



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

WILDELFRANCYS LIMA DE SOUZA

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA NO
SÊMEN DE CARNEIROS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS
ESPERMÁTICAS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

Petrolina – PE
2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

WILDELFRANCYS LIMA DE SOUZA

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA NO
SÊMEN DE CARNEIROS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS
ESPERMÁTICAS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito da obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elenice Andrade Moraes.

Petrolina – PE
2015

Souza, Wildelfrancys Lima

S719e Efeito de diferentes concentrações de melatonina no sêmen de carneiros sobre as características espermáticas após criopreservação / Wildelfrancys Lima de Souza. – Petrolina-PE, 2015.
xvi, 57 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2015.

Orientadora: profa. Dra. Elenice Andrade Moraes

Banca examinadora: Edilson Soares Lopes Junior, Ricardo Toniolli, Pedro Humberto Félix de Sousa.

Bibliografia.

1. Antioxidante. 2. Congelamento. 3. Espécies reativas de oxigênio. I. Título. II Univasf - Petrolina.

CDD 636.0824

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FOLHA DE APROVAÇÃO

WILDELFANCYS LIMA DE SOUZA

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA NO
SÊMEN DE CARNEIROS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS
ESPERMÁTICAS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

Banca Examinadora

Elenice Andrade Moraes, Doutora, CZOO/Univasf

Edilson Soares Lopes Junior, Doutor, CMVET/Univasf

Ricardo Toniolli, Doutor, PPGCV/UECE

Pedro Humberto Félix de Sousa, Doutor, DTCS/UNEB

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho e todos os outros sucessos da minha vida a minha família. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos àquele que compartilhei meus momentos de solidão e tristeza, de alegria e felicidade. Agradeço por todas as bênçãos que sempre colocou em meu caminho e por me amparar nos momentos mais difíceis, me fazendo sempre ter a fé, a força e o foco necessários para alcançar meus objetivos. Obrigado Deus, por tudo.

A minha família, por sempre me apoiar. A minha mãe pelo amor incondicional e orações, fazendo o possível e o impossível para me ajudar a vencer. Aos meus irmãos, pelo companheirismo e amizade.

A minha namorada, Gabiane, que esteve sempre ao meu lado. Obrigado por todo o companheirismo, compreensão, motivação, paciência, amizade e amor.

Agradeço, com muito orgulho e honra a Universidade Federal do Vale do São Francisco, onde me formei Zootecnista e onde concluo hoje meu Mestrado, o que é pra mim motivo de muita satisfação e alegria.

A professora e orientadora Dra. Elenice Andrade Moraes, pela oportunidade para realização dessa dissertação, compreensão, orientação, pela confiança, em todos os aspectos, depositada em mim, ética, e por estar presente em todos os momentos que solicitei.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudo cedida a mim, durante todo o meu Mestrado.

A Universidade do Estado da Bahia (UNEB), pela parceria e disponibilidade em ceder seus reprodutores para realização deste estudo.

Ao amigo e parceiro Jonathan, pela confiança, troca de experiência, apoio e dedicação para realização dos trabalhos. Parceiro fundamental para concretização desse estudo.

À toda a equipe, porque não dizer parceiros e colegas, do CPSENS, Laio, Dailli e Vitória, pela disponibilidade e dedicação, os quais não negaram esforços para me ajudar.

Aos membros da banca examinadora, Professor Dr. Pedro Humberto Félix de Sousa, pelo comprometimento, apoio e parceria. Ao Professor Dr. Edilson Soares Lopes Junior, pelos ensinamentos, desde a graduação, incentivo e bom humor. Ao Professor Dr. Ricardo Toniolli, por ter me recebido com carinho, pela confiança e apoio depositados em mim.

Ao professor Dr. Wagnér Pereira Félix, pelos ensinamentos, disponibilidade e ajuda na realização desse trabalho.

Ao estatístico da EMBRAPA Semiárido, Dr. Raimundo Parente de Oliveira, pela receptividade, descontração e disponibilidade.

A Assistente Administrativa do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Rosângela, pela atenção, paciência, disponibilidade, agilidade e qualidade no trabalho.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

EPÍGRAFE

“A arrogância cega o coração do ser humano,
fazendo-o enxergar apenas o que lhe convém.”

Paulo Cuba

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído de carneiros após criopreservação. Os ejaculados coletados foram diluídos em Tris-Gema de ovo, e a melatonina adicionada conforme os tratamentos: Controle; 100 pM; 100 nM; 100 µM e 1 mM de melatonina. Então, as amostras foram resfriadas, envasadas e congeladas com nitrogênio líquido. As amostras foram analisadas quanto à motilidade espermática, integridade da membrana plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial, quantificação do estresse oxidativo e a capacidade de ligação. As variáveis foram submetidas à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A motilidade total e progressiva dos espermatozoides descongelados foram maiores nas amostras tratadas com 100 pM de melatonina, 62,99 e 45,07% respectivamente, quando comparado aos demais tratamentos ($P < 0,05$). A adição de 100 pM, 100 nM e 100 µM de melatonina resultou em maior percentual de células com membrana plasmática íntegra (61,03, 59,06 e 55,50% respectivamente), quando comparado com o controle e 1 mM de melatonina ($P < 0,05$). Com relação ao acrossoma, a adição de 100 pM de melatonina promoveu maior percentual de espermatozoides com o acrossoma íntegro (96,51%) do que nos demais tratamentos ($P < 0,05$). Em relação à atividade mitocondrial, houve maior percentual de espermatozoides com alta atividade após a adição de 100 pM de melatonina (69,30%; $P < 0,05$). A adição de 100 nM de melatonina, reduziu a quantidade de TBARS após a criopreservação (2,84), quando comparado aos demais tratamentos utilizados ($P < 0,05$). O número de espermatozoides descongelados que se ligaram à membrana perivitelina, foi maior nas amostras que receberam a adição de 100 pM de melatonina (155,73; $P < 0,05$). Conclui-se que a adição de baixas concentrações de melatonina no sêmen diluído promoveu maior proteção aos espermatozoides contra os danos causados pelo estresse oxidativo, além de diminuir aqueles estruturais após congelação /descongelação, portanto, melhorando a qualidade espermática. Dentre as concentrações testadas, podemos verificar que a de 100 pM foi mais eficaz, entretanto, maiores pesquisas e outras avaliações são necessárias.

Palavras-chave: Antioxidante. Congelamento. Espécies reativas de oxigênio. Ovino.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of adding different concentrations of melatonin in ram sperm diluted after cryopreservation. The collected ejaculates were diluted in tris egg yolks and melatonin added as treatments: control; 100 pM; 100 nM; 100 µM and 1 mM of melatonin. Then, the samples were cooled, bottled and frozen with liquid nitrogen. Samples from each treatment were analyzed for spermatozoa motility, integrity of plasma membrane and acrosomal, mitochondrial activity, quantification of oxidative stress and the binding capacity. The variables were submitted to variance analysis and the means were compared by Tukey test at 5% probability. The total and progressive motility of thawed spermatozoa were higher in samples treated with 100 pM of melatonin, 62.99 and 45.07% respectively, when compared to other treatments ($P < 0.05$). The addition of 100 pM, 100 nM and 100 µM from melatonin it resulted in higher percentage of cells with plasma membrane integrity (61.03, 59.06 and 55.50% respectively), when compared with the control and 1 mM of melatonin ($P < 0.05$). Regarding the acrosome, the addition of 100 pM of melatonin promoted greater percentage of spermatozoa with acrosome integrate (96.51%) than the other treatments ($P < 0.05$). In relation to mitochondrial activity, there was a higher percentage of spermatozoa with high activity after adding 100 pM of melatonin (69.30%; $P < 0.05$). The addition of 100 nM of melatonin reduces the amount of TBARS after cryopreservation (2.84), when compared to other treatments ($P < 0.05$). The number of thawed spermatozoa which bind to perivitelline membrane was higher in samples that received the addition of 100 pM of melatonin (155.73; $P < 0.05$). It was concluded that the addition of low concentrations of melatonin in semen diluted promoted greater protection of spermatozoa against damage caused by oxidative stress and reduce those structural after freeze/thaw, therefore, improving sperm quality. Among the tested concentrations, we can see that the 100 pM was more effective, however, further research and other evaluations are necessary.

Key-words: Antioxidant. Freezing. Ovine. Reactive oxygen species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Redução de oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água. (Fonte: Adaptada de Nordberg e Arner, 2001).....	20
Figura 2. Estrutura molecular da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina). (Fonte: Adaptado de Caniato et al., 2003).....	25
Figura 3. Reação de Fenton. (Fonte: Adaptada de Nordberg e Arner, 2001).....	33
Figura 4. Integridade da membrana plasmática de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído. (A) Espermatozoides com núcleo corado em rosa da eosina; (B) espermatozoides com núcleo corado em escuro da nigrosina; (C) espermatozoides sem coloração.....	45
Figura 5. Integridade acrossomal de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído. A) acrossoma íntegro; B) acrossoma não íntegro.	46
Figura 6. Atividade mitocondrial de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído: DAB I (alta atividade mitocondrial); DAB II (espermatozoides com segmentos corados [ativos] e não corados [inativos], havendo predominância dos ativos); DAB III (espermatozoides com segmentos corados [ativos] e não corados [inativos], havendo predominância dos inativos); DAB IV (sem atividade mitocondrial).....	47
Figura 7. Espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído, corados com Hoechst 33342, ligados a MPV da gema do ovo.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Motilidade total e progressiva de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído.....	44
Tabela 2. Integridade da membrana plasmática (iMP) e acrossomal (iAC) de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído.....	45
Tabela 3. Atividade mitocondrial de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído.....	47
Tabela 4. Número de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) geradas de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído.....	48
Tabela 5. Número de espermatozoides descongelados de ovinos ligados à membrana perivitelina de gema de ovo (NEL) e sua eficiência de ligação (EFL) após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CASA: Computer Assisted Sperm Analysis (Análise espermática computadorizada)
- CCO: Citocromo C-Oxidase
- CPSENS: Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestre
- DAB: 3,3'-diaminobenzidina
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- E/N: Eosina-Nigrosina
- GPx: Glutathione peroxidase
- GR: Glutathione reductase
- GSH-Px: Glutathione peroxidase activities (atividades de glutathione peroxidase)
- GSH-Red: Glutathione Red (glutathione vermelha)
- HIOMT: Hidroxiindol- O-metil transferase
- iAC: Integridade acrossomal
- iMP: Integridade da membrana plasmática
- JC-1: Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina
- NaOH: Hidróxido de sódio
- NAT: N Acetil transferase
- NRC: National Research Council (Conselho Nacional de Pesquisa)
- PBS: Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)
- SAS: Statistical Analysis System
- SOD: Superóxido dismutase
- TRIS: Tris-hidroximetilaminometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. DESENVOLVIMENTO.....	18
2.1. Revisão de literatura.....	18
2.1.1. Diluentes.....	18
2.1.2. Criopreservação.....	19
2.1.3. Espécies reativas ao oxigênio (EROs) e a função espermática.....	20
2.1.3.1. Produção de EROs no sêmen.....	20
2.1.3.2. Danos causados ao espermatozoides pelas EROs.....	21
2.1.3.3. Sistemas de defesa antioxidantes no sêmen e no espermatozoide.....	22
2.1.4. Antioxidantes.....	23
2.1.5. Uso de antioxidantes no diluente.....	24
2.1.6. Melatonina.....	25
2.1.7. Testes laboratoriais para a avaliação espermática.....	27
2.1.7.1. Integridade de membrana plasmática.....	28
2.1.7.2. Integridade acrossomal.....	29
2.1.7.3. Atividade mitocondrial.....	30
2.1.7.4. Mensuração do estresse oxidativo.....	32
2.1.7.5. Avaliação da capacidade de ligação <i>in vitro</i>	33
2.2. Justificativa.....	35
2.3. Objetivos.....	36
2.3.1. Objetivo geral.....	36
2.3.2. Objetivos específicos.....	36
2.4. Material e métodos.....	37
2.4.1. Aspectos Éticos.....	37
2.4.2. Reagentes.....	37
2.4.3. Local de execução.....	37
2.4.4. Animais.....	37
2.4.5. Coleta e processamento do sêmen.....	38
2.4.6. Descongelação do sêmen.....	39
2.4.7. Avaliação da motilidade espermática.....	39
2.4.8. Avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal....	39

2.4.9. Avaliação da atividade mitocondrial.....	40
2.4.10. Avaliação da resistência ao estresse oxidativo.....	40
2.4.11. Teste de ligação.....	41
2.4.12. Análise estatística.....	43
2.5. Resultados.....	44
2.6. Discussão.....	50
3. CONCLUSÃO.....	55
4. REFERÊNCIAS.....	56
5. ANEXOS.....	69

1. INTRODUÇÃO

Dentre as biotécnicas existentes para a reprodução de ovinos, a inseminação artificial (IA) é a mais utilizada, sendo aquela que proporciona maior amplitude de resultados (BICUDO; SOUSA, 2003), pois possibilita a utilização de sêmen de um único macho para um grande número de fêmeas.

