conhecidas como radicais livres. Quando a produção dessas ROS é maior que a capacidade antioxidante, ocorre o estresse oxidativo, caracterizado por danos à célula espermática (GUTHRIE; WELCH, 2012).

O processo de descongelação é outra etapa de grande importância, pois também afeta diretamente a função espermática. A curva de descongelação deve ser lenta quando os espermatozoides são criopreservados em curva lenta, para que os cristais de

gelo descongelem e as células reidratem. E a curva deve ser rápida para os que foram congelados em curva rápida, pois evita que o gelo intracelular sofra recristalização (GRAHAM, 1996).

## **2.4 Estresse Oxidativo e Antioxidantes**

A membrana espermática é rica em ácidos graxos poli-insaturados, e estes são sensíveis às ROS. As principais ROS que estão envolvidas nos problemas reprodutivos são: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical peroxila ( $ROO^\cdot$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (SIKKA, 1996; MANEESHE; JAYALEKSHMI, 2006; ORTEGA; FERRUSOLA et al., 2009; REITER et al, 2013). Além desses, existem também os oxidantes derivados do nitrogênio, espécies reativas ao nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico ( $ON^\cdot$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^\cdot$ )(TURRENS, 2003).

A presença de ROS é necessária de forma equilibrada, pois algumas delas exercem papel fundamental para a viabilidade e fertilização espermática, como os radicais  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  que são essenciais nos mecanismos de capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide ao ovócito (MAIA; BICUDO, 2009).

O aumento dessas reações oxidativas, como a peroxidação lipídica, causam danos à membrana plasmática e acrossomal e ao DNA da célula (COMHAIRE et al.,1999; OCHSENDORF, 1999; GUTHRIE; WELCH, 2012), bem como prejudica o potencial de atividade mitocondrial e a capacidade fertilizante dos espermatozoides (SHANG et al., 2004; AITKEN et al., 2010).

Os espermatozoides dependem da proteção dos antioxidantes que estão presentes na própria célula e no plasma seminal, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GRd) e glutamilglicina ligase (GCL), que agem degradando as ROS (REITER et al., 2013); além de conter também albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, lactato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotina, entre outros compostos que tem a função de proteger a célula dos danos causados por essas reações deletérias (BALL, 2011).

O processo de criopreservação demanda a diluição do sêmen, e no caso dos caprinos, a remoção do plasma seminal, acarretando desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (BILODEAU et al., 2000). Contudo, a adição de antioxidantes ao diluidor do sêmen caprino é realizada para melhorar a qualidade do sêmen e prevenir ou reduzir o estresse oxidativo (SILVA et al., 2011).

Com isso, a melatonina vem sendo estudada e utilizada como um potente agente antioxidante (CASAO et al., 2010), porém a utilização excessiva destes compostos podem apresentar efeitos indesejados, por inibir a formação de ROS e suas funções fisiológicas necessárias à célula espermática, necessitando encontrar uma concentração ideal na utilização dos mesmos (CARVALHO et al., 2002; SILVA et al., 2013).

## 2.5 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) foi isolada pela primeira vez em 1958 pelo médico americano Aaron Lerner e seus colegas da Universidade Yale. O nome foi escolhido pela capacidade de reverter o efeito do escurecimento na pele causado pelo hormônio estimulador de melanócitos (LERNER et al., 1958, 1959). Desde então, um novo campo de pesquisa foi descoberto e a importância de compreender os diversos mecanismos de ação deste hormônio se tornou imprescindível.

A melatonina é secretada principalmente pela glândula pineal, no entanto, existem outras estruturas que a produzem, (ITOH et al., 1999; TOSINI; FUKUHARA, 2002) como o trato gastro-intestinal (HUETHER, 1993), os olhos (SMITH; BAKER, 1974), linfócitos (CARRILLO-VICO et al., 2004), medula óssea (TAN et al., 1999), pele (SLOMINSKI et al., 2008), folículo ovariano (BRZEZINSKI et al., 1987), entre outros.

A via de síntese da melatonina se inicia a partir do aminoácido essencial triptofano, que é primeiramente hidroxilado pela enzima triptofano-5-hidroxilase (T-5-H) a 5-hidroxitriptofano, que é descarboxilado pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HDT) a 5-hidroxitriptamina (serotonina), acetilado pela arilalkilamina-N-acetiltransferase (AANAT ou NAT) a N-acetilserotonina e metilado em melatonina pela enzima citosólica hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), chamada também de acetilserotonina O-metiltransferase (ASOMT) (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003; REITER et al., 2009).

Este hormônio influencia positivamente o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal na espécie caprina, por ser um componente essencial na regulação reprodutiva desses animais sazonais (REITER et al., 2013; CHEMINEAU et al., 1992). Essa regulação sazonal tem como objetivo garantir que a prole nasça na primavera e verão, quando o alimento é mais disponível (CARTER; GOLDMAN, 1983).

A produção de melatonina é inibida quando a retina detecta a luz, e estimulada na ausência da luz. Através de células fotorreceptoras especiais na retina que enviam sinais sobre o estado da luz para o núcleo supraquiasmático, então, esses sinais são transmitidos para a glândula pineal, produzindo melatonina. O aumento da produção de melatonina noturna regula a secreção pulsátil do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo, ocorrendo mudanças nos hormônios luteinizantes (LH), responsáveis pela atividade ovariana e produção espermática (MALPAUX et al., 1997; MISZTAL et al., 2002).

Embora a sazonalidade seja menos acentuada no macho do que na fêmea, foi observada diferenças na qualidade espermática e fertilidade entre as estações reprodutivas e não reprodutivas (MANDIKI et al., 1998; ROSA; BRYANT, 2003). Além disso, estudos mostraram aumento no tamanho testicular e mudança na composição bioquímica do plasma seminal quando utilizados implantes de melatonina em animais em estação não reprodutiva (COYAN et al., 1998; KAYA et al., 2000; CASAO et al., 2010c). Casao et al. (2010a,b), mostraram que a melatonina previne a capacitação espermática e mudanças apoptóticas *in vitro*, além de influenciar a fertilidade do espermatozoide de carneiros.

Algumas ações da melatonina podem ser mediadas através de receptores (MT1 e MT2). Esses receptores desempenham um papel importante na regulação do fotoperíodo (BARTNESS; GOLDMAN, 1989) e seu desequilíbrio pode também está relacionado à indução da síndrome de depressão. Os receptores MT1 e MT2 estão envolvidos na atividade do sistema nervoso central com diferentes funções. Enquanto o MT1 é responsável pela ação inibidora de melatonina, associada à inibição da produção de andrógenos (FRUNGIERI et al., 2005), o MT2 está envolvido na regulação do ritmo circadiano (HUNT et al., 2001; DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005; LIU, 2007).

Os receptores de melatonina foram encontrados em tecidos de epidídimo de ratos (SHIU et al., 1997), células de Leydig em humanos (SIROTKIN; SHAEFFER, 1997), membrana espermática de ovinos (CASAO et al., 2012). Já em equinos, MT1 e MT2 não foram encontrados, mas a melatonina agiu melhorando a qualidade do sêmen desta espécie, provavelmente pela sua capacidade antioxidante (BALAO DA SILVA et al., 2011).

Independente de receptores, a melatonina influencia a fisiologia reprodutiva do macho, pois estimula enzimas antioxidantes e sequestra radicais livres (OH e ONOO-) transformando-os em metabólitos estáveis (RODRIGUEZ et al., 2004; DU PLESSIS et

al., 2010). Seu efeito benéfico na célula espermática de animais de dias longos e de dias curtos fortalece a ideia que a sua ação também pode ser de forma indireta (REITER et al., 2000).

No entanto, o mecanismo de ação que a melatonina realiza para proteger a célula espermática ainda é bastante complexo, devido a sua capacidade de atravessar a membrana plasmática da célula e exercer sua atividade em todas as células do corpo (PANDI-PERUMAL et al., 2006) e de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (REITER et al., 2000).

## **2.6 Sistema Computadorizado de Avaliação Espermática (CASA)**

A qualidade seminal é determinada principalmente através da análise de motilidade e morfologia espermática, tornando essa avaliação uma ferramenta na seleção de um ejaculado (VERSTEGEN et al., 2002).

O CASA é um sistema automatizado que facilita a visualização e digitalização de imagens sucessivas dos espermatozoides, analisando e fornecendo informações precisas sobre a cinética dessas células, além disso, fornece valores estatísticos médios da população analisada e uma série de parâmetros que definem o exato movimento de cada célula espermática (QUINTERO-MORENO et al., 2003; MORTIMER, 1997). Pode ser utilizado também para medir o número de células por unidade de volume e ser modificado para capturar dados aproximados de morfologia de cada célula examinada (AMANN; KATZ, 2004).

