



KIANNE SILVA MONTEIRO

**QUALIDADE DO SÊMEN CANINO SUBMETIDO A UM
PROTOCOLO DE CONGELAMENTO RÁPIDO COM
ADIÇÃO DE MELATONINA**

**LAVRAS – MG
2020**

KIANNE SILVA MONTEIRO

**QUALIDADE DO SÊMEN CANINO SUBMETIDO A UM PROTOCOLO DE
CONGELAMENTO RÁPIDO COM ADIÇÃO DE MELATONINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Monteiro, Kianne Silva.

Qualidade do sêmen canino submetido a um protocolo de
congelamento rápido com adição de melatonina / Kianne Silva
Monteiro. - 2020.

48 p.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. biotecnologia da reprodução. 2. estresse oxidativo. 3. bulldog
francês. I. Murgas, Luis David Solis. II. Título.

KIANNE SILVA MONTEIRO

**QUALIDADE DO SÊMEN CANINO SUBMETIDO A UM PROTOCOLO DE
CONGELAMENTO RÁPIDO COM ADIÇÃO DE MELATONINA**

**CANINE SEMEN QUALITY IN FAST FREEZING PROTOCOL WITH
MELATONIN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05 de fevereiro de 2020.

Dra. Gilmara Junqueira Machado - DBI/UFLA
Dra. Stefânia Priscilla de Souza – DZO/UFLA
Dra. Luciana Crepaldi Lunkes – Unilavras

Prof. Luis David Solis Murgas
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

AGRADECIMENTOS

À Deus eu agradeço por guiar meus passos e por ouvir meu coração. Aos meus familiares e amigos deixo meus mais sinceros agradecimentos pelo apoio e torcida. Ao meu marido, peça fundamental para essa conquista, agradeço por toda ajuda, companheirismo, confiança, e por partilhar essa vida comigo com uma maestria que só ele é capaz de fazer.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras pelo acolhimento ao longo de todos esses anos, pelo corpo docente sempre solícito e atuante, e pela estrutura ímpar. Agradeço ao PPGCV por me proporcionar a realização desse antigo sonho de me tornar Mestre, principalmente à Dona Fátima e coordenadoras Prof. Kity e Prof. Elâine.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro durante o curso de Mestrado.

Aos membros da banca, Dra. Gilmara, Dra. Stefania e Dra. Luciana, pela atenção, disponibilidade, e pelas contribuições que tiveram grande importância na finalização desse estudo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, não só pela orientação, mas por ser um amigo, um pai e um exemplo de pessoa e de profissional. Obrigada pela sua amizade, alegria, comprometimento com nosso trabalho, e pelas inúmeras vezes que nos auxiliou com tamanha solicitude.

À minha amiga e colega de trabalho Naiara Motta, eu deixo a minha mais profunda gratidão por tudo que é para mim, por tanta ajuda e por trilhar essa caminhada junto comigo. Amiga, sem você eu nada seria... “Sozinho vamos mais rápido, mas juntos vamos mais longe!”

À minha equipe do NERC e HARMOS, por permitir a execução do trabalho, e por dividir esse sonho junto comigo. Obrigada por sempre estarem presentes quando mais precisei.

Aos cães, alvo desse estudo, que me inspiram a cada dia mais, e que trazem luz e calma para a profissão.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da adição de melatonina, em diferentes concentrações, no congelamento de sêmen canino, com propósito de reduzir o estresse oxidativo devido ao processo de congelamento. Foram utilizados sêmen de seis cães machos, da raça Bulldog Francês, adultos, com idade entre dois e cinco anos, realizando-se três coletas de sêmen a cada 15 dias. O diluidor utilizado foi composto por Tris-gema e etilenoglicol 5%, e a melatonina foi acrescentada ao sêmen em cinco concentrações diferentes, sendo o grupo controle sem adição de melatonina (T0), e os demais grupos com adição de 1 mM (T1), 1,5 mM (T2), 2 mM (T3), 2,5 mM (T4) e 3 mM (T5). O sêmen foi submetido a refrigeração a 4°C por 1h, foi mantido a 4°C do vapor de nitrogênio líquido por 10min e posteriormente imerso em nitrogênio líquido para criopreservação. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 1 minuto e foram avaliados parâmetros cinéticos pelo software CASA-SCA, morfologia, integridade de membrana e marcadores do estresse oxidativo como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e malondialdeído (MDA). Houve alta correlação ($p < 0,05$) entre os parâmetros cinéticos do sêmen fresco (taxas de motilidade, velocidade curvilínea – VCL, velocidade linear progressiva – VSL, velocidade média da trajetória – VAP e frequência do batimento cruzado – BCF). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos parâmetros cinéticos, morfologia, integridade de membrana, níveis de MDA ou atividade enzimática antioxidante de CAT e SOD quando comparados os diferentes tratamentos instituídos com melatonina. Não houve correlação significativa ($p > 0,05$) entre concentração espermática, proteína total, níveis de melatonina adicionada e variáveis relacionadas com qualidade do sêmen. Foi possível avaliar a eficácia do protocolo de congelamento e descongelamento para cães da raça Bulldog Francês, além de permitir uma avaliação completa do sêmen fresco no software CASA-SCA motility, definindo os padrões cinéticos dessa raça em específico. Conclui-se que a adição de melatonina no congelamento de sêmen canino não proporcionou melhoras significativas no estresse oxidativo e na qualidade do sêmen descongelado.

Palavras-chave: biotecnologia da reprodução, estresse oxidativo, bulldog francês.

ABSTRACT

The aim of this study are evaluate the addition of melatonin, in different concentrations, in freezing canine semen. The purpose is reducing oxidative stress, due to cryopreservation process. Six males dogs, adults, with age of two to five years were used in the study, making three semen collection, every fifteen days. The extender used was composed by Tris-egg yolk and ethylene glycol 5%, and melatonin added in the semen in five different concentrations, being a control group without addition of melatonin (T0), and the others groups with 1 mM (T1), 1,5 mM (T2), 2 mM (T3), 2,5 mM (T4) e 3 mM (T5) of melatonin. The semen was refrigerated at 4°C for 10 minutes, after positioned 4cm above the liquid nitrogen level, until it is plunged into liquid nitrogen for cryopreservation. The semen was thawed in water bath at 37°C for one minute and evaluated for the kinetic parameters in software CASA-SCA, morphology, membrane integrity and parameters of oxidative stress, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA). A positive correlation were observed ($p < 0,05$) between kinetic parameters of fresh semen (total and progressive motility, velocities curvilinear – VCL; straight-line – VSL; average path – VAP and beat cross frequency – BCF). There was no significant difference ($p > 0,05$) in the kinetic parameters, morphology, membrane integrity, MDA or antioxidant activity of CAT and SOD if the different treatments with melatonin are compared. There is no significant correlation ($p > 0,05$) between sperm concentration, total protein, melatonin levels and variables related to semen quality. It was possible to evaluate the efficacy of the freezing and thawing protocol for frenchie bulldog canines, in addition to a thorough assessment about fresh semen in computer program CASA-SCA motility, defining kinetic patterns specifically for that breed. Melatonin addition in freezing canine semen didn't provide significant increases in pos-thawing quality semen and does not decrease oxidative stress.

Keywords: biotechnology of reproduction, oxidative stress, frenchie bulldog.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
2	REVISÃO DE LITERATURA	09
2.1	Congelamento de sêmen canino	09
2.1.1	Estresse oxidativo	12
2.2	Melatonina e seu potencial antioxidante	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Modelo animal	19
3.2	Congelamento do sêmen.....	20
3.2.1	Diluidor e crioprotetor	20
3.2.2	Adição de melatonina	21
3.2.3	Congelamento e descongelamento do sêmen	23
3.3	Avaliação espermática.....	26
3.3.1	Cinética espermática	27
3.3.2	Concentração espermática	28
3.3.3	Integridade de membrana	28
3.3.4	Morfologia espermática	29
3.3.5	Proteína total	29
3.3.6	Superóxido dismutase (SOD)	30
3.3.7	Malondialdeído (MDA)	31
3.3.8	Catalase (CAT)	31
3.4	Análise estatística	32
4	RESULTADOS	32
4.1	Avaliação pré-experimental	32
4.2	Cinética espermática	33
4.3	Morfologia e integridade de membrana	34
4.4	Proteína total	37
4.5	Estresse oxidativo	38
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Em algumas raças da espécie canina a inseminação artificial é necessária, seja por dificuldades anatômicas, longas distâncias geográficas, problemas respiratórios principalmente em cães braquicefálicos como Bulldog Francês e Inglês, Pug, Shih Tzu, baixa libido, dentre outros, sendo que o sêmen utilizado na inseminação pode ser fresco, refrigerado ou congelado (MASON, 2018; UCHOA; FRANCO; MOTA, 2012). Por esses e outros motivos, a demanda pela reprodução canina assistida vem aumentando nos últimos tempos, principalmente em relação às biotecnologias da reprodução, sobretudo no uso de sêmen descongelado de qualidade.

Nesses casos, a criopreservação de sêmen é uma ferramenta importante, pois facilita o armazenamento genético a longos períodos, promovendo um melhor controle de programas e medidas que gerenciam a atividade reprodutiva dos animais, facilitando também a inseminação artificial na espécie canina (BELALA et al., 2016; KHAN et al., 2017). Além disso, o mercado de doses inseminantes de sêmen canino tem crescido cada vez mais, trazendo consigo uma necessidade de se produzir sêmen congelado de qualidade para atender à demanda da reprodução canina assistida.

Devido ao processo de congelamento, podem ocorrer muitos danos celulares, que levam a uma diminuição da qualidade espermática no pós-descongelamento e dentre elas, por exemplo, alterações celulares devido ao estresse oxidativo. Portanto, o desenvolvimento de melhores protocolos de congelamento de sêmen canino tem sido cada vez mais explorado, para que o sêmen descongelado tenha o mínimo possível de danos que comprometam sua qualidade. O uso de antioxidantes no congelamento de sêmen canino se mostra como uma alternativa para reduzir os danos causados nas células pelo estresse oxidativo durante o congelamento, levando a uma maior viabilidade espermática após criopreservação.