A criopreservação de sêmen de animais domésticos associada à IA é fundamental em qualquer programa de melhoramento genético, por permitir a estocagem de material genético de animais que estejam temporariamente ou permanentemente inábeis à reprodução, por difundirem amplamente o material genético de animais considerados superiores, bem como daqueles que estejam ameaçados de extinção (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Entretanto, o sucesso da criopreservação é parcial, uma vez que o processo de congelação/descongelação danifica cerca de 50% das células. Isso ocorre porque os espermatozoides ovinos apresentam alta sensibilidade ao estresse oxidativo em função das espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante o processo de criopreservação, devido à baixa quantidade de antioxidantes e à alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática (BUCAK et al., 2007). Os ácidos graxos são essenciais para a manutenção funcional das células espermáticas (HENKEL, 2005), mas as altas taxas de EROs podem afetar as funções mitocondriais e, conseqüentemente a motilidade espermática (DU, 2009).

A adição ao sêmen, de antioxidantes, seja ele lipossolúvel ou hidrossolúvel, aumenta a tolerância espermática ao dano oxidativo, após descongelação. Além disso, os antioxidantes ainda possuem a capacidade de neutralizar os radicais livres que causam a peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (BAUMBER; BALL; GRAVANCE, 2000). Sabe-se que os espermatozoides e o plasma seminal possuem enzimas e antioxidantes responsáveis pela remoção de quelante dos radicais livres. No entanto, isto não é suficiente para a proteção celular (SMITH et al., 1996).

A melatonina é um antioxidante terminal, não enzimático e não pró-oxidativo (TAN; REITER; MANCHESTER, 2002), que possui a capacidade de detoxificação de radicais livres em concentrações fisiológicas e farmacológicas, sendo utilizada para prevenir as EROs (REITER; TAN; TERRON, 2007). A eficiência da função antioxidante da melatonina pode ser devido a sua capacidade quelante de radicais

livres, ao estímulo sobre enzimas antioxidantes, à função da glutatona, que reduz a perda de elétrons de cadeia de transporte mitocondrial, e, finalmente, à ação sinérgica a outros antioxidantes (REITER; TAN; TERRON, 2007).

Vários estudos indicam que os espermatozoides produzem maiores quantidade de espécies reativas de oxigênio, em resposta a ciclos repetidos de centrifugação ou inclusive à criopreservação efetuada em técnicas de reprodução assistida (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003). Diante disso, existe um grande interesse no desenvolvimento de protocolos com antioxidantes, para que possam proteger os espermatozoides da oxidação e da apoptose durante a execução dos protocolos de reprodução assistida.

Deste modo, a confirmação da melatonina como antioxidante de vários tecidos, além da descoberta deste no plasma seminal (CASAO et al., 2010) e dos seus receptores na membrana espermática (FUJINOKI, 2008), ainda que em espécies diferentes, surgiu como fundamento para esse estudo. Sendo assim, colocou-se a hipótese de avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído de carneiros contra os danos causados pelos radicais livres, uma vez que há poucos estudos que relatam o uso de melatonina no sêmen ovino.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Revisão de literatura

2.1.1. Diluentes

O uso de diluentes seminais proporciona um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro*, além de permitir a otimização do uso do ejaculado (DERIVAUX, 1980). A composição do diluente é um dos fatores que afetam a proporção de espermatozoides vivos após a descongelação, sendo seu incremento um dos desafios da biotecnologia da reprodução de ovinos (WATSON, 1995).

Segundo Hafez e Hafez (2004), diluentes para congelação seminal devem possuir substância orgânica que atue como crioprotetor externo protegendo as células contra o choque térmico, durante o resfriamento (gema de ovo ou leite desnatado); uma fonte de energia (glicose ou frutose); componente tampão (citrato de sódio, tris-(hidroximetil) aminometano); um crioprotetor interno para proteção dos espermatozoides durante a congelação (glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol) e antibióticos para prevenir o crescimento bacteriano (penicilina e estreptomicina ou gentamicina).

A maioria dos diluentes apresenta a gema de ovo como componente básico, já que a fosfatidilcolina e lipoproteínas da gema, bem como a caseína nos diluentes à base de leite, protegem os espermatozoides contra o choque térmico (DAS; RAJKONWAR, 1995).

Na espécie ovina, o glicerol é o principal crioprotetor utilizado. A sobrevivência espermática, entretanto, é afetada pelo glicerol durante a criopreservação, devido a sua toxicidade (ANEL et al., 2007). Outras substâncias (dimetilsulfóxido, etilenoglicol, açúcares, polímeros, proteínas anti-congelantes) têm sido testadas, mas apresentam resultados inferiores em comparação aos obtidos com o glicerol (SALAMON; MAXWELL, 2000).

2.1.2. Criopreservação

A partir do desenvolvimento das técnicas de preservação e estocagem do sêmen ovino, foi possível utilizar melhor os animais de alto potencial genético, preservar o material genético de animais permanentemente ou temporariamente inábeis à reprodução e transportar o sêmen a longas distâncias (MELO et al., 2007).

No entanto, a congelação do sêmen na espécie ovina encontra-se limitada devido à escassa difusão e aplicação deste processo ao campo, em virtude da baixa fertilidade observada na adoção do sêmen assim conservado na inseminação cervical, especialmente no estro induzido (CURRY, 2000). Seu uso tem sido restrito à deposição do sêmen intrauterino por laparoscopia, técnica onerosa e que exige pessoal qualificado. Entretanto, os métodos de congelação podem ser melhorados, visando contornar problemas relacionados à manipulação do sêmen, congelabilidade das células espermáticas e aumento da população de espermatozoides recuperados após a criopreservação (ANEL et al., 2007).

A baixa taxa de fertilidade de espermatozoides ovinos congelados/descongelados deve-se às alterações ultraestruturais, bioquímicas e funcionais ocorridas nos espermatozoides, que resulta em perda de viabilidade dos mesmos no aparelho reprodutivo da fêmea (SALAMON; MAXWELL, 2000). Mudanças ultraestruturais afetam, principalmente, a membrana plasmática, pois durante o processo de congelação-descongelação, existe uma redistribuição de lipídios que altera as interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína das mesmas (PARK; GRAHAM, 1992).

As injúrias causadas pela criopreservação são prejudiciais ao transporte e sobrevivência dos espermatozoides no aparelho reprodutivo feminino (SALAMON; MAXWELL, 1995). Segundo Bailey, Bilodeau e Cormier (2000), a capacitação espermática induzida pela congelação poderia produzir uma população de espermatozoides após a descongelação com viabilidade diminuída.

Durante o processo de congelação/descongelação, os espermatozoides são submetidos à condições desfavoráveis como mudanças da fase de transição dos fosfolipídios da membrana e a formação de gelo intracelular (PARK; GRAHAM, 1992). A consequência imediata destes processos é a ruptura da membrana plasmática (WATSON, 1995) devido aos estresses térmico, mecânico, químico e osmótico, exercidos sobre a célula durante a congelação (PARK; GRAHAM, 1992).

O acrossomo também pode sofrer mudanças estruturais e degenerativas, como ruptura de sua membrana (PARK; GRAHAM, 1992).

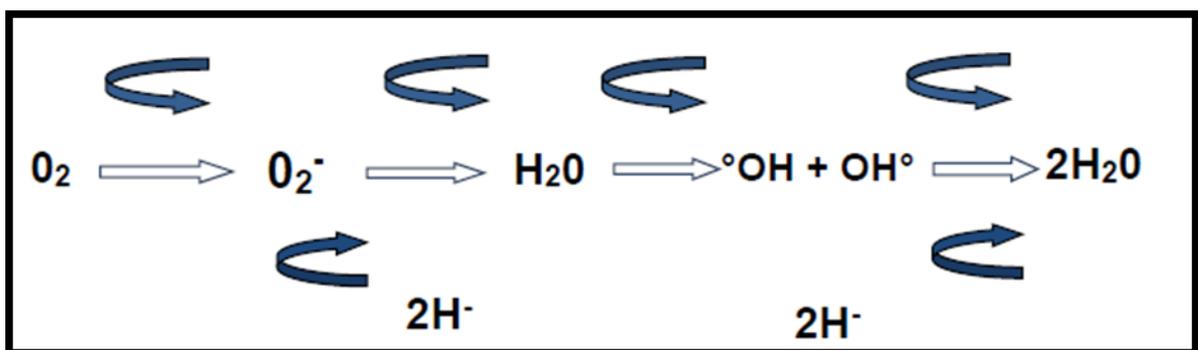
Segundo Hopkins e Evans (1991), a sensibilidade dos espermatozoides à mudança de temperatura deve-se a ação protetora do plasma seminal e à integridade da membrana plasmática. Esta última relaciona-se tanto com sua composição lipídico-proteica de colesterol bem como de fosfolipídios (DARIN-BENNETT; WHITE, 1977).

2.1.3. Espécies reativas ao oxigênio (EROs) e a função espermática

2.1.3.1. Produção de EROs no sêmen

As EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos, em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, onde o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O ; Figura 1). Durante esse processo, as EROs mais comumente geradas pelos espermatozoides são: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1999).

Figura 1: Redução de oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água. (Fonte: Adaptada de Nordberg e Arner, 2001).



No entanto, o mecanismo bioquímico responsável pela produção de EROs pelo espermatozoide ainda não está elucidado. Existem evidências da presença de uma oxidase na membrana plasmática do espermatozoide que, quando ativada, gera $O_2^{\cdot-}$ (DE LAMIRANDE et al., 1997). Aitken (1995) sugere que a nicotinamina adenina

dinucleotídeo fosfato [NAD(P)H], seja a principal fonte de elétrons, responsável pela produção de O_2^- no espermatozoide humano, com o possível envolvimento do sistema NAD(P)H oxidase, como acontece em outros tipos de células. Sabeur e Ball (2006) confirmaram que o espermatozoide equino usa NAD(P)H como substrato para geração de superóxido.

Uma segunda hipótese para a produção de EROs, é a diaforase espermática (uma oxidoreductase NAD(P)H dependente), localizada na peça intermediária do espermatozoide e integrada à cadeia respiratória mitocondrial (GAVELLA; LIPOVAC, 1992). Plante, De Lamirande e Gagnon (1994), sugeriram a predominância da diaforase espermática como sistema gerador de ERO pelo espermatozoide. Esses autores observaram que apenas um terço das EROs produzidas pelo espermatozoide são liberadas, para fora da célula, e argumentaram que, se as EROs são geradas dentro da célula, elas têm menos chance de atingir o espaço extracelular do que se forem geradas por uma NAD(P)H oxidase na membrana plasmática, que libera seus produtos no meio extracelular, como ocorre com os leucócitos (PLANTE; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1994).

As principais fontes de EROs no ejaculado são os espermatozoides, morfológica ou funcionalmente anormais, bem como os leucócitos, que podem estar presentes no ejaculado (GAVELLA; LIPOVAC, 1992). Os espermatozoides imóveis e morfológicamente anormais geram maiores quantidades de EROs que os normais (GAVELLA; LIPOVAC, 1992).

2.1.3.2. Danos causados ao espermatozoides pelas EROs

Embora a geração controlada de EROs tenha funções fisiológicas em diferentes tipos de células, altas concentrações destas são prejudiciais às funções celulares, podendo danificar todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. Distúrbios no balanço oxidante-antioxidante, em favor do oxidante, levam ao estresse oxidativo, que, em princípio, pode ser causado pela redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celular ou por produção elevada de EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A geração de altas concentrações de EROs no sêmen está associada ao declínio no metabolismo de energia do espermatozoide, na motilidade e na

viabilidade espermática e à fragmentação do DNA em carneiros e bodes (BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002).

O impacto do estresse oxidativo durante o processo de estocagem seria minimizado através da suplementação dos meios diluentes com agentes antioxidantes, garantindo maior qualidade ao sêmen (MICHAEL et al., 2009).

2.1.3.3. Sistemas de defesa antioxidantes no sêmen e no espermatozoide

Nos sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre a quantidade de EROs gerada e a quantidade removida pelo sistema antioxidante celular. Normalmente, o dano celular ocorre quando este equilíbrio é perturbado, levando a célula ao estresse oxidativo. Em princípio, esse tipo de estresse ocorre quando o sistema antioxidante de defesa celular não consegue eliminar o excesso de EROs produzidas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Para proteger-se do efeito letal da formação excessiva de EROs, a célula possui um sistema de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático, que pode atuar tanto removendo o agente antes que ele cause lesão, quanto reparando a lesão ocorrida (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O espermatozoide conta com um sistema enzimático de defesa antioxidante, que inclui superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), além de antioxidantes não enzimáticos tais como: o ácido ascórbico e o α -tocoferol (AITKEN, 1995). No meio extracelular, ele é protegido pelo plasma seminal que contém redutores de EROs, enzimáticos e não enzimáticos, como: ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, SOD, glutathione, taurina, hipotaurina e vitamina E (ZINI; GARRELS; PHANG, 2000). Como a capacidade biosintética do espermatozoide é limitada, o plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozoide contra os danos causados pelas EROs geradas pelo próprio espermatozoide e pelos fagócitos presentes no ejaculado (AITKEN, 1995).

A enzima SOD presente no citoplasma (Cu, Zn – SOD) e na mitocôndria (Mn-SOD) é responsável pela dismutação de duas moléculas do ânion superóxido, em uma de peróxido de hidrogênio, enquanto enzimas como a catalase e a glutathione peroxidase catalisam a redução do H_2O_2 à água e O_2 (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Enzimas removedoras de EROs, como a superóxido dismutase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase ou catalase, já foram detectadas no espermatozoide e/ou no plasma seminal de várias espécies, incluindo ovinos (MARTÍ et al., 2008).

No sêmen fresco de carneiro, a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona redutase e glutathiona peroxidase no espermatozoide é baixa, enquanto a atividade de superóxido dismutase é centenas de vezes mais altas (MARTÍ et al., 2008).