No entanto, a segurança e veracidade dessas informações dependem do cuidado na preparação da amostra e do ajuste necessário do equipamento para identificar corretamente os espermatozoides de cada espécie, além de diferenciar e excluir outras partículas que sejam semelhantes (MOSES et al., 1994; TARDIF et al., 1997; VERSTEGEN et al., 2002). O alto custo do equipamento, a necessidade de validação e o controle de qualidade da amostra limitam o uso do CASA. Além disso, para que haja comparações de dados entre os laboratórios, é necessária a padronização das configurações, sendo um obstáculo para o uso do sistema (RIJSSELAERE et al., 2003).

Vários sistemas têm sido implantados em laboratórios de andrologia humana e animal, com o objetivo de minimizar a subjetividade das avaliações (AMANN; KATZ, 2004; TARDIF et al., 1997). Porém os equipamentos utilizados ainda variam muito entre as máquinas e *software* na reconstrução da trajetória espermática (VERSTEGEN



et al., 2002).

A avaliação de motilidade em vários parâmetros é realizada através de um sistema estroboscópico de alta precisão controlada por computador. Além de utilizar videomicrografia que faz o monitoramento constante e análise sequencial do movimento espermático (MORTIMER, 2000; AMANN; KATZ, 2004).

Os sistemas automáticos avaliam o movimento da cabeça do espermatozoide, mesmo sendo o flagelo que origina a motilidade, pois a cabeça não se move tão rapidamente como a cauda, possibilitando a captura de imagens mais claras (AMANN; KATZ, 2004; MORTIMER, 2000). O sistema ainda utiliza um padrão do tamanho de cabeça para os espermatozoides de cada espécie, fazendo com que o computador reconheça objetos que não se enquadrem no tamanho da cabeça espermática pré-estabelecida (MORTIMER, 2000).

Os parâmetros analisados pelo CASA são: Motilidade total (%): população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima determinada na programação do sistema, sendo a proporção de células móveis do total; Motilidade Progressiva (%): porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade curvilínea (VCL-  $\mu\text{m/s}$ ): velocidade da trajetória real do espermatozoide, sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade; Velocidade linear progressiva (VSL-  $\mu\text{m/s}$ ): velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide, sempre a mais baixa das três velocidades; Velocidade média da trajetória (VAP-  $\mu\text{m/s}$ ): velocidade da trajetória média ininterrupta do espermatozoide; Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ): amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real; Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz): número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento, move-se para trás e para frente durante o trajeto percorrido; Retilinearidade (STR - %): valor médio entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta; Linearidade (LIN - %): valor médio da proporção entre VSL e VCL (VERSTEGEN et al., 2002).

Fatores como experiência do observador, identificação da espécie, precisão da câmara utilizada, temperatura da análise, tempo entre a obtenção do sêmen e sua análise, método do processamento, concentração espermática e frequência de aquisição de imagens, geram uma grande variabilidade nos parâmetros mensurados pelo CASA (FARREL et al., 1996; MORTIMER, 2000).

Com a utilização desse sistema automatizado tem sido possível obter resultados significativos em pesquisas básicas como o monitoramento da qualidade espermática, pesquisa de novos diluidores seminais, crioprotetores, entre outros tipos de processamento para melhorar as biotécnicas reprodutivas (FARREL et al., 1996; AMANN; KATZ, 2004).

## **2.7 Citometria de Fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para análise celular. Ela permite determinar, em pouco tempo, dados sobre todas as subpopulações celulares de uma determinada amostra, tornando essa técnica bastante eficiente para avaliar amostras com diversas populações, como amostras de espermatozoides (BATISTA; GUERRA, 2010). Além disso, fornece informações como tamanho, forma e até a complexidade interna das células ou componente do espermatozoide detectado por fluorocromos (CELEGHINI et al., 2007).

A utilização do citômetro de fluxo para análise espermática vem crescendo significativamente, pois aumenta a capacidade de selecionar espermatozoides com potencial para fertilização (HOSSAIN et al., 2011). Essa técnica para avaliação das células espermáticas iniciou-se por meio um estudo que avaliava a mensuração do conteúdo de DNA (EVENSON et al., 1980).

A grande vantagem do uso dessa técnica é a capacidade de examinar em torno de trinta mil espermatozoides em alguns minutos, enquanto a microscopia óptica de fluorescência examina cerca de 200 células espermáticas no tempo que varia de acordo com o observador; além de proporcionar a avaliação simultânea na célula espermática, pela existência de um grande número de fluorocromos e sua capacidade de detectar marcadores por múltiplos fluorocromos ligados a um único espermatozoide (CROSS et al., 1986; GILLAN et al., 2005).

### *2.7.1 Fluorocromos utilizados na citometria de fluxo*

As células coradas por fluorocromos são conduzidas dentro de um fluxo laminar, uma de cada vez até serem iluminadas por um ou mais lasers, essa luz vai ser filtrada por espelhos e filtros até atingir os fotodetectores que amplifica os sinais e captura as imagens para análise (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2010). Atualmente,

equipamentos com câmeras promovem a captura de imagens das células simultaneamente à detecção da fluorescência (SILVA et al., 2014).

A integridade de membrana plasmática pode ser avaliada por citometria de fluxo utilizando o Iodeto de Propídio (IP), que possui afinidade pelo DNA, corando em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesionada (NEILD et al., 2000). Além de ser um corante muito estável, essa substância é utilizada em vários trabalhos, obtendo bons resultados tanto em microscopia de fluorescência como em citometria de fluxo (GILLAN et al., 2005).

A integridade acrossomal é avaliada através de lectinas conjugadas a moléculas fluorescentes, como o *Pisum sativum* originada da ervilha verde (PSA), que se liga a membrana acrossomal interna, e o *Arachis hypogaea* originada do amendoim (PNA), que se liga a membrana acrossomal externa. Quando essa marcação é realizada em células não permeabilizadas a ausência da fluorescência é sinal de acrossoma intacto (SILVA; GADELLA, 2006). A associação destes dois fluorocromos (IP e PNA) permite avaliar conjuntamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal (CELEGHINI et al., 2007; MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2010).

O iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), é um tipo especial de multímeros de carbocianinas (REERS et al., 1991), que identifica diferentes potenciais de membrana mitocondrial através de algumas cores. Para o baixo potencial de membrana mitocondrial, o JC-1 forma monômeros e exhibe fluorescência verde, no entanto, para o alto potencial de membrana mitocondrial, forma J-agregados com fluorescência laranja (GRAHAM; MOCÉ, 2005).

O 2'', 7'' diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) é um derivado de fluoresceína, que mensura os níveis intracelulares de ROS na célula espermática. Age penetrando a membrana intacta, ficando retido na célula enquanto seus grupos acetatos são clivados por esterases intracelulares, por fim, emite fluorescência verde após sofrer oxidação (CARTER et al., 1994; AITKEN et al., 2013). Outro derivado de fluoresceína é o 5- (e 6-) clorometil- 2'', 7'' diclorodihidrofluoresceína-diacetato, éster de acetil (CM-H<sub>2</sub>DCFDA), que tem melhor retenção dentro da célula. Essas sondas utilizadas para avaliação do estresse oxidativo podem ser associadas ao IP, possibilitando identificar o estresse oxidativo apenas em populações de células viáveis/vivas (KADIRVEL et al., 2009; DOMINGUEZ-REBOLLEDO et al., 2011).

### 3 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.

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

AITKEN, R. J.; SMITH, T. B.; LORD, T.; KUCZERA, L.; KOPPERS, A. J.; NAUMOVSKI, N.; CONNAUGHTON, H.; BAKER, M. A.; DE IULIIS, G. N. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. **Andrology**, v. 1, p. 192–205, 2013.

AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004.

AMOAH, E. A., GELAYDE, S. Biotechnological advances in goat reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 578-585, 1997.

AWAD, H.; HAKAWA, F.; MOSTAFA, T.; ATTA, H. Melatonin hormone profile in infertile males. **International Journal Andrology**, v. 29, p. 409-413, 2006.

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.

BALAO DA SILVA, C. M.; MACIAS-GARCIA, B.; MIRO-MORAN, A.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; MORILLO-RODRIGUEZ, A.; ORTEGA FERRUSOLA, C. GALLARDO-BOLANOS, J. M.; STILWELL, G.; TA-PIA, J. A.;

PENA, F. J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, p. 172–179, 2011.

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

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

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

BARTNESS, T. J.; GOLDMAN, B. D. Mammalian pineal melatonin: A clock for all seasons. **Experientia**, v. 45, p. 939–945, 1989.

BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 3, p. 125-132, 2010.

BERRA, B.; RIZZO, A. M. Melatonin: circadian rhythm regulator chronobiotic, antioxidant and beyond. **Clinics Dermatology**, v. 27, p. 202-209, 2009.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; CAGNON, C. Levels of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

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.

BRZEZINSKI, A.; SEIBEL, M. M.; LYNCH, H. J.; DENG M. H.; WURTMAN, R. J. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 64, p. 865–867, 1987.

CARRILO-VICO, A.; CALVO, R. J.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCIA-MAURINO, S.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB Journal**, v. 18, p. 537–539, 2004.