A melatonina já vem sendo estudada em vários aspectos relacionados à reprodução, como no desenvolvimento de embriões e maturação de oócitos, qualidade espermática em algumas espécies animais como suínos (MARTÍN-HIDALGO et al., 2011), bovinos (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; YANG et al., 2014), ovinos (EGERSZEGI et al., 2014; SUCCU et al., 2011), humanos (CLAUSTRAT; LESTON, 2015; LUBOSHITZKY et al., 2002; PLESSIS; HAGENAAR; LAMPIAO, 2010),

peixes (ASSIS et al., 2019), garanhões (SILVA et al., 2011) e cães (VARESI et al., 2014). Entretanto, em sêmen canino, seu uso ainda não foi estudado detalhadamente, nem tampouco a concentração ideal a ser adicionada ao sêmen no congelamento foi estabelecida.

O objetivo geral desse trabalho é avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de melatonina sob a qualidade do sêmen canino criopreservado e sob o estresse oxidativo inerente ao processo de congelamento e sob a qualidade do sêmen canino descongelado. Pretende-se, com este trabalho, esclarecer algumas hipóteses, como:

- Qual concentração ideal de melatonina a ser acrescentada no protocolo de congelamento de sêmen canino?
- Quais efeitos benéficos podem ocorrer devido a adição de melatonina no congelamento de sêmen canino?
- Sob quais parâmetros espermáticos a melatonina pode trazer resultados positivos?

Como objetivo específico, pretende-se definir um protocolo ideal de congelamento rápido para sêmen de cães da raça Bulldog Francês, utilizando a melatonina na concentração adequada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Congelamento de sêmen canino

A criopreservação de sêmen vem sendo desenvolvida há muito tempo, com o intuito de otimizar as biotecnologias da reprodução canina, sendo útil também em casos onde é necessário transportar os gametas por longas distâncias (SÁNCHEZ-CALABUIG et al., 2017). O sêmen canino congelado é amplamente utilizado em técnicas de inseminação artificial, seja ela transcervical ou inseminação cirúrgica intra-uterina via laparotomia (MASON, 2018; ROTA et al., 2010).

O processo de congelamento, entretanto, pode trazer diversos danos às células, sendo eles letais ou sub-letais (SILVA et al., 2011). A avaliação do ejaculado fresco, realizada anteriormente ao processo de congelamento, tem grande importância para se comparar os resultados obtidos com o processo de congelamento, construindo assim um panorama da qualidade do sêmen criopreservado (KARGER et al., 2016). Vários protocolos de diluidores e crioprotetores para sêmen canino são discutidos, a fim de trazer um ganho na qualidade do sêmen descongelado, já que sua viabilidade ainda se mostra inferior quando comparada com sêmen fresco (GOERICKE-PESCH et al., 2015).

Alguns diluidores comerciais encontram-se disponíveis para congelamento de sêmen canino, mas quando descongelado, esse sêmen muitas vezes não apresenta resultados satisfatórios, o que pode ser um indicativo de que os protocolos utilizados não se adequam totalmente às necessidades do sêmen canino no processo de congelamento (VERSTEGEN et al., 2015).

Dentre os diluidores que apresentam bons resultados, os que se destacam são os diluidores a base de Tris-gema, como por exemplo compostos por Tris (hidroximetil) aminometano, ácido cítrico, glicose ou frutose, com acréscimo de gema de ovo (KHAN et al., 2017; MOURA et al., 2013; SÁNCHEZ-CALABUIG et al., 2017; VAN DEN BERGHE et al., 2018), proporcionando resultados satisfatórios quando avaliados parâmetros cinéticos, morfologia e integridade de membrana celular no sêmen descongelado (ROTA et al., 2010; VERSTEGEN et al., 2015).

Os crioprotetores são indispensáveis nos protocolos de congelamento de sêmen, inclusive para o sêmen canino. Eles têm a função de modificar a permeabilidade da membrana à água e protegem as células dos danos causados pelo processo de congelamento (SETYAWAN et al., 2015). Além disso, podem reduzir a quantidade de gelo formada durante processo de congelamento mas, para que sua ação biológica seja eficiente, esses compostos devem apresentar pouca ou nenhuma toxicidade, como por exemplo glicerol, dimetilsulfóxido e propanodiol (PEGG, 2007).

Para Sánchez-Calabuig et al., (2017), a gema de ovo é considerada um crioprotetor externo, que não penetra na célula e diminui a formação de cristais de gelo extracelulares. Entretanto, a gema de ovo é formada por vários componentes, e sua ação

crioprotetora se dá basicamente pelas lipoproteínas de baixa densidade, fosfolípidos e triglicéridos.

No congelamento de sêmen canino, os principais crioprotetores internos utilizados são o glicerol e etilenoglicol, que têm importante papel na diminuição de danos celulares durante a criopreservação (ROTA et al., 2010). Ambos apresentam moderada toxicidade celular, têm penetração rápida pela membrana, além de serem resistentes à mudança osmótica. Em alguns estudos, o etilenoglicol tem resultados similares ou até mesmo superiores quando comparado com o glicerol, e em outros, o glicerol se destaca como melhor crioprotetor (SETYAWAN et al., 2015).

No processo de congelamento de sêmen muitas vezes ocorrem alguns danos à célula que comprometem a qualidade espermática do sêmen descongelado (BELALA et al., 2016). Dentre esses danos celulares encontra-se problemas relacionados a formação de cristais de gelo intracelulares (SETYAWAN et al., 2015), diferenças no gradiente osmótico (KARGER et al., 2016), perda de colesterol pela membrana plasmática afetando sua integridade (KHAN et al., 2017) e estresse oxidativo (SETYAWAN et al., 2016). Tudo isso pode desencadear uma perda da qualidade espermática e de sua capacidade fertilizante, deixando o sêmen descongelado inviável (SETYAWAN et al., 2015).

A depleção de colesterol na membrana plasmática leva a uma perda de sua estabilidade, o que pode acarretar na diminuição da capacidade de fertilização do sêmen após descongelamento, pois o colesterol tem papel vital para garantir que a membrana plasmática mantenha sua estabilidade, impedindo assim o choque térmico quando ocorre o decréscimo de temperatura no congelamento (KHAN et al., 2017).

Um estudo conduzido por Khan et al. (2017), avaliou o uso de ciclodextrinas carreadoras de colesterol (CLC) no congelamento de sêmen canino com 1mg, 2mg e 3mg de CLC. Para os autores, existem melhorias significativas na qualidade do sêmen descongelado submetido a um teste com uso de CLC, quando comparado ao grupo controle. Segundo eles, os valores encontrados para motilidade, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e de DNA foram estatisticamente superiores ($p < 0,05$) aos parâmetros obtidos no grupo controle, quando se adiciona 2mg de CLC. Portanto, ao realizar a adição de colesterol no congelamento por meio das

CLC, o sêmen canino descongelado demonstra um aumento de sua qualidade espermática.

A diferença no gradiente osmótico tem implicação direta no sucesso do congelamento do sêmen, pois um maior gradiente osmótico geralmente leva a um efluxo de água para o interior do espermatozóide, formando cristais de gelo intracelulares (KARGER et al., 2016). Além disso, o processo de descongelamento do sêmen também precisa de atenção especial, visto que a temperatura e velocidade de descongelamento são fundamentais para a integridade das células no pós-descongelamento (PEGG, 2007).

2.1.1. Estresse oxidativo

Durante o processo de congelamento do sêmen, vários efeitos deletérios podem haver nas células, como danos na membrana plasmática devido a um eventual choque térmico, formação de cristais de gelo no interior da célula e estresse oxidativo (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; SUCCU et al., 2011; VALENÇA; GUERRA 2007).

Existem níveis fisiológicos de radicais livres que são necessários para o funcionamento celular, relacionados com processos de proliferação e diferenciação celular (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013). Entretanto, em situações onde ocorra estresse oxidativo, há produção de radicais livres em níveis maiores que o desejado, causando lesões irreversíveis no material genético, na morfologia celular e na conformação da membrana plasmática (LUCIO et al., 2016; VALENÇA; GUERRA, 2007).

Após uma redução tetravalente, com incorporação de elétrons na sua estrutura, o oxigênio (O_2) é transformado em água (H_2O), liberando, ao longo dessa redução, alguns radicais como radical superóxido (O_2^-), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O radical livre O_2^- é formado na mitocôndria, e tem pouca reatividade, com baixa ação em membranas lipídicas, ao contrário do radical OH, que é formado a partir do H_2O_2 e tem alta reatividade, estando diretamente relacionado com a peroxidação lipídica nas membranas celulares, alterando sua conformação e causando danos diretos

às células. O H_2O_2 , entretanto, não é considerado um radical livre, mas tem grande atuação deletéria para a célula, estando ligado à produção direta do OH (MAIA; BICUDO, 2009).

As técnicas de congelamento contribuem para produção endógena e exógena de Espécies Reativas de Oxigênio, (ROS, do inglês Reactive Oxygen Species), que resultam em danos celulares, tendo um impacto negativo na qualidade espermática pós-descongelamento (SETYAWAN et al., 2016). Esse estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre produção de ROS e sua posterior eliminação por mecanismos antioxidantes, gerando assim um acúmulo de ROS na célula (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Em cães, níveis elevados de ROS, associados a uma baixa atividade antioxidante, estão relacionados a teratozoospermia (alterações elevadas na morfologia espermática) e oligozoospermia (redução na concentração espermática) (KODERLE; AURICH; SCHAFER-SOMI, 2009).

As células espermáticas sofrem com o estresse oxidativo principalmente porque sua membrana é composta por grandes quantidades de ácidos graxos, que facilita a ação de agentes oxidantes, o que deixa a célula mais susceptível à peroxidação lipídica (KODERLE; AURICH; SCHAFER-SOMI, 2009; SILVA et al., 2011). O excesso de ROS pode inibir a ação antioxidante oriunda do plasma seminal, devido ao volume reduzido do citoplasma, deixando o espermatozóide ainda mais predisposto à ação oxidante (MAIA; BICUDO, 2009). Além disso, os níveis fisiológicos de antioxidantes nos espermatozoides muitas vezes não são suficientes para protegê-lo do estresse oxidativo durante o processo de congelamento (LUCIO et al., 2016; SUCCU et al., 2011).