Após um ciclo de congelamento e descongelamento, Bilodeau et al. (2000) observaram que a criopreservação reduz os níveis dos antioxidantes presentes tanto na célula quanto no plasma seminal, fortalecendo a evidência de que, entre as causas da deterioração da qualidade do sêmen após um ciclo de congelamento e descongelamento, estão aquelas ligadas ao estresse oxidativo.

Existe ainda uma relação inversa entre a atividade de enzimas antioxidantes e a qualidade espermática. No espermatozoide de cordeiros, a atividade da glutathiona peroxidase apresentou uma correlação negativa com a porcentagem de espermatozoides com boa motilidade progressiva e morfolologicamente normais e correlação positiva com os níveis de lipoperoxidação na célula espermática (KASIMANICKAM et al., 2006). Portanto, no sêmen de baixa qualidade, com motilidade progressiva baixa, alto percentual de espermatozoides anormais e alto nível de lipoperoxidação, o nível de glutathiona peroxidase foi mais alto do que no sêmen de boa qualidade (KASIMANICKAM et al., 2006). Segundo os autores, embora os espermatozoides estivessem passando por um alto nível de estresse oxidativo, a glutathiona peroxidase não foi capaz de protegê-los contra os efeitos tóxicos das EROs. Os níveis de glutathiona peroxidase permaneceram elevados, com deterioração da qualidade espermática. Essa situação, possivelmente, está mais relacionada à produção excessiva de EROs pelos espermatozoides anormais e não funcionais que, segundo Aitken (1995), geram maiores quantidades de EROs que os normais, do que uma deficiência no sistema de defesa antioxidante.

2.1.4. Antioxidantes

Durante o processamento do sêmen destinado à conservação, o desequilíbrio entre a geração de EROs e a atividade antioxidante pode ser desencadeado tanto pelo comprometimento da capacidade protetora dos antioxidantes presentes no ejaculado, a partir da marcante redução de suas concentrações após diluição do

sêmen, quanto pelo estímulo à produção de EROs, durante a criopreservação (WATSON, 2000). Tal desequilíbrio, em favor dos oxidantes, resulta em efeitos tóxicos e comprometimento da funcionalidade celular, o que conduz, frequentemente, à apoptose, morte celular e redução da fertilidade dos espermatozoides (PURDY, 2006).

A fim de melhorar a qualidade do sêmen criopreservado por meio da prevenção ou redução do processo peroxidativo, diversos pesquisadores têm se dedicado a realizar estudos relacionados à adição de antioxidantes nos diluentes seminais de diversas espécies, como é o caso da ovina (KHERADMAND; BABAEI; ABSHNAS, 2006). Neste contexto, podem ser destacados entre os antioxidantes já estudados com este fim a SOD, a GSH-Px, a GSH-Red (MARTI et al., 2008), a hipotaurina (LOPES et al., 1998), a vitamina E (SILVA et al., 2008), a vitamina C (KHERADMAND; BABAEI; ABSHNAS, 2006) e o resveratrol (SARLÓS et al., 2002).

Nessa linha de pesquisa, foi observado que os antioxidantes exógenos reduzem a concentração de malonaldeído nas amostras seminais em decorrência da redução da peroxidação lipídica e, em virtude disto, são produzidos menos danos espermáticos e obtida uma melhor conservação do sêmen (SARLÓS et al., 2002). Entretanto, apesar dos antioxidantes ou agentes quelantes reduzirem as taxas de peroxidação dos fosfolípídeos endógenos dos espermatozoides, a terapia com antioxidantes pode apresentar efeitos indesejáveis se a dose de segurança for ultrapassada, devendo ser utilizado com moderação, até mesmo pelo fato de inibirem a formação das EROs e suas funções fisiológicas (CARVALHO et al., 2002).

2.1.5. Uso de antioxidantes no diluente

A adição de antioxidantes ao diluente tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozoide do efeito tóxico das EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

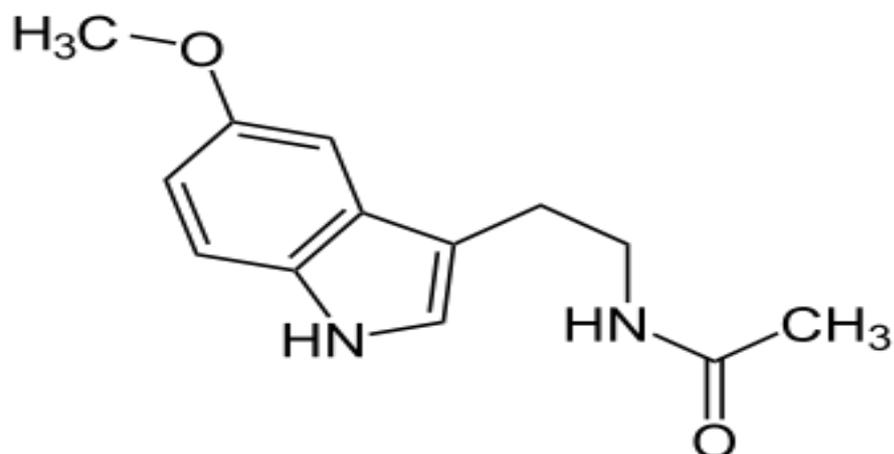
Os antioxidantes presentes no plasma seminal ajudam a proteger o espermatozoide dos danos oxidativos, mas a lavagem, adotada no processamento do sêmen de algumas espécies, remove parte desta capacidade protetora. Além disso, pode haver contaminação dos meios de lavagem e diluentes com íons de metais de transição, como o Fe^{++} ou Cu^{+} , que podem desencadear as reações

químicas que geram EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Mesmo quando não há lavagem, a concentração dos antioxidantes presentes no sêmen é reduzida com a diluição deste, diminuindo, consideravelmente, o efeito benéfico do antioxidante natural. Assim, a adição de antioxidantes, ainda que em pequenas concentrações, pode melhorar a função espermática no sêmen manipulado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

2.1.6. Melatonina

A N-acetil-5-metoxitriptamina (Figura 2), a melatonina, é o principal hormônio produzido e secretado pela glândula pineal (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). A melatonina participa de diversas funções fisiológicas, incluindo aquelas ligadas ao sistema imune, o controle dos ritmos circadianos e o controle da reprodução em espécies sazonais (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

Figura 2: Estrutura molecular da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina). (Fonte: Adaptado de Caniato et al., 2003).



A Melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano captado da circulação e transformado em serotonina, a qual é convertida em melatonina por um processo de dois passos, envolvendo atividades sequenciais de duas enzimas: a N acetil transferase (NAT), que é a enzima limitante da síntese de melatonina, além da hidroxil-indol-O-metiltransferase (HIOMT) (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Trata-se de uma molécula altamente conservada, estando presente, em praticamente, todas as espécies, desde procariontes até humanos. Sua função

original, nos organismos mais primitivos é proteger contra o estresse oxidativo (TAN et al., 2007). Classifica-se como uma indoleamina e contém dois grupos funcionais, os resíduos Ometil e N-acetil, o que promove à molécula sua propriedade anfifílica (hidro e lipossolúvel) e a torna capaz de penetrar qualquer compartimento celular do fluido corporal (CARPENTIERI et al., 2012).

Quando a melatonina passa pelas membranas celulares, ela se localiza, principalmente, em posição superficial nas bicamadas lipídicas, próxima à cabeça polar dos fosfolípidos da membrana. Nessa posição, ela é capaz de funcionar como um “removedor” (*scavenger*) de radicais livres e também promover meios indiretos pelos quais as membranas podem resistir ao dano oxidativo, estabilizando a fluidez da membrana e preservando sua eficiência (REITER, 2000a).

Por se localizar em várias regiões dentro da célula, a melatonina se torna um potente antioxidante endógeno (MARTÍN et al., 2000). Diferente de outros antioxidantes muito lipofílicos, como a vitamina E, que é primariamente retida na membrana plasmática, a melatonina atravessa membranas celulares, alcançando facilmente compartimentos intracelulares, particularmente, a mitocôndria, o local mais relevante na geração de radicais livres (MARTÍN-HIDALGO et al., 2011).

As mitocôndrias são as estruturas subcelulares dos espermatozoides mais sensíveis ao resfriamento e a congelação (PEÑA et al., 2009). De acordo com essa evidência, parece lógico que se foque o interesse em antioxidantes com capacidade de facilmente alcançar a mitocôndria, como a melatonina (SILVA et al., 2011).

A indoleamina possui propriedades redutoras devido à presença de um anel aromático rico em elétrons, funcionando como um doador de elétrons (JOU et al., 2007). O seu potencial redutor exerce uma regulação nas atividades dos complexos I e IV da mitocôndria, o que sugere que ela pode interagir com componentes da cadeia de transporte de elétrons, aumentando o fluxo de elétrons e, conseqüentemente, a produção de adenosina tri-fosfato (ATP) (CARPENTIERI et al., 2012). Além disso, interage com as bicamadas lipídicas e estabilizam as membranas mitocondriais internas, um efeito que pode melhorar a atividade da cadeia de transporte de elétrons e, assim, aumentar a motilidade espermática (MARTÍN-HIDALGO et al., 2011).

Segundo um grande conjunto de evidências, a melatonina é o maior removedor de moléculas reativas tanto à base de oxigênio quanto nitrogênio (CARPENTIERI et al., 2012). A indoleamina elimina os produtos da decomposição de peroxinitritos,

possui alta eficiência como removedor dos radicais hidroxila, peroxila, assim como do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e óxido nítrico (ALLEGRA et al., 2003).

A melatonina pode, ainda, estimular a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase (KARBOWNIK; REITER, 2000). Portanto, além de reduzir o número de radicais livres e EROs, também aumenta a produção de outras moléculas que protegem as células espermáticas do estresse oxidativo (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

A indoleamina influencia a atividade das enzimas antioxidantes, pois altera sua expressão gênica, a partir do aumento nos níveis celulares de RNA mensageiro (REITER, 2000a). Isso ocorre tanto em condições fisiológicas quanto oxidativas e pode envolver tanto receptores de membrana quanto nucleares (CARPENTIERI et al., 2012).

Visto que todos os antioxidantes clássicos são também pró-oxidantes, outra vantagem da melatonina sobre eles é a ausência de ações pró oxidativas. Portanto, por serem potentes doadores de elétrons, quando eles o fazem visando neutralizar um radical livre, passam de um estado reduzido para um oxidado e essa forma oxidada pode oxidar outras moléculas (KORKMAZ; REITER; TOPAL, 2009). Além disso, a forma oxidada, geralmente, vai ser regenerada para o estado reduzido através do mecanismo conhecido como “reação redox” ou reciclagem, que ocorre à custa de outra molécula. No caso da reciclagem de vitamina C ou vitamina E, por exemplo, isso ocorre à custa de uma glutathione, o que pode ser uma desvantagem, pois, em muitos casos, a glutathione é um antioxidante mais potente do que as vitaminas. A melatonina, por sua vez, sacrifica a si mesmo e não participa do ciclo redox após a remoção de radicais livres, e, por isso, ela é classificada por alguns autores como suicida ou antioxidante terminal (KORKMAZ; REITER; TOPAL, 2009).

Desta forma, é de particular interesse conhecer o possível papel da melatonina como um agente bioenergético que pode melhorar e manter a função mitocondrial (KORKMAZ; REITER; TOPAL, 2009).

2.1.7. Testes laboratoriais para a avaliação espermática

A meta primária das análises de sêmen é a determinação *in vitro* da capacidade fecundante dos espermatozoides e, conseqüentemente, da fertilidade de

um reprodutor (ZINI; LIBMAN, 2006), sendo a realização das mesmas de fundamental importância para as amostras de sêmen submetidas à criopreservação (FOOTE, 2002). Em contrapartida, as análises de rotina (volume seminal, motilidade espermática, densidade, viabilidade e morfologia) não fornecem um diagnóstico completo, de modo que indivíduos podem permanecer inférteis mesmo apresentando tais parâmetros seminais normais após avaliação (SIKKA, 1996).

Os pesquisadores têm se empenhado em desenvolver exames laboratoriais para a predição acurada da fertilidade dos espermatozoides, embora esta não seja uma tarefa de fácil execução, uma vez que para a fecundação do oócito, os gametas masculinos devem ter uma série de atributos (ARRUDA et al., 2007). Como consequência disto, nenhum teste laboratorial em isolado pode estimar o potencial de fertilidade dos espermatozoides (ARRUDA et al., 2007), de modo que a melhor predição da qualidade de uma amostra seminal e do potencial fecundante masculino é oriunda da realização conjunta de diferentes técnicas de avaliação (PERIS et al., 2004).

Buscando atender aos princípios básicos das análises laboratoriais (objetividade, repetitividade, velocidade na execução) (GRAHAM, 2001), várias metodologias têm sido utilizadas, dentre as quais se destacam as análises fluorescentes e as análises computadorizadas (ARRUDA et al., 2007). A utilização dos corantes fluorescentes para a avaliação dos espermatozoides se destaca por refletir o real estado das estruturas celulares, apresentando alta repetibilidade (CELEGHINI et al., 2007) e possibilidade de utilização em isolado ou em combinação para a determinação da integridade e da viabilidade celular (ARRUDA et al., 2007). Por sua vez, os sistemas de análises computadorizadas de imagens apresentam alta repetibilidade das avaliações, sendo mais precisos, acurados e objetivos (ARRUDA et al., 2007).

2.1.7.1 Integridade de membrana plasmática

Um aspecto fundamental no processo de avaliação seminal, que é em grande parte negligenciado pelos métodos descritivos, é a determinação da integridade estrutural e funcional das membranas lipoprotéicas dos espermatozoides (WATSON, 1995).