CARTER, D. S.; GOLDMAN, B. D. Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. **Endocrinology**, v. 113, p. 1261–1267, 1983.

CARTER, W. O.; NARAYANAN, P. K.; ROBINSON, J. P. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, p. 253–258, 1994.

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

CASAO, A.; CEBRIÁN, I.; ASUMPCÃO, M.; PÉREZ-PÉ, R.; ABECIA, J.; FORCADA, F.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, art. 59, 2010a.

CASAO, A.; MENDOZA, N.; PÉREZ-PÉ, R.; GRASA, P.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. **Journal of Pineal Research**, v. 48, n. 1, p. 39-46, 2010b.

CASAO, A.; VEGA, S.; PALACÍN, I.; PÉREZ-PÉ, R.; LAVINA, A.; QUINTÍN, F. J.;

SEVILLA, E.; ABECIA, J. A.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; FORCADA, F.; MUINO-BLANCO, T. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 425-432, 2010c.

CASAO, A.; GALLEGO, M.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; PÉREZ-PÉ, R.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Identification and immunolocalisation of melatonin MT1 and MT2 receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v. 24, p. 953–961, 2012.

CASTELO T. S.; FROTA T. R.; SILVA A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprino. **Acta Veterinaria Brasilica**, 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 plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CHAKRABARTY, J.; BANERJEE, D.; PAL, D.; DE, J.; GHOSH, G.C. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 54, p. 27-35, 2007.

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

CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.; DELGADILLO, J. A.; GUERIN, Y.; RAVAUULT, J. P.; THIMONIER, J.; PELLETIER, J. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. **Animal Reproduction Science**, v. 30, p. 157–184, 1992.

COLOMA, M. A.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; LÓPEZ-SEBASTIAN, A.; SANTIAGO MORENO, J. The influence of washing Spanish ibex (caprapyrenaica) 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 potential: the andrologist's viewpoint. **Human Reproduction**, v. 5, p. 393-398, 1999.

CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. Philadelphia: WB Saunders **Current Veterinary Therapy**, p. 1247-1259, 1989.

COYAN, K.; KAYA, A.; KARACA, F.; ATAMAN, M. B.; YILDIZ, C. The effect of melatonin on sperm quality and testicular size of normospermic and pathospermic rams in the anoestrous season. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 85, p. 383-388, 1998.

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.

DEKA, B. B.; RAO, A. R. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. **Indian Veterinary Journal**, v. 64, p. 591-594, 1987.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A. F.; ROS-SANTAELLA, J. L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R. Response of thawed epididymal Red Deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 393-403, 2011.

DUBOCOVICH, M. L.; DELAGRANDE, P.; OLCESE, J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. **Melatonin Receptors**. Disponível em: <<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=39>>. Acesso em: 27 setembro 2014. 2009.



DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, p. 101–110, 2005.

DUBOCOVICH, M. L.; RIVERA-BERMUDEZ, M. A.; GERDIN, M. J.; MASANA, M. I. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 1093-1108, 2003.

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

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Australia. **Butterworths Pty Limited**, p. 194, 1987.

EVENSON D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

FARREL, P. B.; FOOTE, R. N.; MCARDLE, M. M.; TROUERN-TREND, V. L.; TARDIF, A. L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v. 17, p. 293-300, 1996.

FARSTARD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.

FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen - New challenges. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 336-341, 2009.

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, p. 277 – 284, 1977.

FOULKES, J. A.; SWEASEY, D.; GOODEY, R. G. Fertility of bull spermatozoa in

egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 165-169, 1980.

FRUNGIERI, M. B.; MAYERHOFER, A.; ZITTA, K.; PIGNATARO, O. P.; CALANDRA, R. S.; GONZALEZ-CALVAR, S. I. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. **Endocrinology**, v. 146, p. 1541– 1552, 2005.

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

GIBBONS, A. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus**, v. 4, n. 16, p. 24-32, 2002.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457. 2005.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, p. 42-52.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492-504, 2005.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. H. C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.

GUERRA, M. M. P.; SOUZA, A. F. de; SOARES, A. T.; CÉESAR, C. N. R.; SILVA, S. V.; BATISTA, A. M. Aspectos críticos da congelação do sêmen caprino. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, XVIII (Anais), p. 46-56, 2009.

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

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.

HARDELAND, R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 119-130, 2005.

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

HOSSAIN, M. S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A. P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 406-419, 2011.

HOUPALATHI, R.; LÓPEZ-FANDINO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. Bioactive egg compounds. **New York: SpringerVerlag**, p. 296, 2007.

HUETHER, G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. **Experientia**, v. 49, p. 665-670, 1993.

HUNT, A. R.; AL-GHOUL, W. M.; GILLETTE, M. U.; DUBOCOVICH, M. L. Activation of MT2 melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. **The American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 280, p. 110-118, 2001.

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

KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 125-134, 2009.

KARBOWNIK, M., REITER, R.J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.225, p.9-22, 2000.

KAYA, A.; BASPINAR, N.; YILDIZ, C.; KURTOGLU, F. ATAMAN, M. B.; HALILOGLU, S. Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. **Revista Medica Veterinária**, v. 151, p. 1143–1146, 2000.

LEBOEUF, B.; FORGERIT, Y.; BERNELAS, D.; POUGNARDA, J. L.; SENTYA, E.; DRIANCOURT, M.A. Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus, time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, p. 1371–1378, 2003.

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

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, Y.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 2587, 1958.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; HEINZELMANN, R. V. Structure of melatonin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, p. 6084–6085, 1959.

LIU, Y-X. Involvement of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor

type 1 in spermatogenesis, sperm capacitation, and fertilization. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 33, p. 29–40, 2007.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 1-2, p. 61-72. 1995.

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

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

MALPAUX, B.; VIGUIE, C.; SKINNER, D. C.; THIÉRY, J. C.; CHEMINEAU, P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. **Brain Research Bulletin**, v. 44, p. 431–438, 1997.

MANDIKI, S. N. M.; DERYCKE, G.; BISTER, J. L.; PAQUAY, R. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams: 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. **Small Ruminant Research**, v. 28, p. 67–79, 1998.

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

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Probes and Techniques for Sperm

Evaluation by Flow Cytometry. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 67–78, 2010.

MAYA-SORIANO, M. J.; TABERNER, E.; SABÉS-ALSINA, M.; PILES, M.; LOPEZ-BEJAR, M. Absence of beneficial effects on rabbit sperm cell cryopreservation by several antioxidant agents. **Zygote**, v. 22, p. 1-10, 2013.

MISZTAL, T.; ROMANOWICZ, K.; BARCIKOWSKI, B. Effect of melatonin on daily LH secretion in intact and ovariectomized ewes during the breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 187–198, 2002.

MORTIMER, D. Sperm preparations methods. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 3, p. 357-366, 2000.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, p. 403-439, 1997.

MORTIMER, S. T. Casa- Practical aspects. **Journal of Andrology**, p. 515-524, 2000.

MOSES, D. F.; DE LAS HERAS, M. A.; VALCÁRCEL, A.; PÉREZ, L.; BALDASSARRE, H. Use of computerized motility analyser for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **Andrologia**, v. 27, p. 25-29, 1994.

NEILD, D. M.; CHAVES, M. G.; FLORES, M.; MIRAGAYA, M. H.; GONZALES, E.; AGÜERO, A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**, v. 32, p. 351-355, 2000.

NEVES, J. P.; NUNES, J. F.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; SALGUEIRO, C. C. M.; ALMEIDA, J. L. **Inseminação artificial em pequenos ruminantes**. In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R. & Freitas V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca. p. 395, 2008.

NUNES, J. F.; CORTEEL, J. M.; COMBARNOUS, Y.; BARIL, G. Role du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. **Reproduction Nutrition**

**Development**, 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.

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

PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v. 39, p. 1144-1149, 1974.

PANDI-PERUMAL, S. R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G. J. M.; CARDINALI, D. P.; POEGGELER, B.; HARDELAND, R. Melatonin - Nature's most versatile biological signal? **The FEBS Journal**, v. 273, p. 2813–2838, 2006.

PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; MAESTRONI, G. J.; ZISAPEL, N.; CARDINALI, D. P. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 85, n. 3, p. 335-353, 2008.

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

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

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal of Dairy Science**, v. 23, p. 399-404, 1940.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 403-407, 1980.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 59, p. 1973-1990, 2003.

RAO, M. V.; GANGADHARAN, B. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 4, p. 935-942, 2008.

REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30, p. 4480-4486, 1991.

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

REITER, R. J.; TAN, D.X.; OSUNA, C.; GITTO, E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress – A review. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, p. 444–458, 2000.

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

REITER, R. J., TAN, D. X.; ROSALES-CORRAL, S. A.; MANCHESTER, L. C. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 373–384, 2013.



RIJSSELAERE, T.; SOOM, A. V.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of technical settings on canine sêmen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, v.60, p. 1553-1568, 2003.