Um exemplo de combate aos radicais livres e posterior redução do estresse oxidativo é a atuação do sistema de defesa antioxidante de forma enzimática, incluindo catalase (CAT), glutatona peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD), que regulam os níveis de ROS para manter a homeostasia, amenizando assim o estresse oxidativo (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

A ação dessas enzimas no controle de radicais livres está relacionada com sua localização na célula. A enzima SOD1 (Cu, Zn-SOD) neutraliza o radical superóxido no citoplasma, enquanto SOD2 (Mn-SOD) é o principal sequestrador desse radical na região mitocondrial. Já CAT está localizada principalmente nos peroxissomos e catalisa

a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2), o que impede que o radical hidroxila ($OH\cdot$) seja formado a partir do peróxido de hidrogênio (BONNEFONT-ROUSSELOT; COLLIN, 2010; VALENÇA; GUERRA, 2007).

As reações de ROS sobre os lipídeos da membrana celular são conhecidas como peroxidação lipídica e, quando o ácido aracdônico sofre peroxidação, é formado o malondialdeído (MDA), que é amplamente utilizado como um biomarcador do estresse oxidativo (TSIKAS, 2017). Geralmente, sua avaliação é dada por reação do ácido tiobarbitúrico com produtos de oxidação lipídica (LUCIO et al., 2016; TSIKAS, 2017).

Quando são formadas ROS, um estresse oxidativo é gerado, e este pode ser amenizado quando há presença de certos componentes antioxidantes no plasma seminal, ou quando esses antioxidantes são acrescentados ao sêmen no momento do resfriamento ou criopreservação (VALENÇA; GUERRA 2007).

Os antioxidantes não devem eliminar totalmente as ROS, pois são necessárias, em níveis normais, para diversas funções celulares (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; SETYAWAN et al., 2016). Portanto, manter os níveis fisiológicos de ROS e prevenir o estresse oxidativo são critérios importantes na seleção de antioxidantes para uso em técnicas *in vitro* como a criopreservação de sêmen (SETYAWAN et al., 2016).

A adição de antioxidantes no processo de congelamento de sêmen pode ser uma alternativa para minimizar os danos celulares relacionados com produção excessiva de radicais livres, como danos no DNA e na membrana plasmática através da peroxidação lipídica, com conseqüente perda de sua integridade, viabilidade e produção de energia, diminuição da capacidade fertilizante e aumento de apoptose celular (FINKEL; HOLBROOK, 2000; LUCIO et al., 2016; MAIA; BICUDO, 2009).

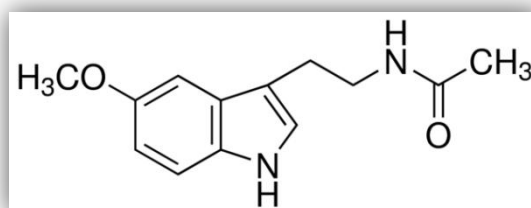
Segundo Setyawan et al. (2016), são relatados o uso de agentes antioxidantes no resfriamento e congelamento de sêmen canino, como vitamina E e C, dimetilsulfóxido, taurina, hipotaurina, espermina e N-acetilcisteína. Os autores analisaram a ação antioxidante da espermina, que é um derivado da espermidina, encontrada em plasma seminal de ratos e humanos, quando acrescentada à protocolos de congelamento de sêmen canino. Diferentes concentrações de espermina, com grupos com 0,1M, 1,0M, 5,0M e 10,0M e um grupo controle sem adição de espermina foram testadas. Como

resultado, os autores concluíram que a concentração de 5,0M de espermina teve melhores resultados na qualidade do sêmen e também na expressão gênica relacionada com apoptose e estresse oxidativo. Entretanto, a concentração máxima de 10,0M pode trazer efeitos deletérios para o sêmen.

2.2. Melatonina e seu potencial antioxidante

A melatonina é um hormônio secretado pela glândula pineal e por vários outros tecidos do organismo, e tem como fórmula química N-acetyl-5-methoxytryptamine (FIGURA 1). É sintetizada do triptofano quando é transformado em serotonina, que posteriormente é convertida em melatonina por um processo de várias etapas, envolvendo principalmente as enzimas serotonina-N-acetiltransferase e hidroxindole-O-metiltransferase (CLAUSTRAT; LESTON, 2015).

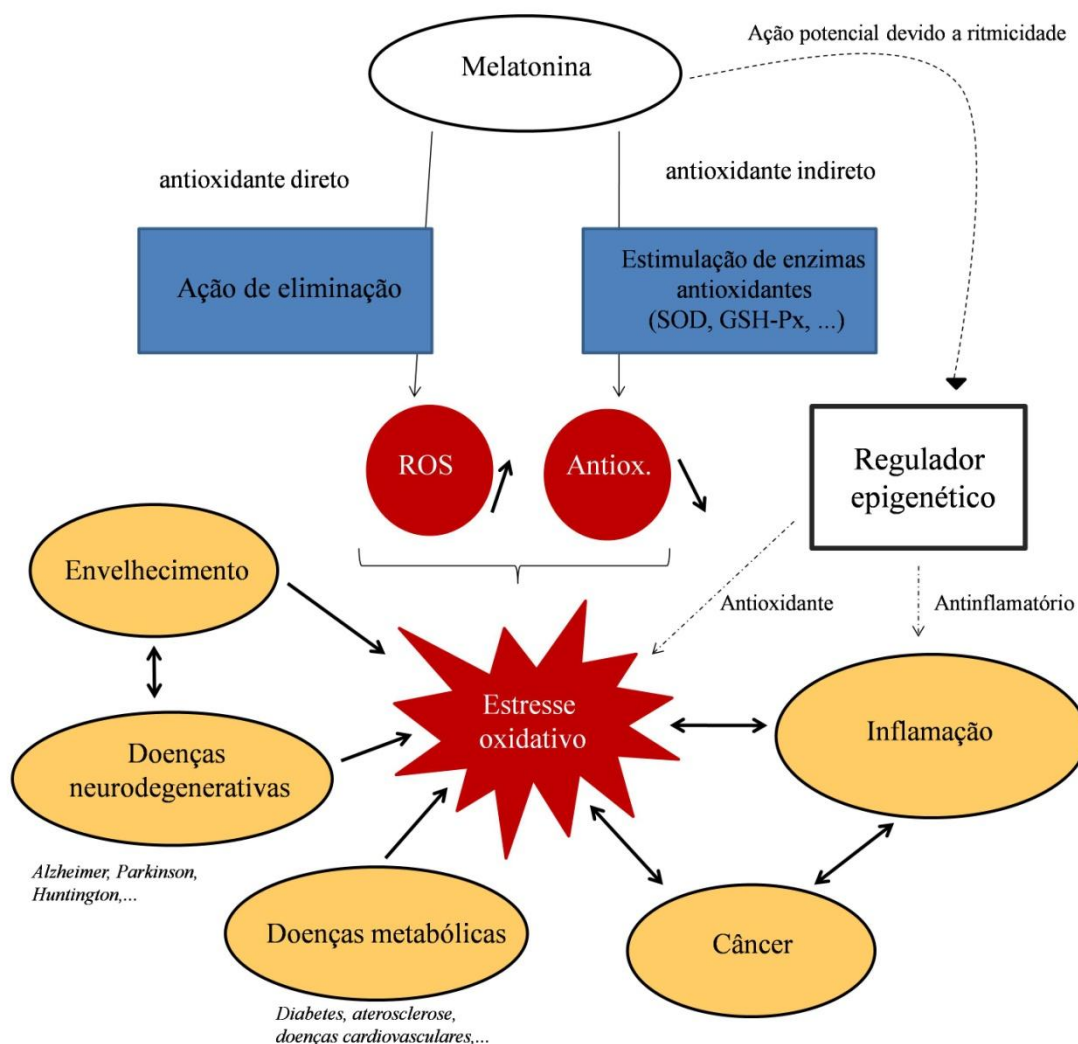
Figura 1 – fórmula química da melatonina



Fonte: Sigma-Aldrich

A melatonina tem um importante papel em inúmeros mecanismos fisiológicos, como controle sazonal da reprodução devido ao fotoperíodo, além de efeitos no sistema nervoso, mecanismos de defesa imune e também ritmo cardíaco (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; EGERSZEGI et al., 2014). Em humanos, sua ação como anti-inflamatório e antioxidante já foi observada, estando diretamente relacionada com o controle dos níveis de ROS e estímulo de enzimas antioxidantes, interferindo no estresse oxidativo, que está indiretamente ligado a doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, metabólicas, câncer e envelhecimento (BONNEFONT-ROUSSELOT; COLLIN, 2010).

Figura 2 –ações da melatonina no estresse oxidativo e suas aplicações em doenças humanas e envelhecimento



Legenda: GSH-Px – glutathiona peroxidase; ROS – do inglês reactive oxygen species; SOD - superóxido dismutase.