A membrana espermática tem um importante papel nos processos de capacitação e fecundação do oócito e sua constituição bioquímica é um dos principais pontos de interesse do estudo da fisiologia e morfologia espermática (LENZI et al., 1996). Ela é basicamente composta por ácidos graxos e proteínas (FLESH; GADELLA, 2000). Teorias sobre a fusão de membranas (oócito/espermatozoide) sugerem que a fluidez da membrana é pré-requisito para a função normal da célula, sendo ela e a flexibilidade das membranas celulares dependentes da sua composição lipídica (LENZI et al., 2002).

Existem vários testes que podem ser empregados para a determinação da integridade da membrana plasmática, como as colorações supravitais, incluindo Tripán-Blue-Giensa, testes hiposmóticos e, mais recentemente, o uso das sondas fluorescentes que atuam através de reações com enzimas citoplasmáticas ou de ligação com o DNA espermático (ARRUDA et al., 2005), mas é uma técnica pouco aplicável a campo pois há necessidade de equipamentos de custo muito alto como um microscópio de epifluorescência ou um citômetro de fluxo. Já o teste de eosina-nigrosina (HANCOCK, 1951) é um teste simples e prático, podendo ser rotineiramente utilizado a campo para avaliar a integridade da membrana espermática (KUMI-DIAKA; BADTRAM, 1994).

Teoricamente, a integridade da membrana em uma célula viva impede a impregnação de colorações, o que não acontece em células mortas cujas membranas estão alteradas (WHO, 1992). A proporção entre células coradas e não coradas de uma determinada amostra (porcentagem de células mortas e vivas, respectivamente), através do método de coloração Eosina/Nigrosina (E/N), foi descrita para o sêmen de diversas espécies, como suínos e caprinos (POTO, 2000; LILY-PALOMINO et al., 2001).

2.1.7.2. Integridade acrossomal

O acrossoma é um dos principais componentes da célula espermática, visto ser ele o responsável pela fusão do espermatozoide com o oócito (BELFORD, 1983). Porém, para que o espermatozoide adquira a habilidade de fecundar o oócito e iniciar o desenvolvimento embrionário, é necessário que ele passe por uma série de eventos, como o transporte para o oviduto, a capacitação, a ligação com a zona pelúcida, a reação acrossomal e a ativação do oócito (HERRICK; SWANSON, 2003).

Segundo Yanagimachi (1994), a capacitação espermática é um pré-requisito para a reação acrossomal na maioria dos mamíferos, que consiste na fusão entre a membrana externa do acrossomo e a porção da membrana plasmática que o envolve, levando a liberação das enzimas acrossomais.

Fisiologicamente, esta reação ocorre quando o espermatozoide entra em contato com a zona pelúcida, permitindo a penetração na mesma e a fusão com a membrana plasmática do oócito (YANAGIMACHI, 1994). Se a capacitação não ocorrer no seu devido tempo, a fecundação estará comprometida, o que geralmente acontece quando o espermatozoide apresenta alterações acrossomais (LONG et al., 1996).

As membranas de algumas organelas, assim como as do acrossomo, são especialmente sensíveis aos danos causados pelo resfriamento (WATSON, 1995). Desta maneira, é muito importante avaliar a integridade dessas membranas ao se estudar novas metodologias de resfriamento do sêmen (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

A avaliação da integridade da membrana acrossomal pode ser feita observando suas alterações morfológicas (microscopia eletrônica) ou através de testes funcionais, lançando-se mão do uso de corantes ou de sondas fluorescentes (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991).

Diante disso, Pope, Zhang e Dresser (1991) desenvolveram um método simples e rápido para a coloração desta organela, comprovando sua eficácia para a avaliação da integridade acrossomal do espermatozoide. O acrossoma pode ser facilmente identificado em microscopia de luz pelo método da coloração simples, que é composta de 1% do corante *Fast Green* e do Rosa Bengala. Desde então, esta coloração vem sendo cada vez mais utilizada para avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides de diversas espécies (LUVONI, 2006).

2.1.7.3. Atividade mitocondrial

Assim como a integridade estrutural das membranas, a motilidade da célula espermática também exerce um papel fundamental na fecundação (KATO et al., 2001). A motilidade do espermatozoide é gerada basicamente pelo movimento flagelar de sua cauda, sendo este um dos parâmetros mais utilizados para a avaliação da qualidade de determinada amostra de sêmen, e, este movimento exige

um gasto energético alto, sendo a desfosforilação do ATP a principal fonte de energia consumida neste processo (SALISBURY; LODGE; VAN DEMARK, 1978). A célula espermática produz altas quantidades de ATP através das mitocôndrias da peça intermediária (WOOLLEY, 1971).

Durante a espermiogênese, ocorre uma série de mudanças na peça intermediária, como a disposição helicoidal das mitocôndrias ao redor do flagelo, a divisão das mitocôndrias em mitocôndrias esféricas e a disposição ponta a ponta destas em duas hélices contíguas, que as permitem produzir toda a energia requerida durante o processo de fecundação (WOOLLEY, 1971).

Kramer et al. (1993) demonstraram a relação existente entre o status mitocondrial e a integridade da membrana com a fertilidade. Estes autores afirmam que, junto com a motilidade, o status mitocondrial e a integridade da membrana são fatores importantes para determinar a fertilidade.

Estudos para mensurar a atividade respiratória evidenciaram que a atividade mitocondrial está envolvida no processo de oxidação e produção de energia ao espermatozoide (KATO et al., 2001). A avaliação da atividade mitocondrial pode ser realizada utilizando-se testes tais como a Rodamina 123, o JC-1, entre outros (CELEGHINI et al., 2007). No entanto, na maioria das vezes, estes testes, por utilizarem fluorescência, se tornam muito dispendiosos e pouco práticos para sua utilização rotineira, visto que o material precisa ser analisado num curto espaço de tempo (CELEGHINI et al., 2007). Diante disto, Hrudka (1987) desenvolveu um ensaio citoquímico para demonstração qualitativa e quantitativa da atividade da enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) – enzima da cadeia respiratória responsável pela produção de energia do espermatozoide – através da 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A enzima CCO tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células, além de ser pré-requisito para manutenção das funções osmótica e sintética, motilidade e integridade da estrutura celular. A técnica citoquímica desenvolvida por este autor baseia-se na oxidação da DAB pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO. Através de uma reação em cadeia, o DAB é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, nas mitocôndrias. Esta deposição pode ser identificada através de microscopia óptica pela coloração marrom da mitocôndria. Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos a que os espermatozoides são submetidos.

2.1.7.4. Mensuração do estresse oxidativo

Segundo Nichi (2003), muitas pesquisas têm sido feitas a fim de desenvolver índices de estresse oxidativo que possam identificar e quantificar, com acurácia, os efeitos desse processo sobre a capacidade de fertilização. Uma vez que, o estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a produção de EROs e a proteção oxidativa no sêmen, torna-se concebível que a avaliação do estresse oxidativo seja feita através da mensuração dos níveis de EROs e/ou seus metabólitos, assim como, dos níveis de antioxidante no sêmen.

Para a dosagem de EROs no sêmen são necessárias técnicas muito sensíveis, visto que a produção destes pelo sêmen é relativamente baixa quando comparada com a produzida por leucócitos, por exemplo, e, além disso, a meia-vida das EROs é muito curta (KESSOPOULO et al., 1994). Para mensurá-las são usadas técnicas de quimioluminescência, que, mesmo sendo bastante sensíveis, não conseguem dosar níveis de EROs que ocorrem em amostras seminais de homens normais (SHEKARRIZ; THOMAS JR; AGARWAL, 1995).

A dosagem de componentes oxidados que se mantêm nos fluidos corporais é uma técnica mais específica, visto que avalia indiretamente o estresse oxidativo efetivamente ocorrido, e, um destes componentes, o malondialdéido (MDA), pode ser usado como um índice de peroxidação lipídica (SIDHU et al., 1998). A ocorrência da peroxidação lipídica em espermatozoides leva a um acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática espermática que posteriormente se decompõem para formar o MDA (JANERO, 1990). A avaliação dos níveis de MDA tem sido extensivamente utilizada como marcador da peroxidação lipídica (NICHII, 2003).

Entre os diferentes métodos analíticos estabelecidos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado, sendo que nesta reação, o composto formado pela reação entre duas moléculas TBA com uma molécula de MDA, reação esta que ocorre em altas temperaturas e o baixo pH, e que resulta na formação de um cromógeno rosa que pode ser quantificado com espectrofotômetro (NICHII, 2003).

Uma ferramenta importante e muito utilizada para a avaliação dos níveis de proteção antioxidante e de peroxidação lipídica é a geração artificial de EROs, o que permite avaliar dois aspectos: a peroxidação lipídica espermática e a disponibilidade de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática do espermatozoide, pelos quais

iria se iniciar a reação peroxidativa em cadeia; e a habilidade do espermatozoide em inibir a propagação deste processo através de mecanismos antioxidantes (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993a).

Uma técnica frequentemente utilizada para provocar a peroxidação lipídica, é a indução pelo sistema sulfato de ferro (FeSO_4) + ácido ascórbico (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993b; GRIVEAU et al., 1995). Esta técnica se baseia na formação de metais de transição (ferro e cobre) que irão catalisar a quebra de hidroperóxidos pré-existentes, iniciando a propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica promovida pelo ferro através da reação de Fenton. O ácido ascórbico, por sua vez, provocaria a redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} (Figura 3), alimentando novamente a reação (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993b; ENGEL; SCHREINER; PETZOLDT, 1999).

Figura 3: Reação de Fenton. (Adaptado de Nordberg e Arnér, 2001).



2.1.7.5. Avaliação da capacidade de ligação *in vitro*

A capacidade de a célula espermática ligar-se a zona pelúcida *in vitro*, avalia a eficácia (concentração e capacidade) de receptores de espermatozoides ligarem-se ao oócito (MORAES et al., 2010). Observando os eventos primordiais para que ocorra a fecundação (GRAHAM, 1996) pode-se mencionar que a capacidade de ligação dos espermatozoides a zona pelúcida seja um importante atributo a ser considerado, em um período que compreenda desde a capacitação espermática até a fecundação do oócito. Este tipo avaliação já tem sido reportado em espermatozoides de seres humanos, touros, varrões, garanhões e outras espécies, porém a necessidade da obtenção um grande número de ovários para este tipo de avaliação inviabiliza a realização corriqueira da técnica.

Sendo assim, alternativas de avaliação de fecundação *in vitro* vem sendo desenvolvida, como por exemplo, a atualização da membrana perivitelina da gema de ovo da galinha, uma vez que a semelhanças moleculares entre essa e a zona pelúcida de algumas espécies dão condições para realização de testes de fertilidade

in vitro (MORAES et al., 2010). Além disso, a membrana perivitelina da gema de ovo é uma matéria-prima abundante e de fácil manipulação, o que facilita a realização de vários ensaios *in vitro* (GRAHAM; MOCE, 2005), tornando-se uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novos ou melhores testes de avaliação de fertilidade, que unam a praticidade com a confiabilidade de resultados.

2.2. Justificativa

A utilização de sêmen criopreservado durante a inseminação artificial merece destaque, uma vez que, favorece a multiplicação de animais geneticamente superiores, auxilia na preservação de raças nativas e em risco de extinção, além de ser uma técnica viável, quando comparada a outras biotécnicas.

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para melhorar as técnicas de IA, utilizando o sêmen congelado. No entanto, alguns entraves decorrentes do uso desta biotécnica ainda precisam ser solucionados. A diluição, o resfriamento, a congelação e a descongelação são fontes potenciais de estresse oxidativo, durante o processo de criopreservação do sêmen, provocando danos irreversíveis na célula espermática, reduzindo a qualidade nos parâmetros espermáticos.

Os espermatozoides são altamente susceptíveis à peroxidação lipídica devido ao estresse oxidativo que ocorrer durante o processo de congelação/dcongelação. Sendo assim, fazem-se necessários, estudos visando reduzir o estresse oxidativo, bem como os danos ocasionados aos espermatozoides durante o processo de congelação-dcongelação.

As células espermáticas e o plasma seminal possuem enzimas e antioxidantes responsáveis pela remoção quelante dos radicais livres, incluindo a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase. No entanto, o desequilíbrio entre a produção de EROs e a atividade das enzimas antioxidantes, causam danos à função espermática (SIKKA, 1996). Além disso, o sistema antioxidante do plasma seminal e dos espermatozoides é comprometido durante a criopreservação (ALVAREZ; STOREY, 1992).

Os antioxidantes atuam na prevenção da oxidação das células, as quais possuem um mecanismo de defesa que atua como detoxificador do agente oxidante, ou como responsável na reparação da lesão ocorrida, inibindo ou minimizando a exacerbada produção das EROs no processo de criopreservação, sem alterar a viabilidade espermática (GUERRA et al., 2012).

Neste contexto, a adição de melatonina como antioxidante no diluente de congelação do sêmen de carneiro, pode resolver este impasse, o estresse oxidativo nos espermatozoides após o processo de criopreservação, a fim de permitir alcançar taxas de fecundidade mais elevadas, melhorando, assim, os índices reprodutivos do rebanho ovino como um todo.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído de carneiros após criopreservação.

2.3.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído de carneiros sobre:

- a) A motilidade total e progressiva;
- b) A integridade da membrana plasmática e acrossomal;
- c) A atividade mitocondrial;
- d) O estresse oxidativo; e
- e) A capacidade de ligação dos espermatozoides à membrana perivitelina da gema de ovo.