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.

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

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 48, p. 155–171, 2003.

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

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

SHIU, S. Y.; LI, L.; WONG, J.T.; PANG, S. F. Biology of G protein-coupled melatonin receptors in the epididymis and prostate of mammals. **Chinese Medical Journal**, v. 110, p. 648–655, 1997

SILVA, A. M.; OLIVEIRA, M. I.; SETTE, L.; ALMEIDA, C. R.; OLIVEIRA, M. J.; BARBOSA, M. A.; SANTOS, S. G. Resveratrol as a natural anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  45 molecule: Implications to dendritic cells and their crosstalk with mesenchymal stromal cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1-12, 2014.

SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. P. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk

extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 137, p. 37–44, 2013.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. P. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 137, p. 37-44, 2013.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SILVA, R. O. C. **Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação do sêmen caprino**. Dissertação Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2011.

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

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by nor-epinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 325–395, 2003.

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.

SIROTKIN, A. V.; SCHAEFFER, H. J. Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. **Journal of Endocrinology**, v. 154, p. 1–5, 1997.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; ZMIJEWSKI, M. A.; WORSMAN, J.; PAUS, R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, p. 17– 24, 2008.

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

SMITH, M. D.; BAKER, P. C. Maturation of melatonin synthesis in lateral eyes of mouse. **General Pharmacology**, v. 5, p. 275–277, 1974.

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. 09, 1999.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J.; QI, W. B.; ZHANG, M.; WEINTRAUB, S. T.; CABRERA, J.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1472, p. 206– 214, 1999.

TARDIF, A. L.; FARREL, P. B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R. H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. **Journal of Dairy Science**, v.80, p. 1606-1612, 1997.

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

TREJO, A.; PERALTA, M.; CASTRO, O. Frozen caprine semen in tris–egg yolk–based extenders. In: International Conference on Goat, 4, Brasília, DF, Brazil. **Proceedings...** Brasília: EMBRAPA/DDT, v. 2, p. 1499-1500, 1987.

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

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VOSS, J. L.; PICKETT B. W. **Reproductive management of the brood mare**. Fort Collins: Colorado State University, in co-operation with Animal Reproduction Laboratory, p. 29, 1976. (General Series, 961).

WATSON, P. F. The protection of ram and bull spermatozoa by low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing. *Journal of Thermal Biology*, v. 1, p. 137-141, 1976.

WATSON, P. F. Artificial insemination and the preservation of semen. *In: Lamming GE (Ed.)*. Edinburgh: Churchill-Livingstone. **Marshall's Physiology of Reproduction**, v. 2, p. 747-869, 1990.

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.

## 4 ARTIGO

### 4.1 Efeito da suplementação com melatonina em diferentes diluidores sobre a qualidade do sêmen criopreservado de caprinos

*Effect of melatonin supplementation in different extenders on cryopreserved sperm quality in goats*

#### Resumo

Objetivou-se neste estudo determinar o efeito da suplementação da melatonina em diferentes diluidores de criopreservação do sêmen caprino, sobre os parâmetros de cinética e viabilidade espermática pós-descongelação. Cinco *pools* de sêmen, obtidos de três reprodutores caprinos, foram congelados em diluidor à base de leite desnatado (LD) ou gema de ovo (TGO) e suplementados com diferentes concentrações de melatonina (0, 0,5, 1, 2 e 4 mM). Após a descongelação, as amostras foram avaliadas nos momentos 0 e após 2 horas de incubação (37 °C), quanto aos parâmetros cinéticos e de viabilidade (integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e produção intracelular de ROS). Os dados foram analisados usando o procedimento Glimmix do SAS. O sêmen congelado-descongelado em LD demonstrou maiores ( $p < 0,05$ ) valores de cinética espermática, quando comparado ao TGO. Em relação aos parâmetros de viabilidade observou-se que o TGO proporcionou maior ( $p < 0,05$ ) valor de alto potencial de membrana mitocondrial que o LD, não sendo demonstrado diferenças entre os diluidores nos demais parâmetros avaliados. A suplementação com melatonina influenciou ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros de cinética e viabilidade do sêmen caprino congelado-descongelado, sendo os valores obtidos na concentração de 4 mM de melatonina inferior ( $p < 0,05$ ) ao do grupo controle. Em conclusão, o diluidor a base de leite desnatado resultou em melhor desempenho *in vitro* em comparação ao de gema de ovo. Além disso, a adição de 4 mM de melatonina nos diluidores testados no presente estudo mostrou-se deletéria a qualidade do sêmen pós descongelação.

**Palavras-chave:** Criopreservação, bode, melatonina, antioxidante.

## **Abstract**

The objective of this study was determine the effects of the addition of melatonin on different cryopreservation diluents for goat semen, and its effects on the kinetic parameters and post-thawing sperm viability. Five semen pools, obtained from three male goats, were frozen using extenders based on skimmed milk (SM) or egg yolk (EY), and supplemented with different concentrations of melatonin (0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM and 4 mM). After thawing, samples were evaluated at 0 and after 2 h incubation at (37 °C) for kinetic and viability parameters (plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential and intracellular production of ROS). Data were analyzed using the Glimmix SAS procedure. The frozen-thawed semen in SM showed higher ( $p < 0.05$ ) sperm kinetic values when compared to EY. Regarding the viability parameters, it was observed that the EY provided a higher ( $p < 0.05$ ) high mitochondrial membrane potential value than the SM, and no differences were found among the extenders in the other parameters evaluated. The melatonin supplementation influenced ( $p < 0.05$ ) the kinetic and viability parameters of the frozen-thawed goat semen, being the values obtained in the concentration of 4 mM melatonin lower than in the control group ( $p < 0.05$ ). In conclusion, post-thaw kinetic parameters and viability after two hours of incubation were acceptable in both extenders, this suggests the potential utilization of cryopreserved goat semen. Was found that the skimmed milk extender improved *in vitro* performance better than egg yolk. Moreover, the addition of 4 mM melatonin in any extender is deleterious to post-thaw semen quality. Lower concentrations of melatonin tested, despite no deleterious effects observed, did not improve the sperm quality.

**Keywords:** *Cryopreservation, buck, melatonin, antioxidant.*

## **1. Introdução**

O processo de congelação causa danos aos espermatozoides, prejudicando a motilidade, viabilidade e fertilidade desta célula (LEBOEUF et al., 2000). Por esta razão, vários métodos visando aprimorar a técnica de criopreservação foram desenvolvidos (SALAMON; MAXWELL, 1995).

O propósito do diluidor é proteger as células espermáticas durante a criopreservação, por isso a escolha do crioprotetor não penetrante a ser utilizado é um dos fatores primordiais para o sucesso da congelação dos espermatozoides. A gema de

ovo e o leite desnatado são componentes tradicionalmente utilizados para criopreservar o sêmen caprino (PURDY, 2006; FOROUZANFAR et al., 2010), no entanto, modificações destes diluidores tem sido investigadas com resultados distintos (AIRES et al., 2003; ROOF et al., 2012).

Além disso, altas concentrações de espécies reativas ao oxigênio (ROS) são produzidas na criopreservação (KIM et al., 2010), e esse aumento das ROS é um dos principais causadores de danos às células espermáticas (AGARWAL; SAID, 2005). Assim, a adição de substâncias antioxidantes aos diluidores de sêmen tem sido utilizada visando reduzir a produção de ROS (BERRA; RIZZO, 2009).

A melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina), um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal (AWAD et al., 2006), tem sido considerada um potente antioxidante, pois protege as células da apoptose, além de inibir a peroxidação lipídica (CASAO et al., 2010b), estimulando enzimas antioxidantes e sequestrando radicais livres (DU PLESSIS et al., 2010; REITER et al., 2013). A propriedade antioxidante da melatonina vem sendo testada no sêmen de várias espécies, pois a presença dos receptores de melatonina na célula espermática (FUJINOKI, 2008) e a descoberta deste hormônio no plasma seminal (CASAO et al., 2010a), sugere o seu papel em preservar a qualidade e viabilidade do sêmen durante a criopreservação.

Com o intuito de minimizar os danos causados pela criopreservação, diversos estudos estão focados na utilização de antioxidantes e modificação dos meios diluidores (MAYA-SORIANO et al., 2013; VIDAL et al., 2013), no entanto, nenhum estudo anterior relatou os efeitos da suplementação de melatonina ao diluidor de sêmen caprino. Desta forma, objetivou-se investigar o efeito *in vitro* da suplementação de diferentes concentrações de melatonina em dois diluidores de sêmen caprino sobre parâmetros cinéticos e viabilidade espermática.

## **2. Material e Métodos**

Todos os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), licença n° 025/2016 CEUA/UFRPE.