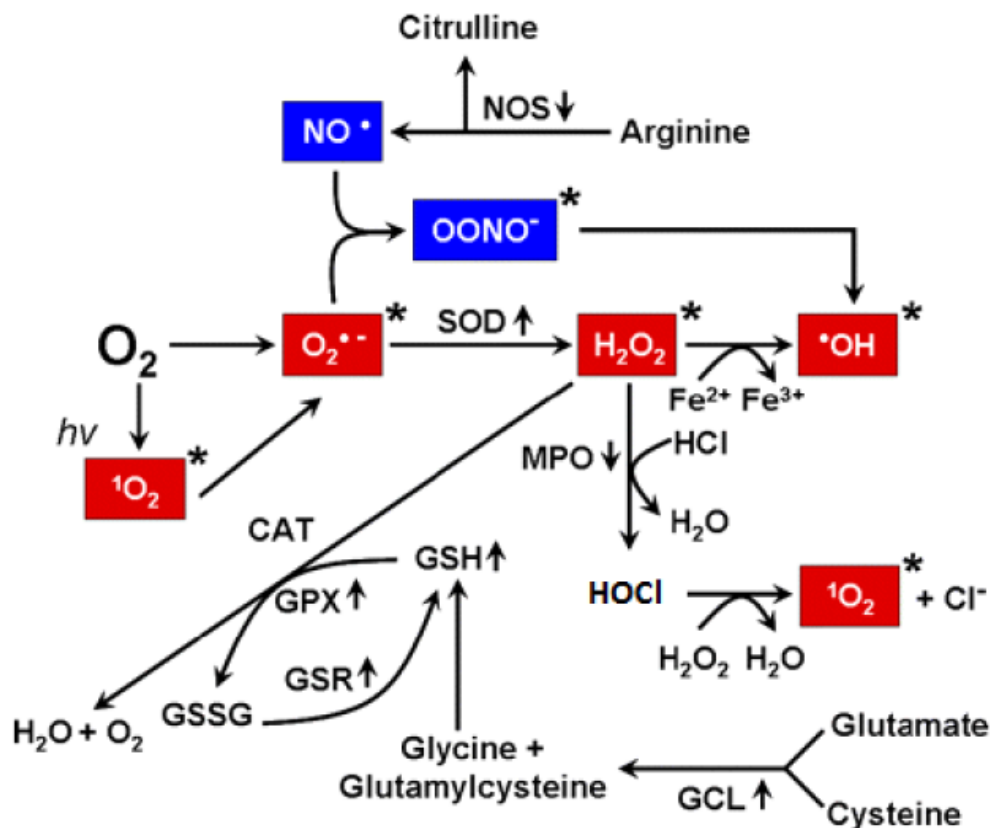
Fonte: Adaptado e traduzido de Bonnefont-Rousselot e Collin, 2010.

No que se diz respeito à atuação na reprodução de machos, a melatonina atua como protetor testicular, regulador da secreção de testosterona e também tem influência na qualidade espermática, em ambos casos devido seu potencial antioxidante em diversas espécies, incluindo humanos (LI; ZHOU, 2015).

A melatonina também é um poderoso agente antioxidante e antiapoptótico, que, devido à sua eliminação direta de tóxicos derivados do oxigênio e sua capacidade de reduzir a formação de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS), previne danos celulares tanto oxidativos quanto nitrosivos (CRUZ et al., 2014), atuando através do

aumento dos níveis de algumas enzimas antioxidantes (FIGURA 3) como catalase, superóxido dismutase e glutaciona peroxidase (KLESZCZYNSKI et al., 2018).

Figura 3 – vias de ativação de enzimas antioxidantes através da melatonina



Legenda: Em vermelho: reagentes à base de oxigênio. Em azul: reagentes à base de nitrogênio. *: reagentes eliminados diretamente pela melatonina; (↑): enzimas antioxidantes estimulados pela melatonina; (↓) enzimas pró-oxidativas inibidas pela melatonina. GSH: glutaciona; GSR: glutaciona redutase; GPX: glutaciona peroxidase; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; MPO: mieloperoxidase; GCL: glutamylcisteíniligase; O₂: oxigênio molecular; O₂^{••}: radical superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito; OH⁻: radical hidroxila; GSSG: glutaciona oxidada; H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

Fonte: Reiter et al., 2009.

Níveis elevados de radicais livres como H₂O₂, radical superóxido e OH⁻, assim como de RNS como óxido nítrico (NO) e ânion peroxinitrito (ONOO⁻) causam impacto direto nas células, sobretudo em atividades reprodutivas como qualidade do sêmen, capacidade fertilizante e desenvolvimento embrionário (PLESSIS; HAGENAAR; LAMPIAO, 2010). De acordo com sua atividade antioxidante, a melatonina desempenha um importante papel de neutralizador de OH⁻, NO, ONOO⁻, ácido peroxinitroso e H₂O₂ (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

As ações da melatonina são biologicamente possíveis devido sua ligação com receptores de membrana do tipo 1 e 2 (MT1 e MT2), ou através de mecanismo independente do receptor (KLESZCZYNSKI et al., 2018). Com a eliminação dos radicais livres, a melatonina cumpre um importante papel de elevar a resistência da membrana celular, pois consegue estabilizar sua fluidez (REITER, 2009). Além disso, consegue também atuar nas mitocôndrias, estabilizando as membranas internas, protegendo inclusive o DNA mitocondrial devido a ação antioxidante contra ROS e RNS (CARPENTIEI et al, 2012).

De acordo com Martín-Hidalgo et al. (2011), diluidores para sêmen suíno compostos por melatonina como opção de antioxidante já são analisados como alternativas para reduzir o estresse oxidativo sofrido pelas células espermáticas. Em um estudo conduzido por Ashrafi, Kohram e Ardabili (2013), foram testados os efeitos antioxidantes da melatonina sob a qualidade espermática do sêmen criopreservado de touros, nas doses de 0, 0.1, 1, 2, 3 e 4 mM. Para os autores, o sêmen teve um aumento de sua viabilidade quando acrescentado 1mM ou 2mM. Entretanto, os valores foram inferiores quando sêmen foi congelado com a concentração de 4mM.

Succu et al. (2011), testaram a hipótese de haver um efeito protetor da melatonina no sêmen criopreservado de carneiro, melhorando assim sua viabilidade no pós-descongelamento. Foram adicionadas cinco concentrações diferentes de melatonina, sendo 0.001, 0.01, 0.1, 1, e 10 mM, e um grupo controle sem adição do antioxidante. O sêmen congelado com 1mM de melatonina obteve altas taxas de viabilidade, com maiores porcentagens de motilidade total e progressiva, maior integridade de DNA e uma maior concentração de ATP intracelular, quando comparados com o grupo controle. Para os autores, existe um resultado benéfico da ação antioxidante da melatonina no sêmen congelado de carneiro, mas esse efeito positivo é dose-dependente, já que na maior dose (10mM) de melatonina os resultados foram inferiores (SUCCU et al., 2011).

Em humanos, a melatonina acrescentada ao plasma seminal na concentração de 1mM é capaz de melhorar a qualidade do sêmen (ORTIZ et al., 2010). Para os autores, a suplementação com melatonina pode ser amplamente explorada como um recurso para solucionar os casos de infertilidade masculina e também como forma de potencializar os resultados positivos das técnicas de reprodução humana assistida.

No congelamento de sêmen de espermatozóide epididimário canino, a dose de 1mM de melatonina foi testada por Varesi et al. (2014), adicionada ao meio de diluição do sêmen no protocolo de criopreservação. Os autores não observaram alterações na motilidade e na morfologia espermática, e nem tampouco no índice de fragmentação do DNA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de congelamento de sêmen canino teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras sob protocolo nº 005/18 em 10 de maio de 2018, com vigência até 14 de maio de 2020.

3.1. Modelo animal

Foram utilizados seis cães machos de companhia, pertencentes à tutores da comunidade, da raça Bulldog Francês, com maturidade sexual e idade entre dois e cinco anos (FIGURA 4). Os animais foram submetidos a uma avaliação prévia com anamnese, exame físico e exame andrológico completos, onde foram avaliadas características funcionais e morfológicas de todo o trato reprodutivo, além de confirmada a qualidade espermática dos mesmos.

Figura 4 – cão macho da raça Bulldog Francês



Fonte: da autora, 2019.

Na triagem dos animais, o sêmen foi coletado por manipulação digital (GOERICKE-PESCH et al., 2015; KODERLE; AURICH; SCHAFER-SOMI, 2009; LUCIO et al., 2016) e foi submetido por análise imediata, sendo que apenas aqueles que se encaixaram nos padrões normais foram admitidos no experimento, com motilidade maior que 70%, morfologia normal maior que 80% e concentração espermática mínima de 150×10^6 /ml (CBRA, 2013).

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Reprodução, no Setor de Fisiologia e Farmacologia Veterinária, do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal de Lavras.

3.2. Congelamento do sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas a cada 15 dias, totalizando três coletas por animal, e os tratamentos foram distribuídos entre as coletas realizadas. Foi padronizado o volume de 1ml de sêmen em cada coleta, dividido em duas alíquotas de 0,5ml cada, de forma que fossem realizados dois tratamentos por coleta.

Apenas a segunda fração, que constitui da porção rica em espermatozoides do ejaculado, foi utilizada para o congelamento, sem passar por centrifugação (KARGER et al., 2016; KHAN et al., 2017; KODERLE; AURICH; SCHAFER-SOMI, 2009; MOURA et al., 2015). Segundo Koderle (2009) o sêmen tem melhores resultados no pós-descongelamento quando não passa por centrifugação.

3.2.1. Diluidor e crioprotetor

Para o congelamento de sêmen foi preparada uma primeira solução composta por 0,328g de Tris (hidroximetil)-aminometano (Sigma-Aldrich), 0,178g de ácido cítrico e 0,125g frutose em 100ml de água deionizada. O diluidor foi então formado por

80% dessa primeira solução e 20% de gema de ovo (KHAN et al., 2017; MOURA et al., 2013; SÁNCHEZ-CALABUIG et al., 2017).

O diluidor previamente aquecido em banho-maria à temperatura de 37°C foi acrescentado à alíquota de sêmen na proporção de 1:1 (v/v) (KARGER et al., 2016; SÁNCHEZ-CALABUIG et al., 2017; VAN DEN BERGHE et al., 2018). O crioprotetor utilizado foi etilenoglicol em uma dose de 5% do diluidor (ROTA et al., 2010; SETYAWAN et al., 2015). Este foi acrescentado de forma individual em cada alíquota do sêmen, sendo o veículo de diluição para a melatonina.

3.2.2. Adição de melatonina

A melatonina utilizada foi da marca Sigma-Aldrich, lote SLBQ9501V, sendo adicionada ao sêmen em cinco concentrações diferentes, sendo um grupo controle sem adição de melatonina (T0), e os demais grupos com adição de 1 mM (T1), 1,5 mM (T2), 2 mM (T3), 2,5 mM (T4) e 3 mM (T5). Toda manipulação da melatonina, desde a pesagem até sua adição no congelamento do sêmen foi feita ao abrigo de luz.