2.4. Material e métodos

2.4.1. Aspectos Éticos

O presente estudo foi realizado após a aprovação institucional da Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), sob o protocolo nº 0002/110414, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Univasf.

2.4.2. Reagentes

Todos os reagentes químicos foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), exceto para o Eosina e Nigrosina, que foram adquiridos da Minitub (Minitub[®], Berlim, Alemanha).

2.4.3. Local de execução

O experimento foi realizado durante os meses de Maio a Julho, no setor de Ovinocultura e no Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestre (CPSENS), localizados no Campus de Ciências Agrárias da Univasf, situados no município de Petrolina-PE (latitude 09°23'55" Sul e a uma longitude 40°30'03" Oeste), estando a uma altitude de 376 metros, com precipitação média anual em torno de 300 mm. A região apresenta temperatura média anual em torno dos 27 °C e clima do tipo Bsh segundo a classificação de Köppen-Geiger.

2.4.4. Animais

Foram utilizados três carneiros adultos, sendo dois da raça Dorper e um da raça Santa Inês, com idade entre 2 a 4 anos, selecionados através de exame andrológico, onde todos apresentaram características espermáticas acima dos padrões mínimos, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Os carneiros foram confinados em uma instalação contendo acesso a iluminação natural, com temperatura e umidade relativa média de 27,3°C e 47,5% respectivamente.

As baias apresentavam dimensão de 2x3 m de área coberta e com área de solário de 2x4 m. Os carneiros foram mantidos isolados das fêmeas, recebendo água *ad libitum* e alimentação fornecida duas vezes ao dia, com dieta composta de capim elefante (*Penissetum purpureum*) picado, além de suplementação concentrada a base de farelo de milho, farelo de soja e mistura mineral. A relação volumoso:concentrado foi de 60:40 na forma de dieta total misturada, de acordo com as exigências para animais desta categoria segundo o NRC (2000).

2.4.5. Coleta e processamento do sêmen

Foram coletados 10 ejaculados de cada carneiro (n=30), por meio de vagina artificial para ovinos (Vargina artificial[®], Minitub, Berlim, Alemanha). As coletas foram realizadas três vezes por semana para cada animal.

Após a coleta, o ejaculado foi transportado em uma caixa térmica para o CPSENS, mantido em banho-maria a 32° C, e avaliado quanto a alterações macroscópicas, como, presença de urina ou sangue. Foram utilizados apenas ejaculados que atendiam aos padrões considerados normais pelo CBRA (CBRA, 2013).

Após avaliação, os ejaculados aprovados foram subdivididos em cinco tubos de ensaio e diluídos em Tris-Gema de ovo e glicerol, conforme a concentração utilizado por Souza et al. (2015), para a concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL e mantidos em banho maria a 32 °C.

A melatonina foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e tampão fosfato-salino (PBS), conforme Ishizuka et al. (2000).

Para determinação dos tratamentos experimentais, a melatonina foi adicionada ao sêmen diluído, estabelecendo os tratamentos: controle (sem adição de melatonina); 100 pM; 100 nM; 100 µM e 1 mM de melatonina. A concentração final de DMSO em todos os tratamentos foi de 0,1%.

Após adição da melatonina, as amostras de cada tratamento foram colocadas em Becker de 100 mL com água a 32°C, ficando acima do volume das amostras, e então acondicionadas em câmara fria a 5°C por duas horas.

Depois, as amostras de cada tratamento foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e lacradas com seladora (UltraSeal[®], Minitub, Berlim, Alemanha) e acondicionadas sob vapores do nitrogênio líquido, por 15 minutos, a 8 cm da lâmina líquida. Decorrido este tempo, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido e estocadas em botijão criogênico para posterior análise.

2.4.6. Descongelção do sêmen

A descongelção foi realizada mergulhando-se as palhetas com as amostras no descongelador automático (IMV, São Paulo, São Paulo, Brasil) por 30 segundos a 37 °C.

2.4.7. Avaliação da motilidade espermática

Duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas conforme descrito acima para avaliação da motilidade espermática (total e progressiva), utilizando o sistema de análise computadorizada (CASA[®], Minitub, Berlin, Alemanha), equipado com o SpermVision[®]. Alíquotas de 8 µL de cada amostra por tratamento foram analisadas, individualmente, sobre lâmina pré-aquecidas, a 37 °C.

2.4.8. Avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal

A integridade da membrana plasmática foi determinada utilizando a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N), conforme Barth e Oko (1989). Para tanto, 10 µL de cada tratamento foram colocados em tubos de eppendorf, juntamente com 10 µL do corante. Logo após a homogeneização, 8 µL da mistura, para cada tratamento, foi adicionado entre lâmina e lamínula pré-aquecidas e um total de 200 espermatozoides por amostra foram contados em microscópio óptico (DM 750[®], Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça), em aumento de 100x. As células com membrana plasmática lesada apresentavam o núcleo corado em rosa da eosina, e aquelas com a membrana plasmática intacta, núcleo corado em escuro da nigrosina.

O corante simples de Pope (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991) foi utilizado para verificar a integridade do acrossoma. Para tanto, alíquota de 10 µL de cada tratamento, foi diluída com 90 µL de solução diidrato citrato de sódio a 2,9% em

microtubo tipo eppendorf de 1,5 mL. Em seguida, foi adicionado ao tubo 10 µL de corante simples de Pope, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 70 segundos. Após incubação, 10 µL de cada amostra foi colocado em lâminas e feito esfregaço. As lâminas com os esfregaços foram cobertas com lamínula, sob imersão em óleo. Foram contados 200 espermatozoides por lâmina em microscópio óptico (DM 750[®], Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça), em aumento de 100x. Estes foram classificados em: a) acrossomo íntegro: região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura na região pós-acrossomal; b) acrossomo não-íntegro: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara na região pós-acrossomal.

2.4.9. Avaliação da atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial foi determinada conforme Hrudka (1987), onde 25 µL de cada tratamento foi incubado com 25 µL de DAB (1mg/mL de PBS), a 37 °C, por uma hora, na ausência de luz. Foram contados 200 espermatozoides por lâmina em microscópio óptico (DM 750[®], Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça), em aumento de 100x, obedecendo à escala de quatro classes propostas por Hrudka (1987), onde:

Classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada, alta atividade mitocondrial (DAB I);

Classe II: células espermáticas com segmentos corados (ativos) e não-corados (inativos), havendo predominância dos ativos (DAB II);

Classe III: células espermáticas com segmentos corados (ativos) e não-corados (inativos), havendo predominância dos inativos (DAB III);

Classe IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada, sem atividade mitocondrial (DAB IV).

2.4.10. Avaliação da resistência ao estresse oxidativo

Para esta avaliação, as amostras nas palhetas foram descongeladas como descrito acima e o conteúdo esvaziado em tubos de ensaio. Em seguida, o crioprotetor foi removido através de dupla centrifugação (800G, 10 minutos) seguida de ressuspensão em solução fisiológica (NaCl 0,9%).

Após a centrifugação, 0,4 mL da suspensão foi transferido para um segundo tubo e a peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 100 µL de ácido ascórbico (20 mM) e 100 µL de sulfato de ferro (4 mM). Em seguida, a mistura permaneceu incubada por 120 minutos a 37 °C (GOMEZ; IRVINE; AITKEN, 1998).

O principal produto de peroxidação lipídica medido por este método foi o malondialdeído (MDA). As medições de MDA foram efetuadas em conformidade com um protocolo inicialmente descrito por Ohkawa, Ohish e Yagi (1979). O método baseia-se na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de MDA, a altas temperaturas e baixo pH, resultando em um cromogênio de cor rosa que pode ser quantificado com espectrofotômetro.

Após o período de 120 minutos, 0,5 mL da mistura incubada e 1 mL de solução gelada de ácido tricloroacético a 10%, foram misturadas, sendo centrifugadas (SL701[®], Solab, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 5000 rpm por 15 minutos a 15 °C, para a separação de proteínas precipitadas que pudessem interferir na leitura. Após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi misturado em tubo de ensaio juntamente com 1 mL de TBA a 1% dissolvido em hidróxido de sódio (0,05 N de NaOH), preparado instantes antes de ser utilizado. O tubo contendo esta mistura foi incubado em banho-maria a 90 °C por 15 minutos e resfriado imediatamente em banho de gelo, para interrupção da reação termo dependente.

As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram mensuradas em seguida, através da leitura em espectrofotômetro Q898DRM5[®] (Quimis, São Paulo, SP, Brasil) em comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram comparados com uma solução padrão, feita previamente, com MDA. A concentração de TBARS nas amostras foi expressa em micro molar de MDA por milhões de espermatozoides (µM de MDA/10⁶ spz). Sendo assim, as amostras que apresentaram uma quantidade elevada de MDA, indicavam uma amostra bastante susceptível ao estresse oxidativo.

2.4.11. Teste de ligação

A capacidade dos espermatozoides de ovino se ligar a membrana de oócitos foi avaliada utilizando a membrana perivitelina da gema de ovo de galinha (CEPM), como descrito por Amorim et al. (2007). Brevemente, a preparação das membranas perivitelinas (MPVs) foi realizada por meio da separação da gema de ovo da clara, e

o excesso de clara removido com auxílio de um papel toalha. Em seguida, a gema de ovo ainda intacta, foi colocada sobre uma folha de parafilme, para facilitar o rompimento da membrana e sua lavagem com TALP (GRAHAM; FOOTE; PARRISH, 1986) para retirada da gema de ovo. A membrana foi removida do parafilme e colocada em uma placa de Petri de vidro, onde foi lavada algumas vezes com TALP até a solução ficar clara e sem resíduo de gema de ovo. Em seguida, a MPV foi cuidadosamente aberta e cortada com lamina de bisturi em pequenos fragmentos (1 x 1 cm), utilizando uma cubeta de vidro de espectrofotômetro. Cada fragmento de MPV cortado foi imerso em TALP colocados em tubos plásticos de 1 mL.

Para realização do teste de ligação de membrana, os tubos de ensaio contendo as MPVs foram inseminados com 50.000 espermatozoides de cada tratamento. Após a inseminação, as MPVs foram incubadas a 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂ por 90 minutos, sendo que a cada 30 minutos os tubos foram lentamente agitados para que a membrana permanecesse aberta. Passados 70 minutos de incubação, 10 µL de Hoechst 33342 (1 mg/mL em PBS) foi adicionado em cada tubos para corar de azul os espermatozoides. Após a incubação, cada membrana foi transferida para outro tubo contendo 1 mL de TALP para lavagem e remoção dos espermatozoides que não se ligaram, sendo repetido por 5 vezes esta etapa. Depois, as MPVs de cada tratamento foram abertas em lâmina e coberta com lamínula, e observada em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2[®], Carl Zeiss, Berlim, Alemanha), utilizando filtro de fluoresceína de excitação de 365 de emissão de 420 nm.

O número de espermatozoides ligados à MPV foi determinado contando seis campos aleatórios de cada fragmento da MPV, e a eficiência de ligação à MPV foi calculada pela divisão do número total de espermatozoides ligados àquela particular MPV pelo número de espermatozoides ligados a mesma membrana pelo grupo controle.

2.4.12. Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows SAS 9.2 2002-2008 by SAS Institute Inc. (Cary, NC, USA).

A normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foi testada, e caso não obedecessem a estas premissas, os dados eram transformados (logaritmo na base 10 – $\text{Log}_{10} X$; Raiz quadrada – $\text{RQ } X$; Quadrado – X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Diferenças significativas para os dados paramétricos foram avaliadas através do teste Least Square Differences (LSD) a 5% de probabilidade. Para descrição dos resultados, foram empregados as médias e o erro padrão.

Na análise de variância foram verificados os efeitos das variáveis classificatórias raças (Dorper e Santa Inês).

A porcentagem de células DAB IV e o teste de ligação obedeceram às premissas após a transformação de seus valores para o logaritmo na base 10. A porcentagem de células DAB II e III, e de espermatozoides com integridade da membrana plasmática obedeceram às premissas após a transformação de seus valores a raiz quadrada. A porcentagem de células DAB I obedeceu às premissas após a transformação de seus valores para o quadrado, o inverso e o inverso da raiz quadrada, respectivamente.

A susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo e o número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina obedeceram às premissas não sendo necessária qualquer transformação.

2.5 Resultados

Os efeitos das diferentes concentrações de melatonina sobre a motilidade espermática após a descongelação, nos espermatozoides ovinos, são apresentados na Tabela 1. A motilidade total e progressiva dos espermatozoides foram maiores nas amostras tratadas com 100 pM de melatonina, quando comparado às demais concentrações testadas e ao controle (Tabela 1; $P < 0,05$).

Tabela 1. Motilidade total e progressiva de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído

Concentrações de Melatonina	Motilidade	
	Total	Progressiva
Controle	57,30 ± 5,83 ^B	38,10 ± 6,82 ^B
100 pM	62,99 ± 5,01 ^A	45,07 ± 5,52 ^A
100 nM	56,70 ± 5,72 ^B	38,46 ± 6,62 ^B
100 µM	58,20 ± 5,94 ^B	39,76 ± 5,61 ^B
1 mM	46,89 ± 5,87 ^C	28,95 ± 5,24 ^C

^{A,B,C}Valores de Média ± Erro Padrão na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em relação à integridade da membrana plasmática, a adição das diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído, com exceção da concentração de 1 mM, apresentaram maior percentual de células com membrana plasmática íntegra quando comparadas com o controle (Tabela 2; $P < 0,05$).