### *2.1. Reagentes*

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), exceto os fluorocromos CM-H<sub>2</sub>DCFDA (5-(e-6)-carboxi-2',7'-diacetato de

diclorodihidrofluoresceína) e do fosfato salino tamponado (PBS), adquiridos da Molecular Probes® e Gibco® (Life Technologies, EUA), respectivamente. A solução estoque de melatonina (1 M) foi preparada em DMSO e armazenada a -20 °C.

## 2.2. Animais, colheita e avaliação do sêmen fresco

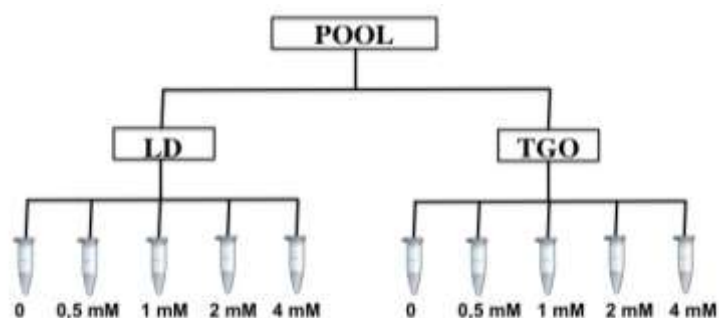
Foram utilizados três bodes sexualmente maduros, da raça Saanen, os quais foram mantidos em baias individuais, alimentados com feno de capim Tifton, ração comercial peletizada (400 g/dia), além de sal mineral e água *ad libitum*.

As colheitas de sêmen foram realizadas pelo método de vagina artificial, com auxílio de uma fêmea como manequim. Foram obtidos cinco ejaculados de cada reprodutor, em dias alternados, totalizando 15 ejaculados. Imediatamente após a colheita, os ejaculados foram submetidos às análises microscópicas (turbilhonamento, motilidade e vigor) de forma subjetiva, em microscópio de contraste de fase (Olympus, Japão; 100x). Os ejaculados que apresentaram valores mínimos de 70% de motilidade total, foram aprovados e destinados à formação do *pool*. Em seguida, a concentração espermática do *pool* foi determinada utilizando a câmara de Neubauer e a motilidade espermática foi analisada pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA, SCA™; Microptics, S.L., Versão 5.1, Barcelona, Espanha).

## 2.3. Criopreservação do sêmen

O *pool* de sêmen foi submetido duas vezes ao processo de lavagem com Tampão TRIS (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose, 100 mL de água MilliQ, pH 6,8), por meio de centrifugação (600 g/ 10 min) para remoção do plasma seminal. Em seguida, metade da amostra foi destinada à diluição em meio à base de Leite desnatado (LD; 10 g leite em pó desnatado; 0,0194 g glicose; 100 mL de água MilliQ; 5% glicerol, pH 6,8) e a outra metade em Tris-gema de ovo (TGO; 3,786 g de Tris; 2,172 g de ácido cítrico; 0,625 g de glicose; 20% de gema de ovo; 100 mL de água MilliQ; 5% de glicerol, pH 6,8), na concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Após diluição, procedeu-se à formação dos grupos experimentais, aos quais foram adicionados diferentes concentrações de melatonina: 0 (controle), 0,5, 1, 2 e 4 mM (Figura 1).





**Figura 1.** Fluxograma do delineamento experimental desde a obtenção do *pool* à formação dos grupos experimentais. LD: Diluidor à base de Leite Desnatado. TGO: Diluidor à base de Tris-gema de ovo.

As amostras de cada grupo foram envasadas em palhetas (0,25 mL), as quais foram identificadas e congeladas em sistema automatizado (TK Tecnologia em congelação LTDA, Uberaba, Brasil), utilizando curva de refrigeração de  $-0,25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , até atingir  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura na qual o material permaneceu por 120 min (tempo de estabilização). Em seguida, foi iniciada a curva de congelação ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), até atingir  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Então, as palhetas foram imersas e estocadas em nitrogênio líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), até o momento das análises.

#### 2.4. Descongelção e avaliação do sêmen

Duas palhetas de sêmen de cada grupo experimental foram descongeladas ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ seg}$ ), agrupadas e submetidas a avaliações imediatamente após a descongelção (T0) e após 2 horas de incubação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (T2). Foram realizadas cinco repetições para todos os grupos experimentais.

##### 2.4.1. Análise de cinética espermática

Alíquotas ( $10\text{ }\mu\text{L}$ ) de sêmen foram diluídas nos respectivos diluidores (LD e TGO, sem glicerol), para a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoide/mL, e incubadas em banho-maria ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$ ). A avaliação da cinética espermática foi realizada no sistema CASA. Uma alíquota ( $3\text{ }\mu\text{L}$ ) da amostra diluída foi colocada sobre lâmina e coberta com lamínula ( $18 \times 18\text{ mm}$ ), ambas pré-aquecidas ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), e avaliada em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japão, 100x). As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologies<sup>TM</sup> A312FC, Alemanha). Para cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados, com

registro de, no mínimo, 500 células espermáticas. As variáveis analisadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %); velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade em linha reta (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ); velocidade média da trajetória (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ). Os valores do sistema CASA foram mensurados com as seguintes configurações: temperatura 37 °C; magnificação, 100x; número de imagens, 25; imagens por segundo, 25; área da cabeça, 20 a 70  $\mu\text{m}^2$ ; VAP: lentos 10  $\mu\text{m/s}$ <médios 45  $\mu\text{m/s}$ <rápidos 75  $\mu\text{m/s}$ ; progressividade, 80% STR; circular, 50% LIN.

#### 2.4.2. Análises de citometria de fluxo

Os seguintes procedimentos foram realizados para análise de integridade das membranas plasmática e acrossomal (iMPA), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e produção intracelular de ROS (iROS). Aliquotas (40  $\mu\text{L}$ ) de sêmen de cada grupo experimental foram distribuídas em microtubos (1,5 mL), para cada uma das avaliações, aos quais foram adicionados 1 mL de PBS, e homogeneizadas. Em seguida, realizou-se a centrifugação (600 g/10 min) para retirar o diluidor; então, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 40  $\mu\text{L}$  de PBS.

Para análise de iMPA, as amostras foram coradas com 1  $\mu\text{L}$  de FITC conjugada ao *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; Solução estoque 1 mg/mL em PBS; Solução de trabalho 0,4 mg/mL em PBS) e 2,0  $\mu\text{L}$  de Iodeto de Propídio (IP; Solução estoque 25 mg/mL em DMSO; Solução de trabalho 0,5 mg/mL em PBS). Após coloração, as amostras foram incubadas por 10 min à temperatura ambiente, e em seguida avaliadas. Células que apresentaram marcação PNA-/IP- foram classificadas como portadoras de membranas acrossomal e plasmática intactas; células com marcação PNA+/IP- foram classificadas como portadoras de membrana acrossomal reagida e plasmática intacta; células com marcação PNA-/IP+ foram classificadas como portadoras de membrana acrossomal intacta e plasmática lesionada; e células com marcação PNA+/IP+ foram classificadas como portadoras de membranas acrossomal e plasmática lesionadas.

Para análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM), adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de JC-1 (Solução estoque 5 mg/mL em DMSO; Solução de trabalho 153  $\mu\text{M}$  em DMSO) às amostras de sêmen. A seguir, as amostras foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente e avaliadas. Células com peças intermediárias coradas em laranja foram classificadas com portadoras de alto potencial de membrana mitocondrial

(aPMM) e células com peça intermediária coradas em verde foram classificadas como portadoras de baixo potencial de membrana mitocondrial (bPMM).

Para análise iROS foram adicionados 2  $\mu$ L de CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Solução estoque 0,5 mM em DMSO; Solução de trabalho 50  $\mu$ M em PBS) às amostras, as quais foram incubadas a 37 °C por 30 min. Em seguida, foram diluídas com 1 mL de PBS e centrifugadas (600 x g/10min) para remoção do fluorocromo não ligado e o *pellet* foi ressuspenso com 40  $\mu$ L de PBS. A seguir, adicionou-se 1  $\mu$ L de IP, procedeu-se à incubação (temperatura ambiente por 10 min) e avaliação. Os resultados foram expressos como porcentual de células viáveis com altos níveis de ROS (DCFDA+/IP-), aquelas marcadas em verde fluorescente; ou células viáveis com baixa produção de ROS (DCFDA-/IP-), aquelas com baixa intensidade de fluorescência.

Todas as análises foram realizadas utilizando o citômetro de fluxo Amnis ImageStream<sup>x</sup> Mark II (EMD Millipore Corp.), equipado com microscópio com objetiva de 60x, com taxa de captura de imagem de 5000 células/seg. O tamanho das células foi 7  $\mu$ m e a velocidade do fluxo 44 mm/segundo. A aquisição das imagens brutas foi obtida através do software INSPIRE<sup>®</sup> e as análises foram realizadas através do software IDEAS<sup>®</sup> (versão 6.0). Todos os fluorocromos foram excitados por um laser de 488 nm. Para a associação FITC-PNA+IP, a potência do laser utilizada foi de 55 mW, o FITC-PNA foi detectado no canal 2 (505-560 nm) e o IP no canal 5 (640-745 nm). Para o JC-1, a potência do laser foi de 130 mW e a detecção nos canais 2 e 4 (595-640 nm). Para o DCFDA+IP, a potência do laser foi de 80 mW e os canais 2 e 5, respectivamente. Foram capturados aproximadamente 5000 eventos por amostra.