Para distribuir os tratamentos entre as coletas realizadas, os animais foram divididos igualmente em dois grupos de três animais cada (G1 e G2), e a cada semana um grupo foi atendido. A divisão dos tratamentos foi realizada de forma aleatória (TABELA 1), e as coletas do sêmen realizadas a cada 15 dias. Dessa forma, todos os animais tiveram o sêmen congelado em todos os tratamentos.

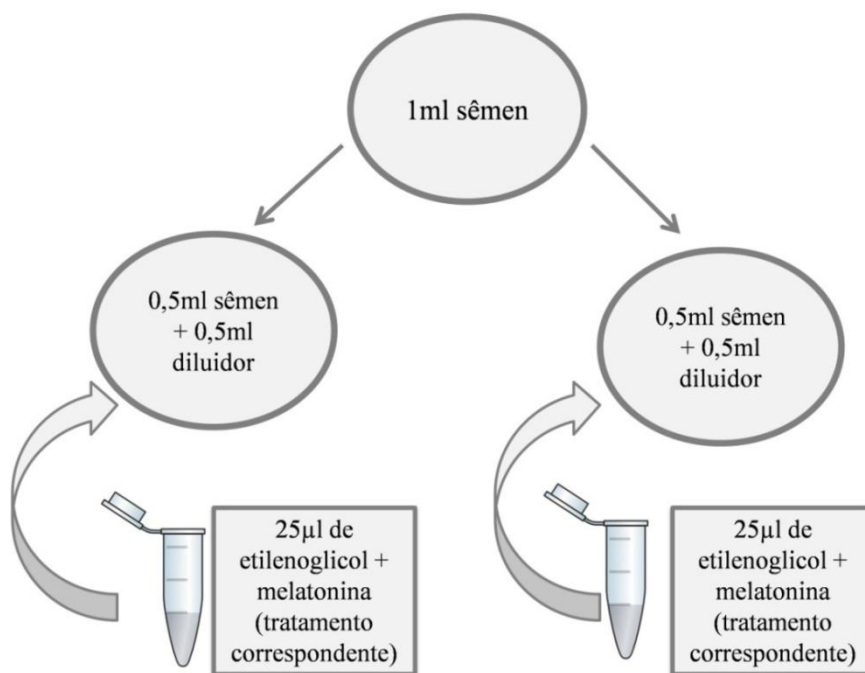
Tabela 1 - distribuição dos tratamentos por grupo animal ao longo do experimento

Período	Grupo	Tratamentos	
Semana 1	G1	T4	T3
Semana 2	G2	T2	T4
Semana 3	G1	T5	T0
Semana 4	G2	T1	T5
Semana 5	G1	T1	T2
Semana 6	G2	T0	T3

Fonte: da autora, 2019

A adição de melatonina foi feita de forma individual em cada alíquota de sêmen, sendo diluída diretamente no crioprotetor etilenoglicol no momento de ser adicionada à amostra (FIGURA 5).

Figura 5 – divisão do sêmen entre os tratamentos a cada coleta



Fonte: da autora, 2019

O cálculo da quantidade de melatonina a ser adicionada foi feito de acordo com a fórmula:

$$C = \frac{m}{MM \times V_t}$$

Onde:

C = concentração (M) de melatonina utilizada, de acordo com cada tratamento

m = quantidade (g) de melatonina a ser acrescentada na amostra

MM = massa molecular da melatonina (232,28 M – Sigma-Aldrich)

V_t = volume total da amostra (1,025 ml).

O volume total de cada amostra será dado pelo somatório: 0,5ml de sêmen + 0,5ml de diluidor + 0,025ml etilenoglicol (5%), totalizando 1,025ml.

Dessa forma, a quantidade de melatonina acrescentada em cada alíquota por tratamento foi calculada, sendo que em T1 foi acrescentada 0,24 mg, T2 0,35 mg, T3 0,47 mg, T4 0,59 mg, T5 0,71 mg, e T0 o grupo controle sem adição de melatonina. Todas as doses de melatonina foram previamente pesadas e separadas em tubos identificados de acordo com cada tratamento e para cada amostra de sêmen, mantidas congeladas entre 0 e -20°C, conforme recomendações do fabricante.

3.2.3. Congelamento e descongelamento do sêmen

Após diluição do sêmen e acréscimo da melatonina diluída no crioprotetor, cada amostra foi refrigerada por uma hora, até atingir a temperatura de 4°C (KARGER et al., 2016; LUCIO et al., 2016). Em seguida, foram envasadas em palhetas estéreis de 0,25ml e mantidas a 4 cm do vapor de nitrogênio por 10 minutos (BELALA et al., 2016; ORTIZ et al., 2017; VARESI et al., 2014).

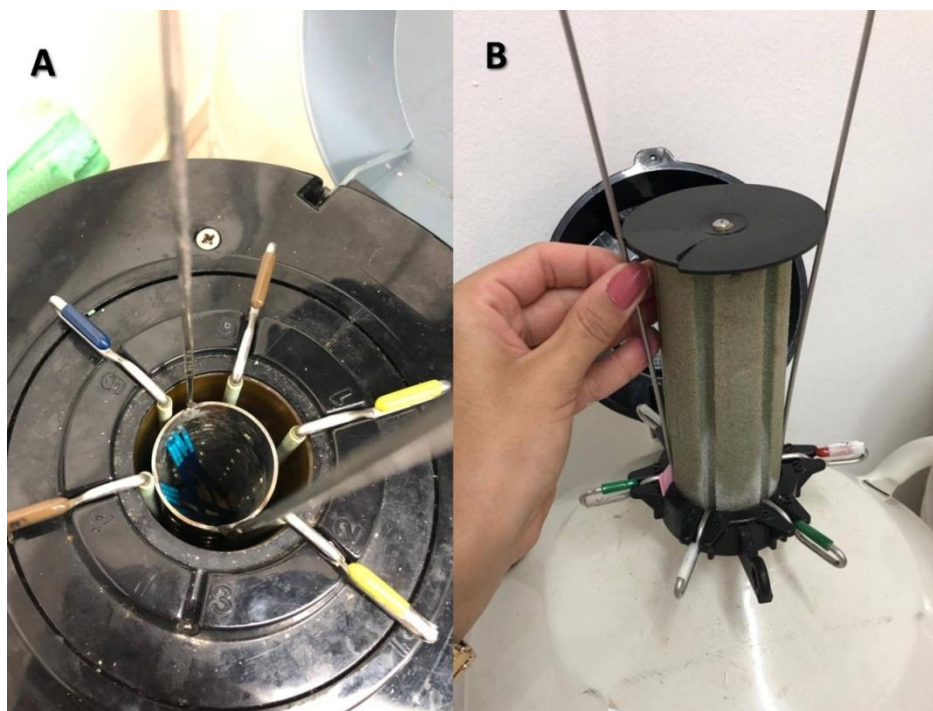
Para manter as palhetas sob o vapor de nitrogênio líquido, foi utilizado um instrumento inovador, desenvolvido na Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária, pela equipe deste trabalho. Trata-se de um adaptador feito em aço inoxidável (FIGURA 6 e 7) que permite que o sêmen seja mantido no vapor do nitrogênio dentro do próprio botijão, evitando o desperdício de nitrogênio quando usadas as tradicionais caixas de isopor (FIGURA 8), tanto para despejar o nitrogênio líquido para a caixa (A) quanto para recolocar o nitrogênio líquido no botijão (B). dessa forma, a técnica de congelamento se torna mais fácil, mais segura pois elimina o contato direto com nitrogênio líquido, além de reduzir seu desperdício. Esse canister encontra-se em pedido de depósito de patente junto ao Núcleo de Inovação Tecnológica – NINTEC/UFLA, sob protocolo nº 171/2019.

Figura 6 – adaptador para manter palhetas acima do vapor de nitrogênio dentro do próprio botijão, em protocolos de congelamento rápido de sêmen.



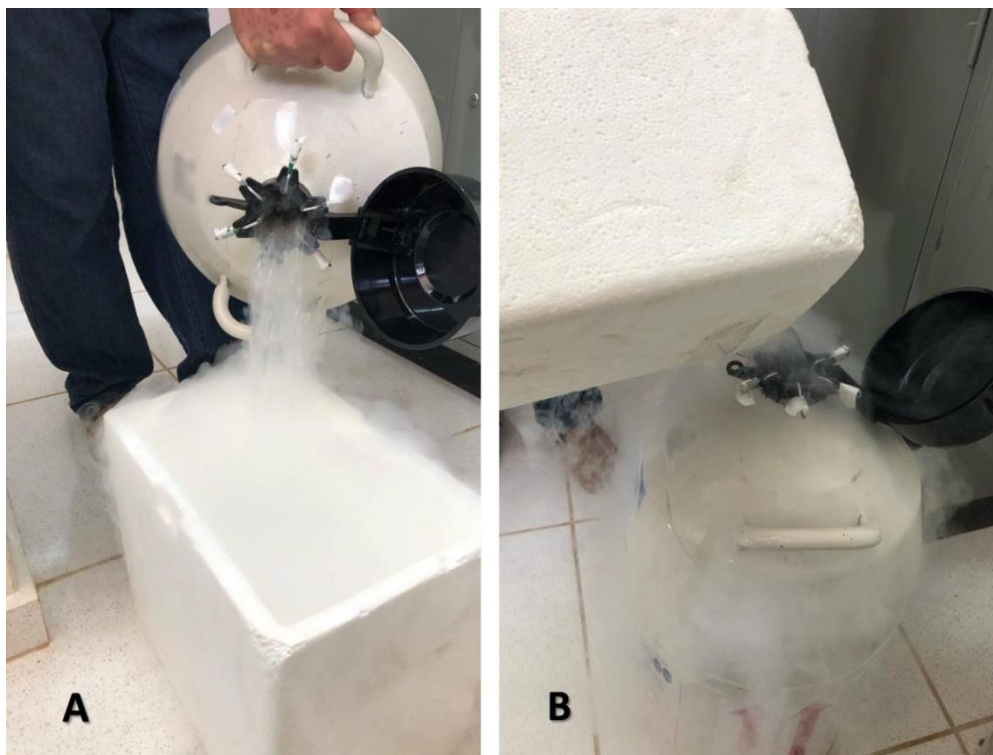
Fonte: da autora, 2019

Figura 7 – posicionamento do adaptador dentro do botijão, para manter sob o vapor de nitrogênio as palhetas envasadas com sêmen para congelamento