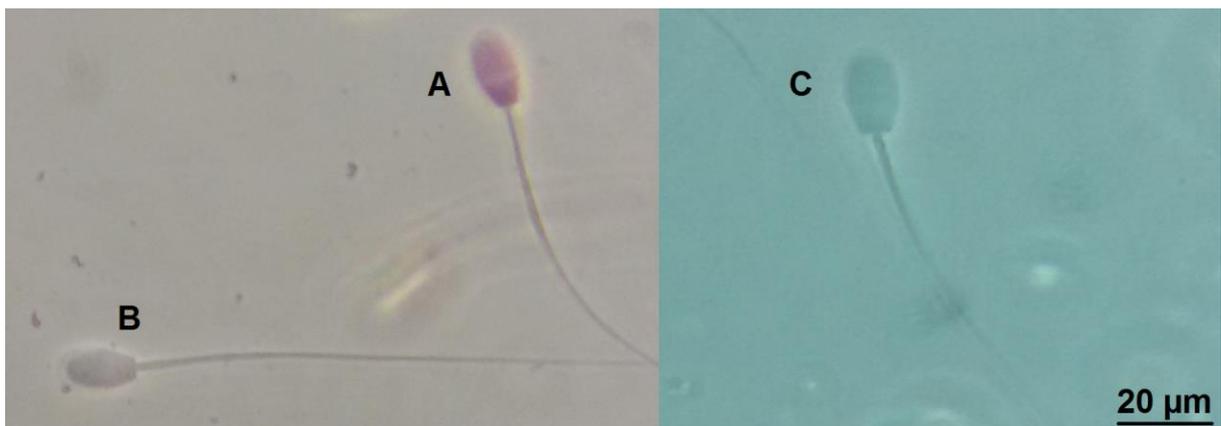
Tabela 2. Integridade da membrana plasmática (iMP) e acrossomal (iAC) de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído

Concentrações de Melatonina	iMP	iAC
Controle	40,05 ± 5,48 ^B	90,21 ± 5,53 ^B
100 pM	61,03 ± 5,33 ^A	96,51 ± 5,28 ^A
100 nM	59,06 ± 5,66 ^A	94,43 ± 5,69 ^{AB}
100 µM	55,50 ± 5,06 ^A	90,41 ± 5,63 ^B
1 mM	44,65 ± 5,54 ^B	90,56 ± 5,98 ^B

^{A,B,C} Valores de Média ± Erro Padrão na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Na figura 4, pode-se observar os diferentes tipos de coloração da célula espermática durante a análise da Integridade da membrana plasmática de espermatozoides descongelados de ovinos.

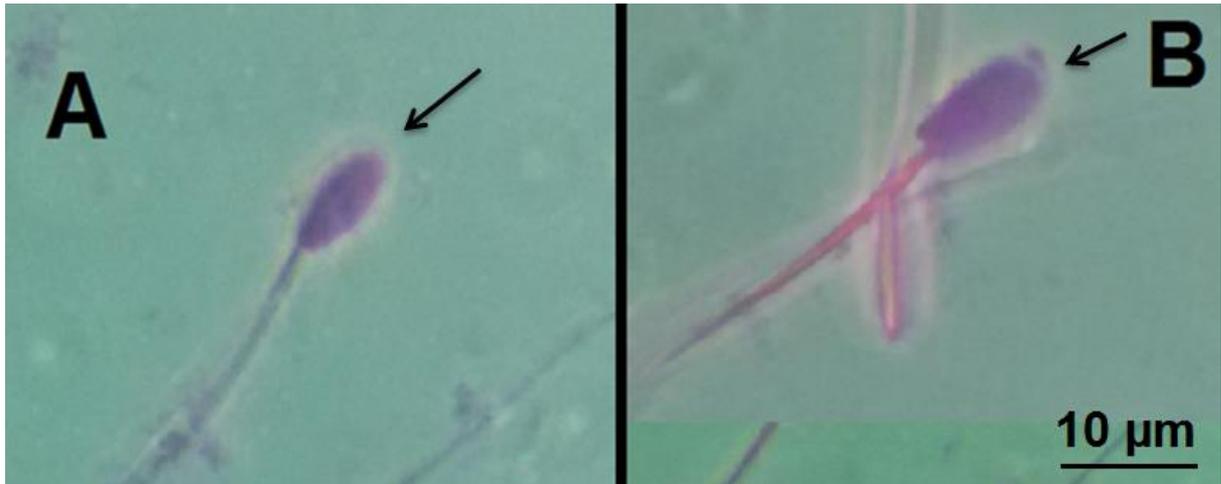
Figura 4. Integridade da membrana plasmática de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído: (A) Espermatozoides com núcleo corado em rosa da eosina, (B) Espermatozoides com núcleo corado em escuro da nigrosina; e (C) espermatozoides sem coloração.



Com relação à integridade acrossomal, a adição de 100 pM de melatonina proporcionou um maior percentual de espermatozoides com o acrossoma íntegro do que nos demais tratamentos (Tabela 2; P<0,05).

Na figura 5, pode-se observar a célula espermática durante a análise da membrana acrossomal de espermatozoides descongelados de ovinos.

Figura 5. Integridade acrossomal de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído: (A) acrossoma íntegro; e (B) acrossoma não íntegro.



Em relação à atividade mitocondrial, a melatonina demonstrou melhorar a qualidade espermática, pois houve maior percentual de espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB I) após a adição de 100 pM de melatonina comparado aos que tiveram a adição de 100 μM, 1mM e ao controle (Tabela 3; $P < 0,05$). Houve menor porcentagem de células espermáticas ativas (DAB II) no sêmen diluído ao qual foi adicionado de 100 pM de melatonina (Tabela 3; $P < 0,05$). Entretanto, apesar do DAB II ter sido menor, a adição de 100 pM também promoveu menor percentual de células inativas (DAB III) e sem atividade mitocondrial (DAB IV) quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 2; $P < 0,05$).

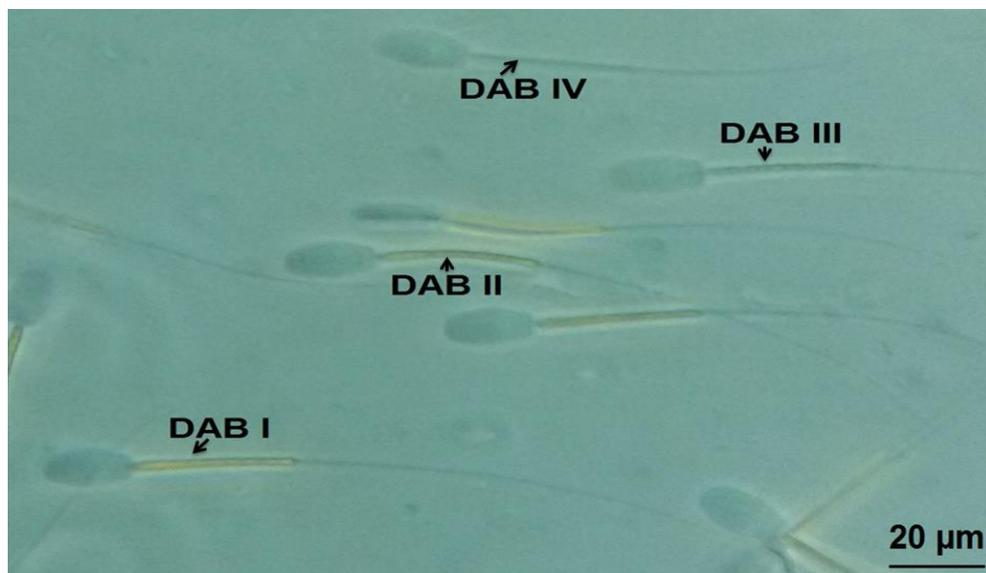
Tabela 3. Atividade mitocondrial de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído

Concentrações de Melatonina	DAB I (%)	DAB II (%)	DAB III (%)	DAB IV(%)
Controle	58,60 ± 6,41 ^B	22,05 ± 3,98 ^A	10,30 ± 2,79 ^A	9,05 ± 3,73 ^A
100 pM	69,30 ± 5,35 ^A	16,96 ± 2,87 ^B	7,41 ± 3,83 ^B	6,33 ± 2,94 ^B
100 nM	64,46 ± 5,72 ^{AB}	19,65 ± 3,01 ^{AB}	7,78 ± 2,54 ^{AB}	8,11 ± 2,48 ^{AB}
100 µM	62,51 ± 5,06 ^B	20,83 ± 2,33 ^{AB}	8,46 ± 3,66 ^{AB}	8,20 ± 2,38 ^{AB}
1 mM	61,68 ± 5,83 ^B	21,46 ± 2,47 ^{AB}	8,86 ± 2,62 ^{AB}	8,00 ± 2,49 ^{AB}

^{A,B}Valores de Média ± Erro Padrão na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). DAB I: células espermáticas com alta atividade mitocondrial; DAB II: predominância células espermáticas ativas; DAB III: predominância células espermáticas inativas; DAB IV: células espermáticas sem atividade mitocondrial.

Na figura 6, pode-se observar os espermatozoides descongelados de ovinos classificados de acordo com as diferentes atividade na mitocôndria.

Figura 6. Atividade mitocondrial de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído: DAB I (alta atividade mitocondrial); DAB II (espermatozoides com segmentos corados [ativos] e não corados [inativos], havendo predominância dos ativos); DAB III (espermatozoides com segmentos corados [ativos] e não-corados [inativos], havendo predominância dos inativos); e DAB IV (sem atividade mitocondrial).



Observou-se que a adição de 100 nM de melatonina no sêmen diluído, produziu menor quantidade de TBARS após a criopreservação, quando comparado aos demais tratamentos utilizados (Tabela 4; $P < 0,05$). Por outro lado, a quantidade de TBARS gerada nas concentrações de 100 pM e 100 μ M, apresentaram uma produção de espécies reativas menor que a concentração de 1 mM e o controle (Tabela 4; $P < 0,05$).

Tabela 4. Número de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) gerados de espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído

Concentrações de Melatonina	TBARS (μ M de MDA/ 10^6 sptz)
Controle	3,58 \pm 1,54 ^A
100 pM	3,17 \pm 1,46 ^{AB}
100 nM	2,84 \pm 1,99 ^B
100 μ M	3,24 \pm 1,44 ^{AB}
1 mM	3,66 \pm 1,68 ^A

^{A,B} Valores de Média \pm Erro Padrão na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em relação à capacidade dos espermatozoides se ligarem à membrana perivitelina da gema de ovo, após o processo de congelação/descongelação (Figura 7), observou-se que o número de espermatozoides descongelados que se ligaram, foi maior para os que receberam a adição de 100 pM de melatonina no sêmen diluído, em comparação aos demais grupos tratados e o controle (Tabela 5; $P < 0,05$).

Tabela 5. Número de espermatozoides descongelados e ovinos ligados à membrana perivitelina de gema de ovo (NEL) e sua eficiência de ligação (EFL) após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído

Concentrações de Melatonina	NEL	EFL
Controle	115,70 ± 5,82 ^D	1,0
100 pM	155,73 ± 3,24 ^A	1,34
100 nM	144,86 ± 4,66 ^B	1,25
100 µM	141,83 ± 5,62 ^B	1,22
1 mM	125,93 ± 4,52 ^C	1,09

^{A,B,C,D} Valores de Média ± Erro Padrão na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Na figura 7, pode-se observar os espermatozoides descongelados de ovinos ligados a membrana perivitelina da gema do ovo, após durante o teste de ligação.

Figura 7. Espermatozoides descongelados de ovinos após adição de diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído, corados com Hoechst 33342, ligados a membrana perivitelina da gema do ovo.



2.6 Discussão

O efeito antioxidante da melatonina em vários tipos de células tem sido frequentemente explicado devido a sua capacidade de neutralizar uma grande quantidade de radicais livres tóxicos (TAN et al., 2007; HARDELAND; TAN; REITER, 2009; PEYROT; DUCROCQ, 2008) e influenciar a expressão gênica de enzimas antioxidantes, aumentando os níveis de RNA mensageiro e de proteínas dessas enzimas (REITER et al., 2000b).

Vários autores tem relatado que a melatonina apresenta efeito benéfico sobre a preservação de espermatozoides de mamíferos, melhorando seus parâmetros funcionais como: motilidade espermática, integridade da membrana plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial e a produção de MDA (CASAO et al., 2010; ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; RAO; GANGADHARAN, 2008; DU PLESSIS; HAGENAAR; LAMPIAO, 2010). Deste modo, a análise dos diferentes parâmetros seminais é importante para a utilização do sêmen congelado/descongelado em inseminação artificial. No estudo atual, os resultados mostraram que a adição de melatonina no sêmen diluído sobre esses parâmetros avaliados, resultou em efeitos benéficos entre os diferentes grupos de tratamentos, protegendo as estruturas de forma eficiente.

Os parâmetros de motilidade total e progressiva aumentaram com a inclusão de 100 pM melatonina no sêmen diluído. Isso demonstra que a motilidade espermática pode ser preservada como consequência do efeito protetor da melatonina sobre as mitocôndrias dos espermatozoides. Além disso, a melatonina reduz os danos no DNA mitocondrial, causado pelo estresse oxidativo e inibe a apoptose celular em espermatozoides criopreservados (WANG et al., 2013), mantendo, assim, elevada porcentagem de motilidade espermática após a criopreservação.