## 2.5 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão da média (SEM), com as distribuições apresentadas nas escalas originais para auxiliar na interpretação. Todas as comparações estatísticas foram realizadas usando médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos. Os dados obtidos foram analisados usando o procedimento Glimmix do SAS (Sistema para Windows, Versão 9.3; SAS Instituto Inc., Cary, NC, USA), com metodologia de modelos lineares generalizados. Para MT, MP, LIN, STR, iMPA, aPMM e iROS, utilizou-se uma distribuição binomial empregando a função *logit link*, e para VCL, VSL e VAP, a distribuição Gaussiana utilizando a função link de identificação. As variáveis foram analisadas por meio de um modelo matemático que incluiu os efeitos fixos dos

diluidores (LD ou TGO), concentração de melatonina (0, 0,5, 1, 2, 4 mM), tempo (T0 e T2) e interações entre diluidor vs. tempo; diluidor vs. concentração de melatonina; concentração de melatonina vs. tempo; e diluidor vs. concentração de melatonina vs. tempo, bem como os efeitos aleatórios da repetição. O método residual foi utilizado para calcular os graus denominadores de liberdade para aproximar os testes F nos modelos mistos. As comparações ortogonais foram utilizadas para determinar o efeito da melatonina (controle vs. melatonina).

### 3. Resultados

Os resultados da motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) estão apresentados na Figura 2. Independente do tempo de avaliação e da suplementação antioxidante, o sêmen congelado-descongelado em LD demonstrou maiores ( $p < 0,05$ ) valores de MT e MP, quando comparado ao TGO. Além disso, quando considerado o efeito do tempo de avaliação, independente do diluidor e da suplementação antioxidante, observou-se que MT e MP foram maiores ( $p < 0,05$ ) no T0 que no T2. A suplementação com melatonina, independente do tempo de avaliação e do diluidor utilizado, influenciou nos parâmetros de MT e MP do sêmen caprino congelado-descongelado, sendo os valores obtidos na concentração de 4 mM de melatonina inferiores ( $p < 0,05$ ) ao do grupo controle. Foi observada interação Diluidor vs. Tempo (D x T;  $p < 0,05$ ) para MT e MP.

Os resultados de linearidade (LIN), retilinearidade (STR), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média da trajetória (VAP) e velocidade curvilínea (VCL) estão apresentados na Figura 3. Independente do tempo de avaliação e da suplementação antioxidante, o sêmen congelado-descongelado em LD demonstrou maiores ( $p < 0,05$ ) valores de LIN, STR, VSL, VAP e VCL, quando comparado ao TGO. Quando considerado o efeito do tempo de avaliação, independente do diluidor e da suplementação antioxidante, observou-se que as variáveis LIN, VSL, VAP e VCL foram maiores ( $p < 0,05$ ) no T0 que no T2. A suplementação com melatonina, independente do tempo de avaliação e do diluidor utilizado, influenciou nos parâmetros de LIN, STR, VSL e VAP do sêmen caprino congelado-descongelado, sendo os valores obtidos na concentração de 4 mM de melatonina inferiores ( $p < 0,05$ ) ao do grupo controle. Houve interação Diluidor vs. Tempo (D x T;  $p < 0,05$ ) para as variáveis VSL, VAP e VCL, e interação Diluidor vs. Tempo vs. Antioxidante (D x M x T;  $p < 0,05$ ) para a variável STR.

Em relação aos parâmetros de integridade de membrana plasmática e acrossomal (iMPA), produção intracelular de ROS (iROS) e alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM) que estão apresentados na Figura 4, observou-se que o TGO proporcionou maior ( $p < 0,05$ ) valor de aPMM que o LD, não sendo demonstrado diferenças entre os diluidores nos demais parâmetros avaliados. A suplementação com melatonina, independente do tempo de avaliação e do diluidor utilizado, influenciou ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros de iMPA, iROS e aPMM do sêmen caprino congelado-descongelado, sendo os valores obtidos na concentração de 4 mM de melatonina inferiores ( $p < 0,05$ ) ao do grupo controle. Observou-se ainda interação Antioxidante *vs.* Tempo ( $M \times T$ ;  $p < 0,05$ ) para a variável aPMM, interação Diluidor *vs.* Tempo ( $D \times T$ ;  $p < 0,05$ ) para a variável de aPMM e interação Diluidor *vs.* Tempo *vs.* Antioxidante ( $D \times M \times T$ ;  $p < 0,05$ ) para a variável STR.

#### **4. Discussão**

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram claramente a superioridade do diluidor LD em relação ao TGO na preservação da qualidade pós-descongelação do sêmen caprino.

A motilidade e a viabilidade espermáticas mensuradas logo após a descongelação do sêmen têm sido utilizadas como indicativo de qualidade seminal, porém este indicador parece não ser tão confiável, pois não considera a longevidade dos espermatozoides (DORADO et al., 2007). Além disso, em ovinos, tem sido relatado haver correlação significativa entre fertilidade e os parâmetros de cinética avaliados após incubação por 2 h a 37 °C, em diluidor de congelação (DEL OLMO et al., 2013). Dessa forma, neste estudo, a determinação da qualidade espermática foi realizada logo após a descongelação e depois de 2 horas de incubação a 37 °C.

Não há consenso sobre o melhor diluidor para criopreservação do sêmen caprino, em consequência disso, cada grupo de pesquisa utiliza seu próprio protocolo. O sêmen caprino é tradicionalmente criopreservado em diluidores que tem por base gema de ovo e/ou leite desnatado, porém, em virtude das possíveis interações deletérias entre estes constituintes e a Fosfolipase A2, presente no plasma seminal do caprino (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000), a lavagem do sêmen foi realizada, portanto, tais interações deletérias não devem ter contribuído para os resultados obtidos neste trabalho.

Além do momento da avaliação, outro fator que pode influenciar a determinação da cinética e da viabilidade espermática é a composição do diluidor. Os diluidores à base de gema de ovo têm sido implicados como meios de elevada viscosidade (AIRES et al., 2003), possivelmente em função do elevado nível de gema utilizado (ROOF et al., 2012) e/ou presença de debris (DE LEEW et al., 1993), esse conjunto de fatores poderia explicar o motivo pelo qual, nas condições do presente estudo, o diluidor LD foi mais efetivo em preservar a cinética espermática que o TGO.

A cinética espermática é importante para estimar a qualidade do sêmen criopreservado, no entanto, os parâmetros de integridade de membrana plasmática e acrossomal são essenciais na avaliação da viabilidade espermática (HOLT, 2000), visto que durante a fecundação, os eventos envolvidos na reação do acrossoma e fusão com o oócito, requerem uma membrana plasmática intacta (TARTAGLIONE; RITTA, 2004).

Nossos resultados demonstraram que o diluidor LD interferiu negativamente no PMM do sêmen congelado-descongelado, porém, esse efeito sugeriu que o leite desnatado induz alterações na membrana mitocondrial que não se refletem em modificações na motilidade espermática. Em contraste a adição de gema de ovo evitou em parte a diminuição do PMM após descongelação e incubação.

Vale ressaltar que a proporção de espermatozoides móveis e progressivos foi maior que a proporção de espermatozoides com aPMM no sêmen diluído em LD, o que sugere que muitos espermatozoides eram móveis, apesar da baixa atividade mitocondrial, e ainda eram móveis após 2 horas de incubação. Esses resultados suportam a ideia de que a motilidade espermática pode ser independente da atividade mitocondrial, como já foi proposto em bovinos e ovinos (MARTIN et al., 2007; DEL VALLE et al., 2012). Visto que a fosforilação oxidativa contribui para a produção de ATP, no entanto, estudos vem sugerindo que a via glicolítica é a fonte de energia mais importante para a motilidade espermática em algumas espécies (NASCIMENTO et al., 2008; LOSANO et al., 2017).

De fato, considerou-se que o principal papel das mitocôndrias espermáticas era a produção de energia para a motilidade espermática, mas este conceito está sendo avaliado e as funções das mitocôndrias provavelmente serão ampliados à medida que mais pesquisa são conduzidas (MARIN et al., 2003; MIKI et al., 2004, MUKAI e OKUNO, 2004). Por outro lado, os mecanismos pelos quais o diluidor a base de leite desnatado afeta a função mitocondrial de espermatozoides caprinos após descongelação permanece obscuro e necessita de futuras investigações.