Fonte: da autora, 2019

Figura 8 – uso de caixas de isopor para manter palhetas sob vapor de nitrogênio líquido em protocolos de congelamento rápido de sêmen



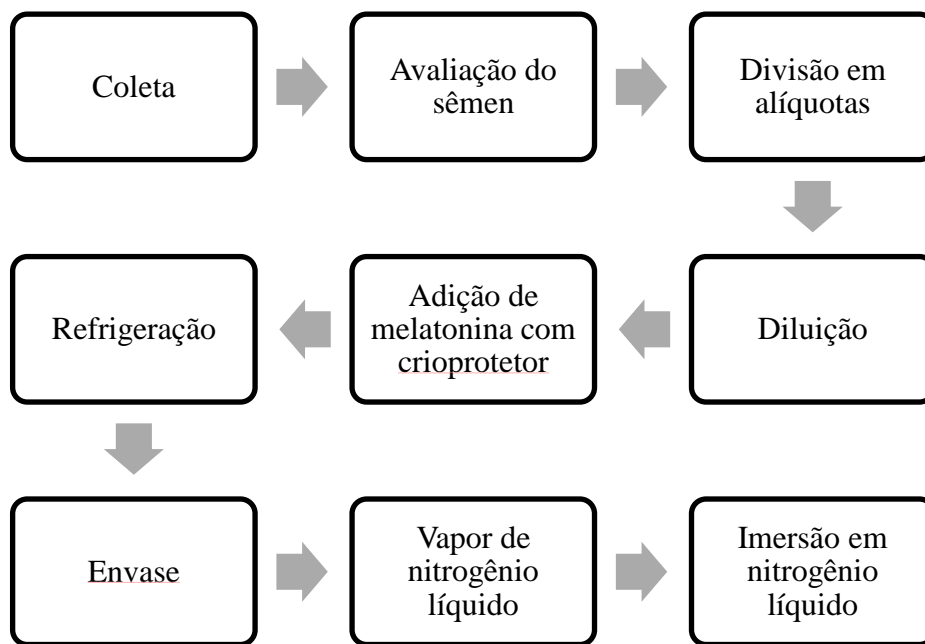
Legenda: A) colocação do nitrogênio líquido no interior da caixa de isopor para que sejam posicionadas, acima do vapor de nitrogênio, as palhetas contendo sêmen envasado para congelamento. B) nitrogênio líquido sendo vertido ao botijão após seu uso em caixa de isopor.

Fonte: da autora, 2019

Após este procedimento, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido para congelamento a -196°C (ORTIZ et al., 2017; VARESI et al., 2014).

Em todas as atividades foram seguidos os mesmos passos para congelamento do sêmen, realizados de forma criteriosa para todas as coletas (FIGURA 9).

Figura 9 – sequência de atividades executadas para o congelamento do sêmen



Fonte: da autora, 2019

Em um tempo de sete dias após o congelamento, as palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 1 minuto (KARGER et al., 2016; MOURA et al., 2013; ROTA et al., 2010), para posterior avaliação do sêmen descongelado.

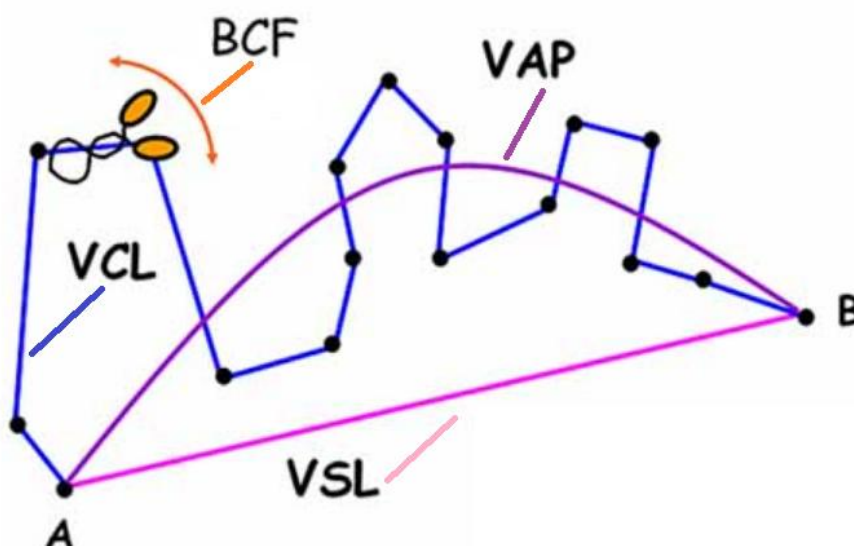
3.3. Avaliação espermática

Tanto o sêmen fresco quanto o sêmen descongelado passaram por uma avaliação completa da qualidade espermática, avaliando-se parâmetros cinéticos e morfológicos, concentração espermática e integridade de membrana. O sêmen descongelado também teve avaliação dos níveis de SOD, MDA, CAT, pois são potenciais marcadores de estresse oxidativo, para fins de comparação dos efeitos antioxidantes da melatonina nos diferentes tratamentos.

3.3.1. Cinética espermática

Para avaliação da cinética do sêmen fresco e descongelado foi utilizado o Software CASA-SCA motility, sendo avaliados os parâmetros: velocidade média do caminho (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), batida de frequência cruzada (BCF), motilidade total e motilidade progressiva, conforme esquematizado na Figura 10 (DORADO et al., 2011; KODERLE, AURICH, SCHAFER-SOMI, 2009; LUCIO et al., 2016).

Figura 10 – caracterização das velocidades cinéticas do sêmen avaliadas pelo software CASA SCA-motility



Legenda: VAP - velocidade média do caminho; VCL - velocidade curvilínea; VSL - velocidade em linha reta; BCF - batida de frequência cruzada.

Fonte: adaptado de Luconi, Forti e Baldi (2006).

Foi descongelado o sêmen de todos os animais, em todos os tratamentos realizados, e as alíquotas foram diluídas em uma proporção de 1:5 na primeira solução do diluidor, previamente aquecida a 37°C, com osmolaridade corrigida para 300 mOsm. As amostras foram avaliadas em duplicatas, com análise de cinco campos em cada avaliação, totalizando 10 observações por amostra.

3.3.2. Concentração espermática

A concentração espermática foi realizada através de contagem de células em Câmara de Neubauer, com uma alíquota de 10µl de sêmen previamente fixado em formol-citrato, numa escala de 1:100 (GOERICKE-PESCH et al., 2015; KARGER et al., 2016). Após a contagem, foi utilizada a fórmula para determinação da concentração espermática de acordo com o Manual de Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA 2013).

$$n^{\circ} \text{ células} = \frac{A}{\frac{1}{10} \times \frac{N}{25} \times \frac{1}{B}}$$

Onde:

A – número de espermatozóides contados

B – fator de diluição utilizado (como exemplo: 1:20, 1:50, 1:100)

N – número de quadrados contados

3.3.3. Integridade de membrana

A integridade de membrana foi avaliada por coloração com eosina-nigrosina, imediatamente após descongelamento, com adição de 5µl de corante em 10µl de sêmen, e preparo em esfregaço com lâmina de vidro previamente aquecida a 37°C (KARGER et al., 2016; TESI et al., 2018). Foi realizada leitura em duplicata da lâmina em microscópio óptico, com contagem de 100 células em cada leitura, ao longo de todos os campos da lâmina, estabelecendo-se a porcentagem de células com membrana danificada.

3.3.4. Morfologia espermática

Para avaliação da morfologia espermática foi utilizada coloração de Rosa de Bengala (TESI et al., 2018; VARESI et al., 2014), sendo adicionado 3µl de corante em 10µl de sêmen fixado em formol citrato, com preparo em lâmina úmida, com sobreposição de lamínula na solução sêmen-corante. Os parâmetros foram avaliados em microscópio óptico, divididos em aspectos morfológicos do acrossoma, da cabeça, da peça intermediária e cauda dos espermatozóides, divididos em defeitos maiores e menores (CBRA, 2013), com contagem em duplicata de 100 células no correr da lâmina.

Os defeitos menores são caracterizados por anormalidades morfológicas leves, que causam menos comprometimento funcional ao espermatozóide, sendo eles cabeça gigante, curta larga ou pequena, cabeça isolada normal, gota distal em peça intermediária, cauda dobrada ou enrolada na porção distal. Já os defeitos maiores são aqueles que causam grande perda funcional à célula, e são cabeça isolada anormal, cabeça piriforme, cabeça pequena anormal, gota proximal em peça intermediária ou peça intermediária rudimentar, cauda fortemente dobrada e formas teratológicas da cauda.

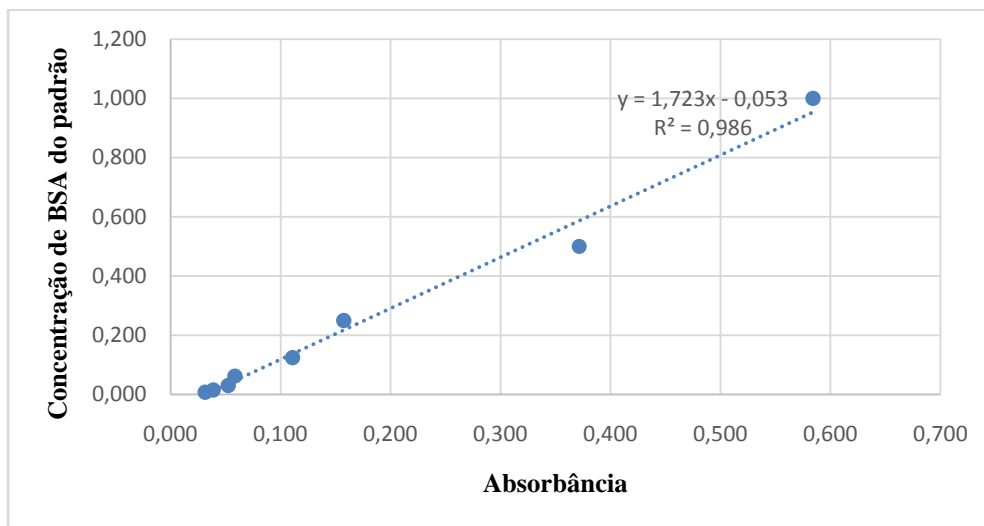
3.3.5. Proteína total

A proteína total da amostra foi determinada para se estabelecer os níveis de SOD, MDA e CAT que são dados por U enzima/mg proteína. A determinação da quantidade de proteína foi feita segundo protocolo de Bradford (Sigma-Aldrich).