Os resultados do presente trabalho, também mostram que o efeito protetor da melatonina contra os danos ocasionados à célula espermática durante a criopreservação, ocorreu de forma dose dependente. Nesse estudo, foram utilizadas diferentes concentrações de melatonina no sêmen diluído, sendo que a de 1 mM resultou em um declínio no percentual de motilidade espermática, sugerindo que doses elevadas desse antioxidante podem neutralizar a função protetora do mesmo contra o estresse oxidativo.

Os espermatozoides de mamíferos são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo (KHALIL; MAREI; KHALID, 2013), devido à composição da membrana plasmática e à exposição à mudanças drásticas de temperatura, os quais são muitas vezes, expostos, especialmente quando usados em técnicas de reprodução artificial com sêmen criopreservado (MATA-CAMPUZANO et al., 2012). Alterações morfológicas na membrana plasmática durante a criopreservação levam à peroxidação da bicamada lipídica, por conta da elevada produção de EROs, produzidas durante o processo de congelação-descongelação (SARIOZKAN et al., 2010). Os resultados demonstram que a adição de 100 pM, 100 nM e 100 µM de melatonina no diluente de congelação, neutralizou os efeitos adversos do processo de congelação-descongelação sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de carneiros.

Esse efeito protetor, está associado com a redução da peroxidação lipídica (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013) e a inibição da ruptura na membrana, causada durante a redução de temperatura (LEI XY et al., 2004). Essa proteção refere-se ao aumento na capacidade antioxidante total e a elevação da atividade das enzimas antioxidantes, após o tratamento com a melatonina (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013). Ela é capaz de estimular várias enzimas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase), envolvidas no metabolismo das EROs, proporcionando, assim, uma melhor preservação da integridade da membrana plasmática.

Danos à integridade da membrana plasmática provocam um aumento na permeabilidade da membrana e uma redução na capacidade do espermatozoide em controlar as concentrações intracelulares de íons que, por sua vez, estão envolvidos na motilidade espermática (BAUMBER; BALL; GRAVANCE, 2000). Dessa forma, observou-se que a melatonina em pequenas concentrações exerce a função protetora contra a peroxidação da membrana plasmática das células espermáticas, durante a criopreservação, preservando assim, a sua permeabilidade e consequentemente a motilidade espermática.

Nesse estudo, observou-se que o percentual de integridade acrossomal dos espermatozoides que receberam adição de 100 pM de melatonina, foi mais elevado em relação aos demais tratamentos no qual a melatonina foi adicionada. Isso pode ter sido devido ao efeito estimulatório da melatonina, quando em pequenas concentrações, sobre a atividade das enzimas envolvidas na defesa antioxidante.

Além do que, com base nos resultados do efeito da melatonina sobre a integridade acrossomal, observou-se que a adição nas concentrações de 100 μM e 1mM, não foram eficientes na proteção contra danos ao acrossoma espermático.

A variação do efeito observado com as diferentes concentrações de melatonina pode ser explicada pelo fato de que quantidades excessivas de antioxidante, causam alta fluidez da membrana plasmática, acima do ponto desejado, deixando os espermatozoides mais propensos a danos no acrossoma (ASHRAFI et al., 2011; SHOAE e ZAMIRI, 2008). Diante disso, a concentração de antioxidante adicionado ao diluente deve ser considerada, devido às possíveis alterações na condição fisiológica do diluente seminal que ela pode causar. Adicionalmente, sabe-se que elevados níveis de melatonina podem ainda, prejudicar o desenvolvimento ou a maturação dos espermatozoides, reduzindo o seu potencial fecundante (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

Nas células espermáticas, existe um grande número de mitocôndrias densamente compactadas em torno das fibras densas que envolvem o axonema, as quais produzem o trifostato de adenosina (ATP), por respiração aeróbica (PERUMAL; VUPRU; RAJKHOWA, 2013). Tem sido relatado (AITKEN; CLARKSON, 1987) que o axonema e as mitocôndrias na peça intermediária, podem ser danificados por níveis elevados de EROs. Estudos mostram que a melatonina pode estabilizar e proteger as mitocôndrias através de vários mecanismos (MARTIN et al., 2000; LOPEZ et al., 2009). Primeiro, as propriedades antioxidante e removedora de radicais livres da indoleamina protegem a organela dos danos oxidativos (MARTIN et al., 2000). Segundo, a melatonina aumenta a atividade dos complexos respiratórios I, III e IV da cadeia de transporte de elétrons, reduzindo o fluxo de oxigênio e melhorando a eficiência respiratória das mitocôndrias (LOPEZ et al., 2009) e aumentando a síntese de ATP em condições normais e estressantes (ACUNA-CASTROVIEJO et al., 2002).

Como a melatonina é uma molécula anfifílica, ela é capaz de atravessar as membranas celulares com facilidade e, assim, atingir compartimentos subcelulares, podendo acumular-se em concentrações elevadas nas organelas, como a mitocôndria (VENEGAS et al., 2012). Com essa propriedade, a melatonina é capaz de eliminar os radicais livres gerados na mitocôndria, além de reduzir a fuga de elétrons a partir da cadeia respiratória, diminuindo a formação de EROs (LEON et al., 2004). A melatonina, além de ser capaz de proteger as mitocôndrias dos danos

oxidativos, reduzindo o consumo de oxigênio, é capaz de melhorar o potencial da membrana e a produção do ânion superóxido, mantendo, ao mesmo tempo, a produção de ATP (LOPEZ et al., 2009).

Com base nessas informações, pode-se assumir que as concentrações de ATP intracelular mais elevadas, observadas após a criopreservação, nas amostras com 100 pM de melatonina, em comparação às demais concentrações e ao controle, podem ser atribuídas a proteção exercida pela melatonina nas mitocôndrias espermáticas. Nos espermatozoides, a produção de ATP supre várias atividades celulares e eventos bioquímicos, necessários para que a fecundação seja bem sucedida, tais como a capacitação, reação acrossômica e a motilidade espermática (MIKI, 2007). Dessa forma, a maior disponibilidade de ATP contribuiu para uma maior motilidade espermática, observada após a criopreservação nas amostras com 100 pM de melatonina em comparação com os demais grupos experimentais.

A produção de MDA vem sendo utilizada para determinar a peroxidação lipídica em vários tipos de células, incluindo as espermáticas (SIKKA, 1996). O estresse oxidativo é um fator crítico na morte das células espermáticas durante o processo de criopreservação (SIKKA, 1996). Os espermatozoides são muito sensíveis aos seus efeitos, e a sua capacidade fecundante é prejudicada devido à apoptose e aos danos no DNA (MARTINEZ-PASTOR et al., 2009).

A verificação da produção de TBARS é um método simples de quantificar os danos oxidativos nas células *in situ* (DAWN-LINSLEY et al., 2005). No presente estudo, a adição de 100 nM de melatonina no sêmen diluído, foi capaz de diminuir a susceptibilidade das células ao estresse oxidativo, visto que, a produção de TBARS foi menor, em relação aos demais tratamentos, sugerindo que a melatonina em pequenas concentrações, pode reduzir a peroxidação lipídica nas células espermáticas de carneiros, devido a sua natureza anfifílica e a propriedade antioxidante, além do efeito estimulatório sobre a atividade das enzimas envolvidas na defesa antioxidante.

Todavia, a concentração de melatonina a ser adicionada na terapia antioxidante é de extrema importância, devendo ser considerada. Nesse estudo, observa-se que o tratamento antioxidante com a concentração excessiva, 1 mM de melatonina, resultou em efeito deletério, com produção de TBARS superior às demais concentrações e semelhante ao tratamento controle. Assim, as altas concentrações de melatonina no sêmen diluído, em contato com a célula

espermática, podem levar ao bloqueio de importantes funções fisiológicas, resultando no aumento do estresse oxidativo.

Devido às semelhanças moleculares entre a zona pelúcida do oócito e a membrana perivitelina, os espermatozoides de muitas espécies podem se ligar a ela (MORAES et al., 2015), inclusive os de ovinos. Por outro lado, ensaios de ligação de MPV podem também ser úteis para determinar interações entre os espermatozoides e o oócito, uma parte importante do processo de fecundação (MORAES et al., 2015).

A melhora na função espermática com a adição de melatonina, observada no sêmen descongelado, estimulou uma maior capacidade de ligação em todas as concentrações utilizadas nesse estudo, quando comparada ao controle, sendo a mais eficaz a de 100 pM. Embora, os testes *in vitro* não possam avaliar com total confiabilidade o potencial fecundante dos espermatozoides (MOCE; GRAHAM, 2008), a obtenção de dados de fecundação *in vivo* pode ser muito cara e demorada (MORAES et al., 2015). Portanto, a realização de novos testes *in vitro* que permitam avaliar os atributos necessários para os espermatozoides fecundarem, pode ser muito útil para prever a possibilidade de fecundidade (MORAES et al., 2015).

Os dados apresentados neste estudo mostraram resultados positivos quanto à adição de melatonina no sêmen diluído, visando promover melhoria da qualidade espermática, comprovando, através dos testes laboratoriais *in vitro*, o aumento da motilidade, a preservação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, o aumento da atividade mitocondrial, a redução do estresse oxidativo e a capacidade dos espermatozoides de se ligarem à MPV, conseqüentemente, melhoria do potencial fertilizante de espermatozoides descongelados de carneiros.

Vale ressaltar que os resultados desse estudo mostraram que a concentração de melatonina utilizada é de importância crucial para obter o efeito protetor desejado. Em termos gerais, os resultados obtidos mostram que a adição de 100 pM de melatonina no diluente para criopreservação, favorece a redução do efeito deletério do estresse oxidativo ocasionado pela crioinjúria na célula espermática, durante os procedimentos de congelação/descongelação. Por outro lado, o aumento na concentração de melatonina, não foi acompanhada por um aumento adicional dos efeitos benéficos da indoleamina sobre as células espermáticas.

3. CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição de baixas concentrações de melatonina no sêmen diluído promoveu maior proteção aos espermatozoides contra os danos causados pelo estresse oxidativo, além de diminuir aqueles estruturais após congelação/descongelação, portanto, melhorando a qualidade espermática.

Dentre as concentrações testadas, podemos verificar que a de 100 pM foi mais eficaz, entretanto, maiores pesquisas e outras avaliações são necessárias.

4. REFERÊNCIAS

ACUNA, C.D., ESCAMES, G., CARAZO, A., LEON, J., KHALDY, H., REITER, R.J. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v.2, p.133–151, 2002.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. “Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa,”. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, no. 2, p.459–469, 1987.

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

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.35, p.302-315, 1993a.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, n.1, p.257-265, 1993b.

ALLEGRA, M. et al. The chemistry of melatonin’s interaction with reactive species. **Journal of Pineal Research**, v.34, p.1-10, 2003.

ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**. v.13, p.232–241, 1992.

AMORIM, E.A.M. et al. The effect of adding cholesteryl-heptanoate, -palmitate, -pelargonate, or -stearate loaded cyclodextrin on bull sperm cryosurvival. Abstracts of the 40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, July 01–04, 2007, San Antonio, TX. *Biology of Reproduction*. 77(Suppl.), Abstract 139, 2007.

ANEL, L. et al. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 30–42, 2007.

ARRUDA, R. P. et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.145-150, 2005.

ARRUDA, R.P. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.8-16, 2007.

ASHRAFI, 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.

ASHRAFI, I., et al. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. **BMC Research Notes**, v.4, p.547, 2011.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. **Journal of Andrology**, v.21, p.1-7, 2000.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: University Press, 285 p. 1989.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895-902, 2000.

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

BELFORD, J. M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian animals. **Biology of Reproduction**, v.28, p.108-120, 1983.

BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolos de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas Suffolk. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.473-474, 2003.

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

- BILODEAU, J.F. et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-1122, 2002.
- BUCAK, M. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, v.67, n.5, p.1060-1067, 2007.
- CANIATO, R. et al. Melatonin in plants. **Advances in Experimental Medicine and Biology** v.527, p.593-7, 2003.
- CARPENTIERI, A. et al. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, v.65, n.4, p.437-444, 2012.
- CARVALHO, O.F. et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n1, p.33-38, 2002.
- CASAO, A. et al. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. **Reproduction in Domestic Animals**; v.5, p.425-432, 2010.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte. 104 p, 2013.
- CELEGHINI, E.C.C. et al. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes of rooster spermatozoa. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, n.3, p.143-149, 2007.
- CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v.9, p.11-24, 2005.
- CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.46-52, 2000.
- DARIN-BENNET, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v.14, p.466-470, 1977.

DAS, K.K.; RAJKONWAR, C.K. Effect on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. **International Journal of Animal Science**, v.10, p.127-128,1995.

DAWN-LINSLEY, M. et al. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. **The Journal of Neuroscience. Methods**, v.141 (2), p;219-222. 2005.

DERIVAUX, J. Reprodução dos Animais Domésticos. Zaragoza, Editora Acribia, 1980.

DE LAMIRANDE, E. et al. Reactive Oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.48-54, 1997.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function. In: Gagnon C. The male gamete: from basic science to clinical application. Vienna, IL: Cache River Press. p.455- 467. 1999.

DU, LY. Antioxidation of melatonin on boar semen preservation. Jiangsu, **Journal of Agricultural Science**, v.25, p.315–319. 2009.

DU PLESSIS, S.S.; HAGENAAR, K; LAMPPIO, 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.

ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v.31, n.1, p.17-22, 1999.

FLESH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.197-235, 2000.

FOOTE, R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1-10, 2002.

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

GAVELLA, M.; LIPOVAC V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isoenzyme pattern of sperm in infertile men. **Archives of Andrology**, v.28, p.35-41, 1992.