Tem sido determinado que o processo de criopreservação de sêmen provoca um decréscimo de aproximadamente 50% da viabilidade espermática (WATSON, 2000), e este prejuízo pode ser decorrente do aumento das ROS. Quando esta produção é maior que a capacidade antioxidante, ocorre o estresse oxidativo, caracterizando em danos à célula espermática (GUTHRIE; WELCH, 2012). O controle do estresse oxidativo tem impacto fisiológico sobre as funções espermáticas, particularmente na capacitação, hiperativação da motilidade, reação acrossomal e fertilização (AITKEN, 1995). Na tentativa de minimizar os efeitos negativos do estresse oxidativo, a suplementação dos diluidores de sêmen com substâncias antioxidantes tem sido amplamente descrita (MAYA-SORIANO et al., 2013).

A melatonina tem sido utilizada em alguns estudos como agente antioxidante para melhorar a qualidade do sêmen. Sabe-se que sua função é eliminar os radicais livres gerados pelo estresse oxidativo (REITER et al., 2005) e a proteção da integridade da membrana de espermatozoides do choque térmico durante o congelamento-descongelamento do sêmen ovino (SUCCU et al., 2011). Também tem sido utilizado para aumentar a motilidade e viabilidade de espermatozoides bovino após o processo de criopreservação, sendo 2 ou 3 mM/ml a concentração mais benéfica detectada (ASHARAFI et al., 2013). Estas concentrações relatadas são semelhantes àquelas usadas em nossa investigação.

Contudo, o uso da melatonina na tentativa de melhorar a qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento não foi suficiente para alcançar resultados significativos, pelo menos nas concentrações utilizadas neste estudo. Concentrações mais baixas de melatonina (0,5, 1 e 2 mM), adicionadas aos diluidores LD ou TGO, não influenciaram nenhum dos parâmetros avaliados. Estes resultados contrastam com os achados que demonstraram que as concentrações de melatonina de 1, 1,5 e 2 mM melhoram as taxas de motilidade espermática e diminuem a peroxidação lipídica em equinos (IZADPANAHI et al., 2015).

Além disso, amostras com 4 mM de melatonina em LD ou TGO, tiveram um percentual significativamente menor de espermatozoides com membranas plasmática e acrosomais íntegras, e com alto potencial de membrana mitocondrial, assim como a intensidade total de fluorescência para ROS intracelular foi significativamente maior do que o controle.

A redução de ROS intracelular em espermatozoides humano quando do uso de 6 mM de melatonina está associada à sua ação antioxidante amplamente descrita

(GAVELLA; LIPOVAC, 2000). No entanto, a melatonina a 4 mM parece ser uma molécula pró-oxidante para espermatozoides caprinos, como outras substâncias descritas como antioxidantes que em certa concentração geram um efeito inverso (SOUZA et al., 2016).

Isto pode ser explicado por um efeito duplo da melatonina que está relacionado tanto com a concentração de antioxidante utilizada (CASAO et al., 2010b; GOMEZ et al., 2010) como com a estrutura celular onde seus efeitos foram analisados (LETELIER et al., 2010). Consequentemente, a melatonina pode ter aumentado os níveis de ROS e promovido a oxidação das membranas plasmática, acrossomal e danos às mitocôndrias em certas concentrações, atuando como substância pró-oxidante no sêmen caprino, como observado neste estudo. Portanto, é necessário ajustar a composição do diluidor, crioprotetores e concentrações de antioxidantes, bem como o protocolo de criopreservação para cada espécie ou mesmo raças.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se, com base nos parâmetros cinéticos e de viabilidade que o diluidor a base de leite desnatado resulta em melhor desempenho *in vitro* em comparação ao diluidor a base de gema de ovo. Além disso, a adição de 4 mM de melatonina em quaisquer dos meios diluidores testados no presente estudo, é deletéria à qualidade do sêmen pós descongelação. Menores concentrações de melatonina testadas, apesar de não deletérias não melhoraram a qualidade espermática.

#### **Declaração de interesses dos autores**

Não há interesses concorrentes que tenham sido declarados.

#### **Fonte de financiamento**

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPq).

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à FACEPE pela concessão de bolsa de mestrado, e ao CNPq pelo auxílio financeiro.



## Referências

AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU Internation**, v. 95, p. 503–507, 2005.

AIRES, V. A.; HINSCH, K. D.; SCHLOESSER, F. M.; BOGNER, K.; SCHLOESSER, S. M.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolkbased and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 269-279, 2003.

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.

ASHARAFI, I.; KOHRAM, H.; ARDABILI, F. F. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 139, p. 25-30, 2013.

AWAD, H.; HAKAWA, F.; MOSTAFA, F.; ATTA, H. Melatonin hormone profile in infertile males. **International Journal Andrology**, v. 29, p. 409-413, 2006.

BERRA, B.; RIZO, A. M. Melatonin: circadian rhythm regulator, chronobiotic, antioxidant and beyond. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 202–209, 2009.

CASAO, A.; CEBRIÁN, I.; ASUMPCÃO, M.; PÉREZ-PÉ, R.; ABECIA, J.; FORCADA, F.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, art. 59, 2010a.

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

DE LEEUW, F. E.; DE LEEUW, A. M.; DEN DAAS, J. H.; VERKLEIJ, A. J.; COLENBRANDER, B. Effects of various cryoprotective agents and membranestabilizing compounds on bull sperm membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 30, p. 32-44, 1993.

DEL OMO, E.; BISBAL, A.; MAROTO-MORALES, A.; GARCÍA-ALVAREZ, O.; RAMON, M.; JIMENEZ-RABADAN, P.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J.; FERNANDEZ-SANTOS, M. R. Fertility of cryopreserved ovine sêmen

is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 102-109, 2013.

DEL VALLE, J.; GÓMEZ-DURÁN, A.; HOLT, W. V.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Soy Lecithin Interferes With Mitochondrial Function in Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 4, 2012.

DORADO, J.; RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparasion of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Science Direct**, v. 68, p. 168-177, 2007.

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

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S. M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ADEBI, P.; NILI, N.; RAHMANI, R. H.; NASRESFAHANI, M. H. In vitro comparasion of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, p. 480-487, 2010.

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

GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. **Archives of Andrology**, v. 44, p. 23-27, 2000.

GOMEZ, E. V.; PEREZ, Y. M.; SANCHEZ, H. V.; FORMENT, G. R.; SOLER, E. A.; BERTOT, L. C.; GARCIA, A. Y.; DEL ROSARIO ABREU VAZQUEZ, M.; FABIAN L. G. Antioxidant and immunomodulatory effects of Viusid in patients with chronic hepatitis C. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, p. 2638-2647, 2010.

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

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 56, p. 47-58, 2000.

IZADPANA, G.; ZARE-SHAHNEH, A.; ZHANDI, M.; YOUSEFIAN, I.; EMAMVERDI, M. Melatonin has a beneficial effect on stallion sperm quality in cool condition. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, p. 555-559, 2015.

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

LETELIER, M. E.; JARA-SANDOVAL, J.; MOLINA-BERRÍOS, A.; FAÚNDEZ, M.; ARACENA-PARKS, P.; AGUILERA, F. Melatonin protects the cytochrome P450 system through a novel antioxidant mechanism. **Chemico-Biological Interactions**, v. 185, p. 208-214, 2010.

LOSANO, J. D. A.; ANGRIMANI, D. S. R.; DALMAZZO, A.; RUI, B. R.; BRITO, M. M.; MENDES, C. M.; KAWAI, G. K. V.; VANNUCCHI, C. I.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; BARNABE, V. H.; NICHI, M. Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 1-9, 2017.

MARIN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S.; LEE, W. N.; BOROS, L. G.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; CENTELLES, J. J.; MEDRANO, A.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; CASCANTE, M. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **FEBS Letters**, v. 554, p. 342-346, 2003.

MARTIN, G.; CAGNON, N.; SABIDO, O.; SION, B.; GRIZARD, G.; DURAND, P.; LEVY, R. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 22, p. 380-388, 2007.

MAYA-SORIANO, M. J.; TABERNER, E.; SABÉS-ALSINA, M.; PILES, M.; LOPEZ-BEJAR, M. Absence of beneficial effects on rabbit sperm cell cryopreservation by several antioxidant agents. **Zygote**, v. 22, p. 1-10, 2013.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 540-547, 2004.

NASCIMENTO, J. M.; SHI, L. Z.; TAM, J.; CHANDSAWANGBHUWANA, C.; DURRANT, B.; BOTVINICK, E. L.; BERNS, M. W. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, p. 745-751, 2008.

KIM, S. H.; YU, D. H.; KIM, Y. J. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 282-292, 2010.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p. 215-225, 2006.

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

REITER, R. J.; TAN, D. X.; LEON J.; KILIC, U.; KILIC, E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, n. 2, p. 104-117, 2005.

ROOF, D. F.; BOWLEY, S.; PRICE, L. L.; MATSAS, D. J. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. **Theriogenology**, v. 77, p. 412-420, 2012.