Foram adicionados na microplaca, em duplicata, 3µL de cada amostra e 297µL do reagente Bradford (Sigma-Aldrich) em cada poço para leitura de absorbância em espectrofotômetro de luz com comprimento de onda a 595 nm. Para cálculo da absorbância foi utilizado um padrão em diluição seriada, com oito concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA), em duplicata, nas concentrações de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,031 mg/ml, 0,0156 mg/ml, e 0,0078 mg/ml.

A partir da concentração e absorvância conhecida dos padrões de BSA, foi dada a curva de calibração (FIGURA 11) para determinar a concentração das proteínas nas amostras analisadas, com equação $y = 1,723x - 0,053$ ($r^2 = 0,986$), onde X é a absorvância obtida da amostra e Y é a quantidade, em mg, de proteína encontrada.

Figura 11 – curva de calibração para cálculo da concentração de proteína



Fonte: da autora, 2019.

Para evitar que a presença de gema de ovo no diluidor pudesse interferir na mensuração da proteína total do sêmen e, conseqüentemente, na mensuração da atividade enzimática, foi determinada a quantidade de proteína do meio de diluição, e esse valor foi descontado em todas as amostras.

3.3.6. Superóxido dismutase (SOD)

A análise de SOD foi mensurada segundo Dieterich et al (2000), baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido e do peróxido de hidrogênio e assim diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol.

Foram preparadas uma solução de pirogalol a 100 μM e outra solução de MTT a 1,25 Mm, ambas em tampão fosfato (validade máxima das soluções de 24 horas). Uma solução de tampão fosfato 50mM foi preparada a partir de uma solução A: 6,81g

K_2HPO_4 + 1000ml água e uma solução B: 8,9g Na_2HPO_4 + 1000ml água, sendo então misturadas as soluções A e B na proporção 1:1,5 v/v, com pH ajustado para 7,2.

Na microplaca para leitura de absorbância foram utilizados um padrão e uma amostra branca, ambos em duplicata, e nos demais poços as amostras analisadas também em duplicata, nas seguintes proporções:

- Branco – 0 μ L amostra + 144 μ L tampão + 6 μ L MTT + 0 μ L pirogalol
- Padrão – 0 μ L amostra + 129 μ L tampão + 6 μ L MTT + 15 μ L pirogalol
- Amostra – 30 μ L amostra + 99 μ L tampão + 6 μ L MTT + 15 μ L pirogalol

A microplaca foi incubada por cinco minutos a 37°C, no próprio espectrofotômetro, e após isso a reação foi interrompida com 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína⁻¹, e o cálculo da atividade enzimática foi dado por:

$$U \text{ SOD} = (\text{absorbância da amostra} \times 1 \text{ U SOD}) / \text{absorbância do padrão}.$$

3.3.7. Malondialdeído (MDA)

O MDA foi analisado com kit comercial QuantiChrom™ TBARS Assay Kit, BioAssay System. O teste teve como objetivo determinar quantitativamente a peroxidação lipídica por meio do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), por um ensaio colorimétrico e fluorométrico.

As amostras e soluções foram preparadas segundo instruções do fabricante, e a absorbância foi mensurada por espectrofotômetro a 535 nm.

3.3.8. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi mensurada segundo Aebi (1984), e a enzima foi determinada pela taxa de queda da absorbância da amostra por 60 segundos em reação

com peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Foram utilizados 10 μ l de amostras e 990 μ l de solução substrato a 0,03% de peróxido de hidrogênio 50mM em solução de tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH = 7,2), com leitura seriada em espectrofotômetro ($\lambda = 240$ nm), realizada a cada 15 segundos durante 60 segundos.

A mudança na absorbância por minuto foi estimada e a taxa da reação determinada através do coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio de 43,6 M/cm. A atividade específica foi reportada com U CAT/mg proteína (uma unidade é definida como 1 pmol H_2O_2 consumido por minuto).

3.4. Análise estatística

Os dados primeiramente foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e constatando normalidade os testes estatísticos realizados foram análise de variância ANOVA two way, para comparação entre as médias dos tratamentos avaliados e, quando observadas diferenças significativas, foi empregado o Teste Tukey ao nível de 5% de significância. Para os dados não-paramétricos, foi utilizado teste Kruskal-Wallis para teste de médias. Para os testes de correlação foi utilizado Teste de Correlação de Pearson a 5% de significância.

A análise dos dados foi realizada pelos softwares R e BioEstati 5.3, e os gráficos foram confeccionados pelo software GraphPad Prism.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação pré-experimental

No exame de triagem para admissão dos animais ao experimento, o sêmen dos animais foi avaliado, obtendo-se volume médio de sêmen coletado de 1,6ml ($\pm 0,56$), motilidade média 85% ($\pm 5\%$), vigor médio 3,6 ($\pm 0,51$), concentração média de 210 x 10⁶ espermatozoides/ml ($\pm 5,9 \times 10^6$), porcentagem média de células com membrana íntegra de 82% ($\pm 3\%$) e morfologia normal de 73% ($\pm 2\%$). Esses parâmetros

encontram-se dentro das exigências do CBRA, o que confirma a aptidão dos cães à atividade reprodutiva, mostrando que o sêmen tinha características satisfatórias para que pudesse ser utilizado para fins experimentais.

4.2. Cinética espermática

Os parâmetros cinéticos do sêmen fresco e descongelado estão descritos na Tabela 2. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o sêmen fresco e o sêmen congelado em todos os parâmetros avaliados. Entretanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os parâmetros cinéticos quando comparados os diferentes tratamentos no sêmen descongelado.

Tabela 2 – parâmetros cinéticos avaliados no sêmen fresco e no sêmen congelado com diferentes concentrações de melatonina

	Fresco	T0	T1	T2	T3	T4	T5
		0 mM	1,0 mM	1,5 mM	2,0 mM	2,5 mM	3,0 mM
Mot T	85,5 ^a	16,04	14,88	17,15	22,57	13,18	22,13
Mot P	41,32 ^a	1,38	2,22	2,35	3,8	1,95	3,5
VAP	69,91 ^a	37,15	38,97	41,21	42,66	37,09	43,07
VCL	123,61 ^a	76,38	76,16	74,87	85,54	68,76	83,66
VSL	40,60 ^a	20,31	23,35	24,55	23,61	19,88	25,17
BCF	13,42 ^a	8,75	13,25	12,89	11,67	9,68	13,31

Fonte: da autora, 2020.

Legenda: Teste de médias ANOVA two way a 5% de significância, comparado em linha. Mot T – motilidade total; Mot P – motilidade progressiva; VAP – velocidade média do caminho; VCL – velocidade curvilínea; VSL – velocidade em linha reta (VSL); BCF – batida de frequência cruzada.

Foi observada uma correlação positiva ($p < 0,05$) entre os parâmetros cinéticos avaliados pelo software CASA-SCA motility (taxas de motilidade, velocidade curvilínea – VCL, velocidade linear progressiva – VSL, velocidade média da trajetória - VAP e frequência do batimento cruzado – BCF). Entretanto, não houve correlação ($p > 0,05$) entre os dados relacionados à cinética do sêmen descongelado, segundo teste de correlação de Pearson.

Tabela 3 – Correlação entre parâmetros cinéticos do sêmen fresco pré-congelamento

	Mot T	Mot P	VAP	VCL	VSL	BCF
Mot T	1					
Mot P	0,53*	1				
VAP	0,95*	0,62*	1			
VCL	0,94*	0,57*	0,95*	1		
VSL	0,76*	0,41*	0,86*	0,72*	1	
BCF	0,56*	NC	0,69*	0,67*	0,74*	1

Fonte: da autora, 2020.

Legenda: Teste de Correlação de Pearson a 5% de significância. Mot T – motilidade total; Mot P – motilidade progressiva; VAP – velocidade média do caminho; VCL – velocidade curvilínea; VSL – velocidade em linha reta (VSL); BCF – batida de frequência cruzada.

4.3. Morfologia e integridade membrana

A morfologia espermática foi avaliada pós-descongelamento e não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre a porcentagem de células normais e de células com anormalidades morfológicas quando comparados os diferentes tratamentos e o grupo controle (TABELA 4). Em relação à integridade de membrana celular do sêmen descongelado, também não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) se comparados os tratamentos realizados (TABELA 4).

Tabela 4 – morfologia espermática e integridade de membrana de sêmen canino congelado com diferentes concentrações de melatonina

	Fresco	T0	T1	T2	T3	T4	T5
		0 mM	1,0 mM	1,5 mM	2,0 mM	2,5 mM	3,0 mM
Células normais (%)	79,35	75,63	75,83	79,16	76,66	78,38	75,33
Integridade de membrana (%)	89,13*	45,16	40,02	43,46	55,50	40,58	38,83

Legenda: Teste de médias ANOVA two way a 5% de significância, comparado em linha.