GOMEZ, E.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4- hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**. v.21(2), p.81–94. 1998.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. Veterinary Clinics of North America. **Equine Practice**. v.12 (1), p.119-129, 1996.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.239-247, 2001.

GRAHAM, J.K., FOOTE, R.H., PARRISH, J.J. Effect of dilauroyphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull sperm into zona-free hamster eggs. **Biology of Reproduction**. v.35, p.413–424, 1986.

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

GRIVEAU, J. F. et al. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, n.1, p.17-26, 1995.

GUERRA, P. M. M. P. et al. Uso de antioxidantes em ovinos. **Ciência Animal**, v.22, p.354-364, 2012.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7ª ed. Barueri: Editora Manole. 513p. 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. C. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: Oxford University Press, 936p. 1999.

HANCOCK, J. L. A staining technique for the study of temperature shock in semen. **Nature**, v.167, p.323-324, 1951.

HARDELAND, R.; TAN, D.X.; REITER, R.J. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: The resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. **Journal of Pineal Research**. v.47, p.109–126, 2009.

HENKEL, R. The impact of oxidants on sperm function. **Androlologia**, Giessen, v.37, n.6, p.205–206, 2005.

HERRICK, J. R.; SWANSON, W. F. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, n.7, p. 503-513, 2003.

HOPKINS, S.M.; EVANS, L.E. In: McDONALD, L.E. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4 ed. Interamericana: México, 1991.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v.10, n.6, p.809-828, 1987.

ISHIZUKA, B. et al. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. **Journal of Pineal Research**. v.28 (1), p.48-51. 2000.

JANERO, D. J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v.9, p.515-540, 1990.

JOU, M. J. et al. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v.43, n.4, p.389-403, 2007.

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.

KASIMANICKAM, R. et al. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v.65, p.1407-1421, 2006.

KATO, M. et al. Evaluation of mitochondrial function and membrane integrity by dual fluorescent staining for assessment of sperm status in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v.27, n.1, p.11-18, 2001.

KESSOPOULO, E. et al. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.463-470, 1994.

KHALIL, W.A.; MAREI, W.F.; KHALID, M. Protective effects of antioxidants on linoleic acid-treated bovine oocytes during maturation and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v.15, p.161–168, 2013.

KHERADMAND, A.; BABAEI, H.; ABSHNAS, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.7, n.4, p.40-45, 2006.

KORKMAZ, A., REITER, R. J., TOPAL, T. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. **Molecular Medicine**, v.15(1-2), p.43-50, 2009.

KRAMER, R. Y. et al. Comparison of motility and flow cytometer assessment of seminal quality in fresh, 24h extended and cryopreserved human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.14, p.374-384, 1993.

KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. **Theriogenology**, v.41, p.1355-366, 1994.

LEI, X.Y. et al. Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: the possible involvement of polyamines. **Journal of Pineal Research**, v.36, p.126–131, 2004.

LENZI, A. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, p.246-56, 1996.

LENZI, A. et al. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic clinic. **Contraception**, v.65, p.301-304, 2002.

LEON, J., et al. Melatonin and mitochondrial function. **Life Sciences**, v.75, p.765–790, 2004.

- LILY-PALOMINO, T. et al. Preservation of goat semen using yolk-citrate and yolk skim milk extenders. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**. v.12, n.1, 2001.
- LONG, J. A. et al. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. **Biology of Reproduction**, v.54, p.638-646, 1996.
- LOPES, S. et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.13, n.4, p.896-900, 1998.
- LOPEZ, A. et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. **Journal of Pineal Research**. v.46, p.188–198, 2009.
- LUVONI, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v.66, p.101–111, 2006.
- MARTÍ, E. et al. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.29, n.4, p.459-467, 2008.
- MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. **Reproduction**, v.137, p.225-235, 2009.
- MARTÍN, M. et al. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. **FASEB Journal**, v.14, p.1677-1679, 2000.
- MARTÍN-HIDALGO, D. et al. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. **Theriogenology**, v.75, p.1550-1560, 2011.
- MATA-CAMPUZANO, M. et al. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37°C in presence of several antioxidants. **Theriogenology**, v.78, p.1005-1019, 2012.
- MELO, C.M. et al. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.4, p.171-175, 2007.

MICHAEL, A. J. et al. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.119–135, 2009.

MIKI K. Energy metabolism and sperm function. **Society Reproduction and Fertility**, Suppl. v.65, p.309-325, 2007.

MOCE, E., GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**. v.105, p.104-118, 2008.

MORAES, E. A. et al. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.148-154, 2010.

MORAES, E.A. et al. Cholestanol-loaded-cyclodextrin improve the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, p.19-24, 2015.

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

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Minerals. In: Nutrient Requirements of Beef Cattle. National Academies Press, Washington, DC, pp. 54–74, 2000.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351-8, 1979.

PARK, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PERUMAL, P.; VUPRU, K.; RAJKHOWA, C. “Effect of addition of taurine on the liquid storage (5°C) of mithun (*Bos frontalis*) semen,” **Veterinary Medicine International**, 2013.

PEYROT F, DUCROCQ C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Pineal Research**. v.45, p.235-246, 2008.

PEÑA, F. J. et al. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.345-349, 2009.

PERIS, S.I. et al. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v.25, n.2, p.224-233, 2004.

PLANTE, M.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.62, p.387-393. 1994.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.22, n.1, p.87-95, 1991.

POTO, A. Congelacion de semen porcino dae razas autoctonas em peligro de extincion. Influencia de la metodologia em bancos de germoplasma para pequenas poblaciones. **Archivos de Zootecnia**, v.49, p.493-496, 2000.

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

RAO MV, GANGADHARAN B. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. **Toxicology In Vitro**. v.22, p.935-942, 2008.

REITER, R. J. Melatonin: lowering the high price of free radicals. **Physiology**, v.15, p.246- 250, 2000a.

REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress – a review. **Journal of Biomedical Science**. v.7, p.444–458, 2000b.

REITER, R. J., TAN, D. X., TERRON, M. P. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. **Acta Biochimica Polonica**, v.54(1), p.1-9, 2007.

SABEUR, K.; BALL, B.A. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, p.701-706, 2006.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.1-36, 1995.

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

SALISBURY, G.W.; VANDERMARK, N.L.; LODGE, J.R. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovidos. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 831p.il. 1978.

SARIOZKAN, S. et al. Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. **Theriogenology**. v.73, p.316–323, 2010.

SARLÓS, P. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.50, n.2, p.235-245, 2002.

SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2. Cary, USA: SAS Institute Inc; 2002-2008.

SHEKARRIZ, M.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. **Urology**, v.45, p.130-107, 1995.

SHOAE, A.; ZAMIRI, M. J. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender, **Animal Reproduction Science**, v.104, n.2-4, p.414-418, 2008.

SIDHU, R. S. et al. Relationship between creatinine kinase activity and semen characteristics in sub-fertile men. International. **Journal of Fertility and Women's Medicine**, v.43, p.192-197, 1998.

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

SILVA, C. M. B. Da. et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v.51, p.172-179, 2011.

SILVA, K.M.G. et al. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelação de sêmen de garanhões férteis e subférteis. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2271-2277, 2008.

SMITH, R. et al. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. **Human Reproduction**, v.11(8), p.1655-1660, 1996.

SOUZA, W. L. et al. Adição de diferentes concentrações de crioprotetores e gema de ovo sobre a motilidade espermática progressiva de ovinos após a criopreservação. In: XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia-ZOOTEC, 2015, Fortaleza-CE. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia. v. 25. 2015.

TAN, D. X. et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal of Pineal Research**, v.42, n.1, p.28-42, 2007.

TAN, D. X., REITER, R. J., MANCHESTER, L. C. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2(2), p.181-197, 2002.

VENEGAS, C. et al. Extra pineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. **Journal Pineal Research**. v.52, p.217-227, 2012.

WANG, F. et al. Melatonin pro-motes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. **Journal Pineal Research**. v.55(3), p.267-74, 2013.

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

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, p.120. 1992.

WOOLLEY, J.T. Reflectance and transmittance of light by leaves. **Plant Physiology**, v.47, n.3, p.656-662, 1971.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. The physiology of reproduction. 2. ed. New york: Raven Press, p. 189-317. 1994.

ZINI A, GARRELS K, PHANG D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v.55, p.922-926, 2000.

ZINI, A.; LIBMAN, J. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. **Canadian Medical Association Journal**, v.175, n.5, p.494-500, 2006.

5. ANEXOS

Anexo A

- Meio de congelação: Tris-gema de ovo (100 mL).

Componente	Quantidade
Tris	3,605 g
Ácido Cítrico	2,024 g
Frutose	1,488 g
Gema de ovo	20 mL
Glicerol	2 mL
H ₂ O	qsp 100 mL
pH	6,8
Estreptomicina	0,01 g

Anexo B

- Solução de Eosina-Nigrosina.

Componente	Quantidade
Eosina Y	0,1 g
H ₂ O	10 mL
Nigrosina	1 g

Anexo C

- Solução da coloração simples de POPE.

Solução Tampão:

Componente	Molaridade	Quantidade
Fosfato dibásico	0,2 M	(0,284 g/ 10 mL H ₂ O)
Ácido Cítrico	0,1 M	(0,192 g/ 10 mL H ₂ O)
H ₂ O	qsp	

Solução Corante:

Componente	Quantidade
Álcool Etílico	8 mL
Solução Tampão	12 mL
Rosa Bengala	200 mg
Fast Green	200 mg

Para o preparo da solução tampão foi utilizado 16,5 mL da solução 0,2 M de fosfato dibásico misturados a 3,5 mL da solução 0,1 M de ácido cítrico. O pH final dessa solução foi ajustado para 7 com NaOH e/ou HCl, quando necessário.

Foram preparados 20 mL de corante, misturando-se 8 mL de álcool etílico com 12 mL da solução tampão. A essa solução foram então adicionados 200 mg do corante rosa bengala em pó e 200 mg do corante “fast green” em pó. Esse corante foi então acondicionado à temperatura ambiente e protegido da luz (em recipiente âmbar e com revestimento externo de papel alumínio).

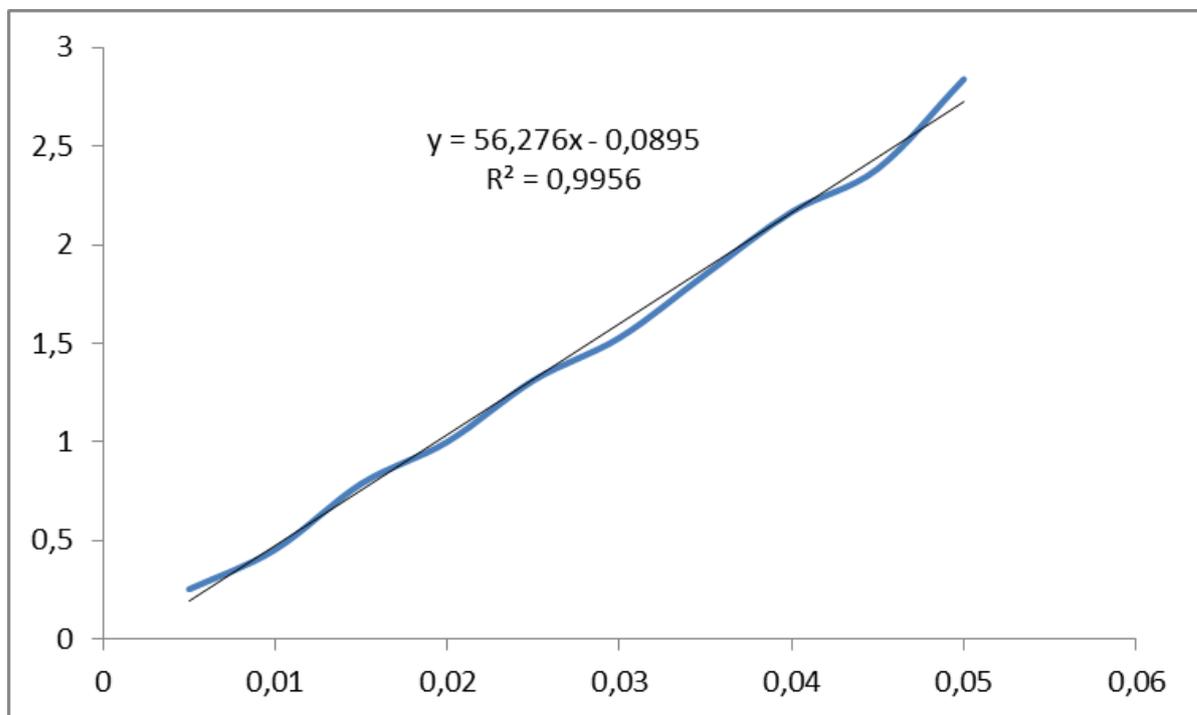
Anexo D

- Solução da coloração 3,3 diaminobenzidina (DAB).

Componente	Quantidade
3,3 Diaminobenzidina	1 mg/mL
Tampão fosfato de Sódio	0,15 M
H ₂ O	qsp
pH	7,2

Anexo E

- Curva padrão do MDA.



Anexo F

- Bull Media – TALP (Diluyente B-TALP)

Tyrodes	Talp
NaCl 0.569 g	Na Pyruvate 0.0022 g
KCl 0.023 g	Na Lactate 0.368 mL
KH ₂ PO ₄ 0.004 g	Glucose 0.090 g
NaHCO ₃ 0.209 g	HEPES 0.238 g
*CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.025 g	BSA 0.300 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O 0.008 g	Osmolaridade (300-310 mOsm) e pH (7.2-7.4)

*Adicionar por último