SOUZA, H. M.; ARRUDA, L. C. P.; MONTEIRO, M. M.; NERY, I. H. A. V.; ARAUJO SILVA, R. A. J.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. G. The effect of canthaxanthin on the quality of frozen ram spermatozoa. **Biopreservation and Biobanking**, v. 0, n. 0, 2016.

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.

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, p. 1245-1252, 2004.

VIDAL, A. H.; BASTISTA, A. M.; SILVA, E. C. B.; GOMES, W. A.; PELINCA, M. A.; SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 47-51, 2013.

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

## LEGENDA DAS FIGURAS

**Figura 2.** Efeito de diferentes diluidores, suplementados ou não com melatonina, sobre a motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) do sêmen congelado-descongelado de caprinos (média dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão da média). A, B: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diluidores (LD vs. TGO); x, y: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de incubação (T0 vs. T2); \* quando presente, representa diferença ( $p < 0,05$ ) entre concentração de antioxidante (controle vs. tratamentos). LD: diluidor à base de leite desnatado; TGO: diluidor à base de gema de ovo; D: diluidor; T: tempo; M: antioxidante; D x T: interação diluidor vs. tempo..

**Figura 3.** Efeito de diferentes diluidores, suplementados ou não com melatonina, sobre a linearidade (LIN), retilinearidade (STR), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média da trajetória (VAP) e velocidade curvilínea (VCL) do sêmen congelado-descongelado de caprinos (média dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão da média). A, B: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diluidores (LD vs. TGO); x, y: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de incubação (T0 vs. T2); \* quando presente, representa diferença ( $p < 0,05$ ) entre concentração de antioxidante (controle vs. tratamentos). LD: diluidor à base de leite desnatado; TGO: diluidor à base de gema de ovo; D: diluidor; T: tempo; M: antioxidante; D x T: interação diluidor vs. tempo; D x T x M: interação diluidor vs. tempo vs. antioxidante.

**Figura 4.** Efeito de diferentes diluidores, suplementados ou não com melatonina, sobre integridade de membrana plasmática e acrossomal (iMPA), produção intracelular de ROS (iROS) e alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM) do sêmen congelado-descongelado de caprinos (média dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão da média). A, B: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diluidores (LD vs. TGO); x, y: quando presentes, representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de incubação (T0 vs. T2); \* quando presente, representa diferença ( $p < 0,05$ ) entre concentração de antioxidante (controle vs. tratamentos). LD: diluidor à base de leite desnatado; TGO: diluidor à base de gema de ovo; D: diluidor; T: tempo; M: antioxidante; D x T: interação diluidor vs. tempo; D x T x M: interação diluidor vs. tempo vs. antioxidante.

Figura 2

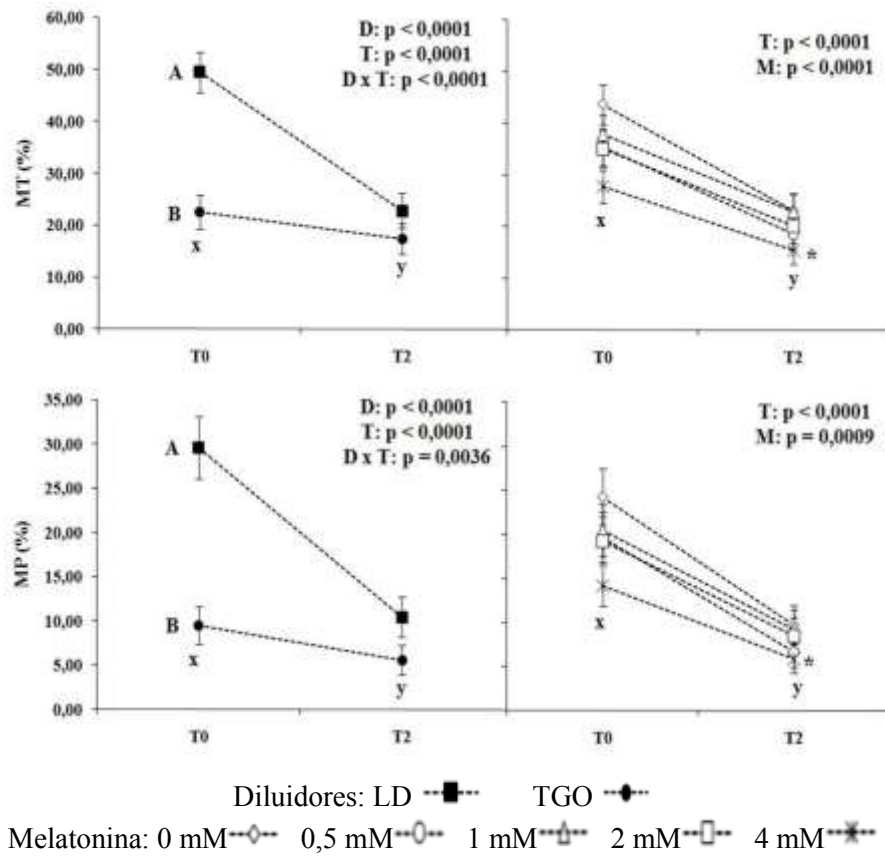
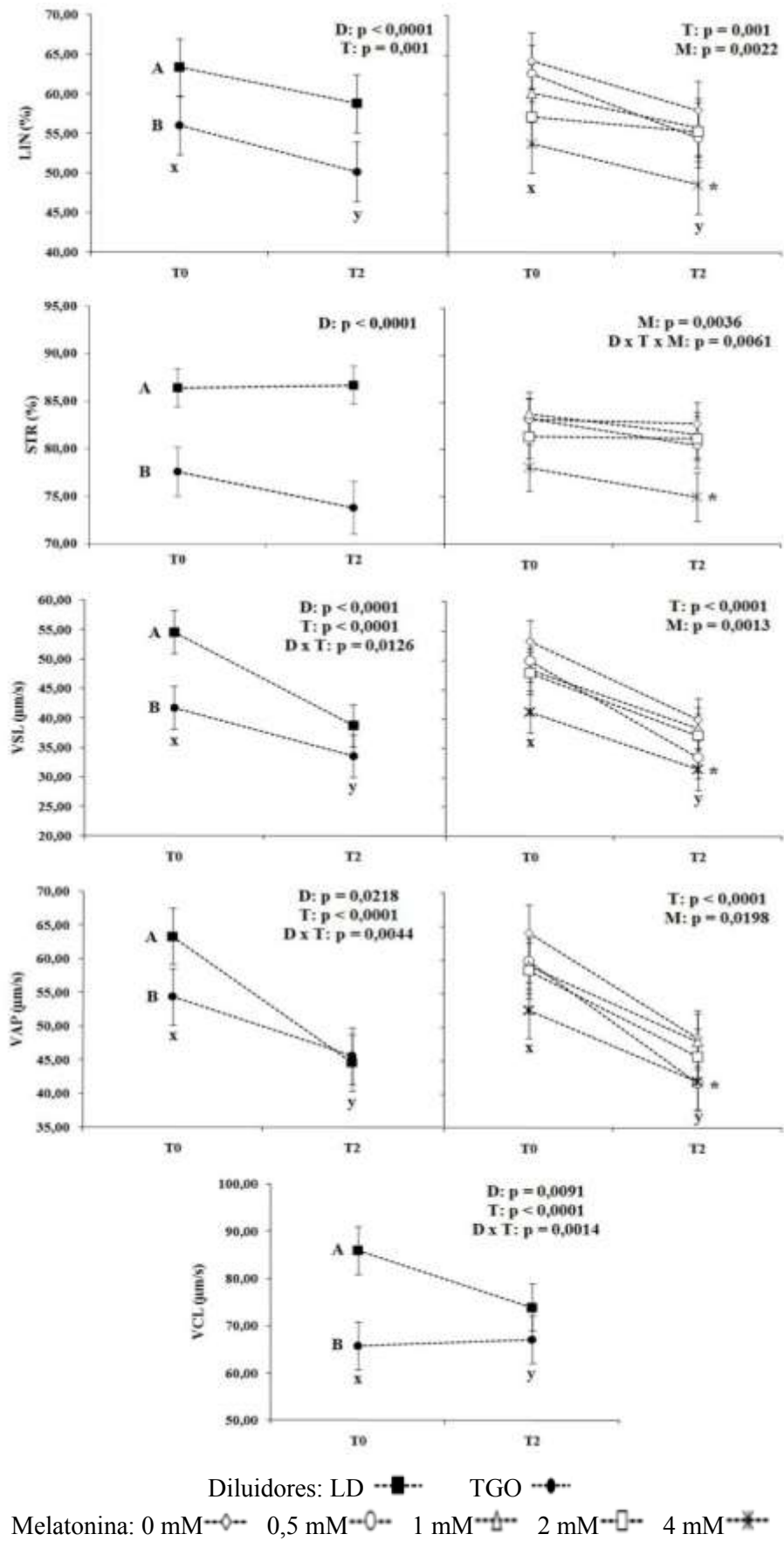


Figura 3



**Figura 4**