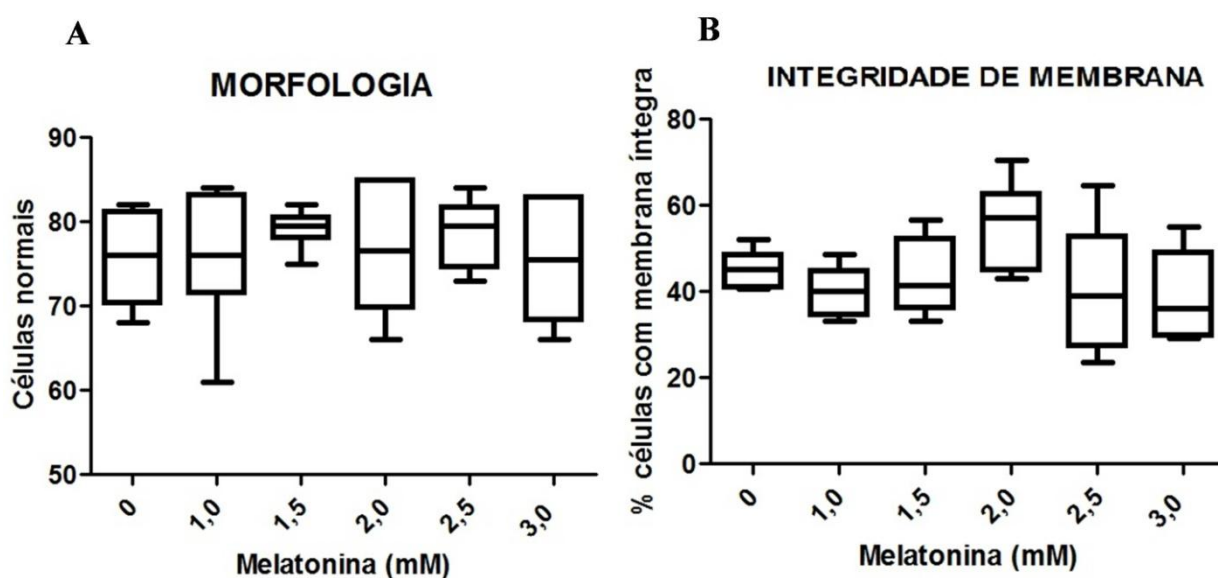
Fonte: da autora, 2020.

Em relação às alterações morfológicas encontradas, foi observada, em média, 11,25% de defeitos da cabeça, 9,32% de defeitos na cauda e 3,56% de feitos na peça intermediária dos espermatozóides, sem diferença significativa ($p>0,05$) entre elas.

Quando separados em defeitos maiores e menores, conforme classificação do CBRA (2013), foi encontrada uma média de $9,88\% \pm 3,21$ de defeitos maiores e $13,72\% \pm 4,43$ de defeitos menores.

A Figura 12 mostra, graficamente, a distribuição das médias de células morfolologicamente normais de acordo com cada tratamento, comparados com grupo controle (A) e a média do percentual de células com membrana íntegra (B).

Figura 12 – morfologia espermática (A) e integridade de membrana (B) de sêmen canino congelado com diferentes concentrações de melatonina

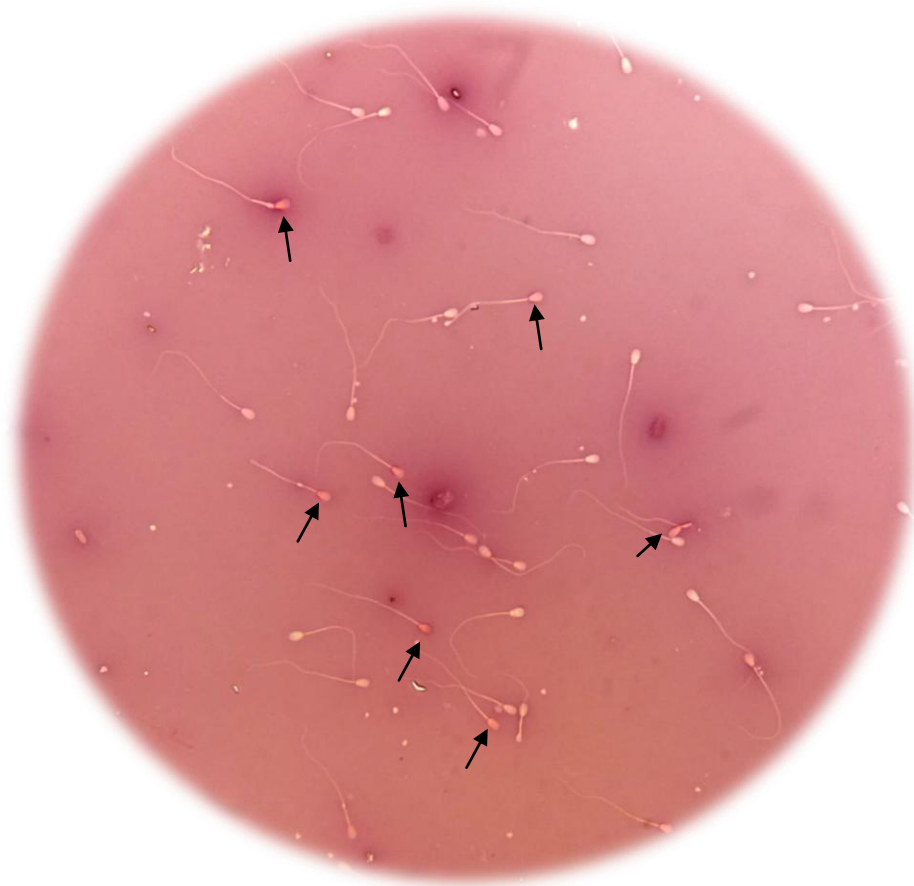


Fonte: da autora, 2020.

O sêmen fresco apresentou maior porcentagem de células com membrana íntegra ($p<0,05$) quando comparado com os grupos tratados com diferentes concentrações de melatonina. Entretanto, não houve diferença estatística ($p>0,05$) na quantidade de células com membrana celular íntegra entre os tratamentos. Na Figura 13 tem-se um exemplo de avaliação de integridade de membrana com coloração por eosina-nigrosina. As células apontadas pelas setas apresentam a cabeça corada, indicando que o corante conseguiu penetrar devido a alguma lesão de membrana, ao contrário das células com

membrana íntegra, que permanecem com a cabeça sem coloração pela falta de penetração do corante.

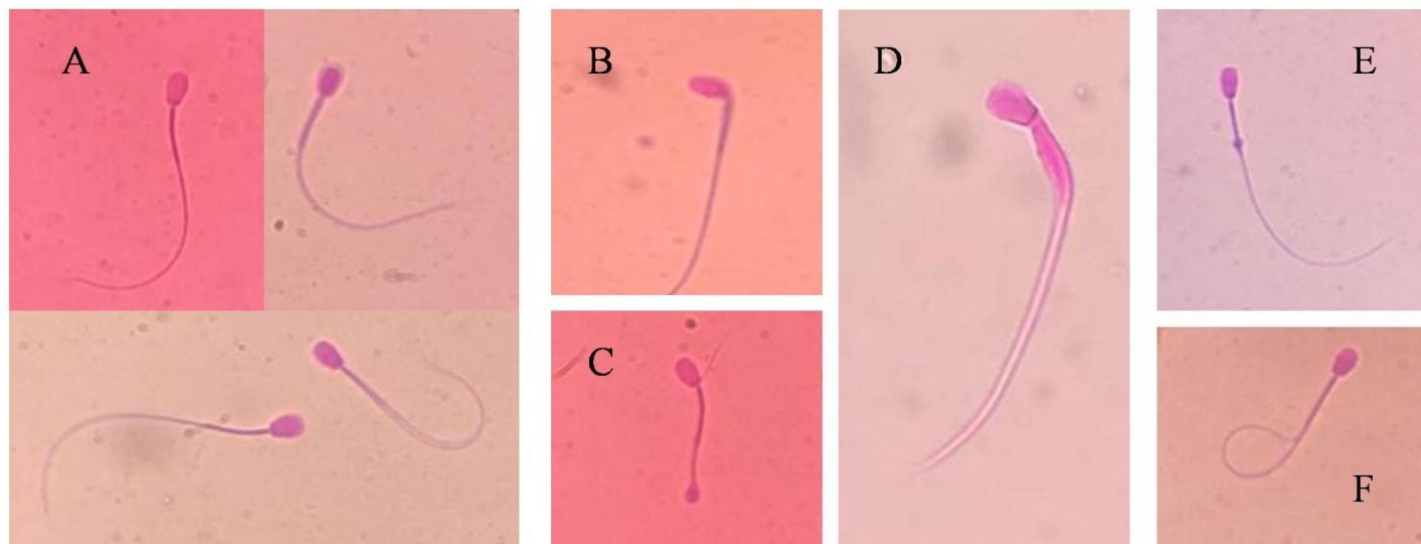
Figura 13 – avaliação da integridade de membrana com coloração eosina-nigrosina em amostras de sêmen canino congelado



Fonte: da autora, 2019.

Na Figura 14 estão exemplificados, em imagens, as células morfológicamente normais (A) e alguns defeitos morfológicos encontrados nas células espermáticas (B-E), sendo eles relacionados com cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozoides.

Figura 14 – avaliação da integridade de membrana com coloração eosina-nigrosina em amostras de sêmen canino congelado



Legenda: A – células morfologicamente normais; B – cabeça quebrada; C – cauda enrolada; D – peça intermediária degenerada; E – gota distal; F – cauda enrolada.

Fonte: da autora, 2019.

4.4. Proteína total

A proteína total das amostras foi mensurada, e os valores encontrados, em miligramas de proteína total foram de 14,223 mg em T0, 13,351 mg em T1, 13,796 mg em T2, 13,263mg em T3, 12,082mg em T4 e 13,7mg em T5. O diluidor utilizado para congelamento apresentou 9,77 mg de proteína total. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) da quantidade de proteína em miligramas entre os tratamentos e o grupo controle, sendo as médias comparadas pelo teste médias Anova two way a 5% de significância).

4.5. Estresse oxidativo

Após análise dos resultados dos níveis de CAT (U cat/mg proteína), SOD (U sod/mg proteína), e MDA (μM de MDA), não houve diferença significativa ($p>0,05$) quando comparado o sêmen congelado com diferentes concentrações de melatonina e o grupo controle (TABELA 5).

Tabela 5 – níveis de catalase, superóxido dismutase e malondialdeído em amostras de sêmen canino congelado com diferentes concentrações de melatonina

	T0	T1	T2	T3	T4	T5
	0 mM	1,0 mM	1,5 mM	2,0 mM	2,5 mM	3,0 mM
CAT	5,553	9,965	21,947	16,340	9,105	14,405
SOD	0,141	0,210	0,131	0,162	0,269	0,124
MDA	3,789	6,826	4,662	4,570	4,785	6,965

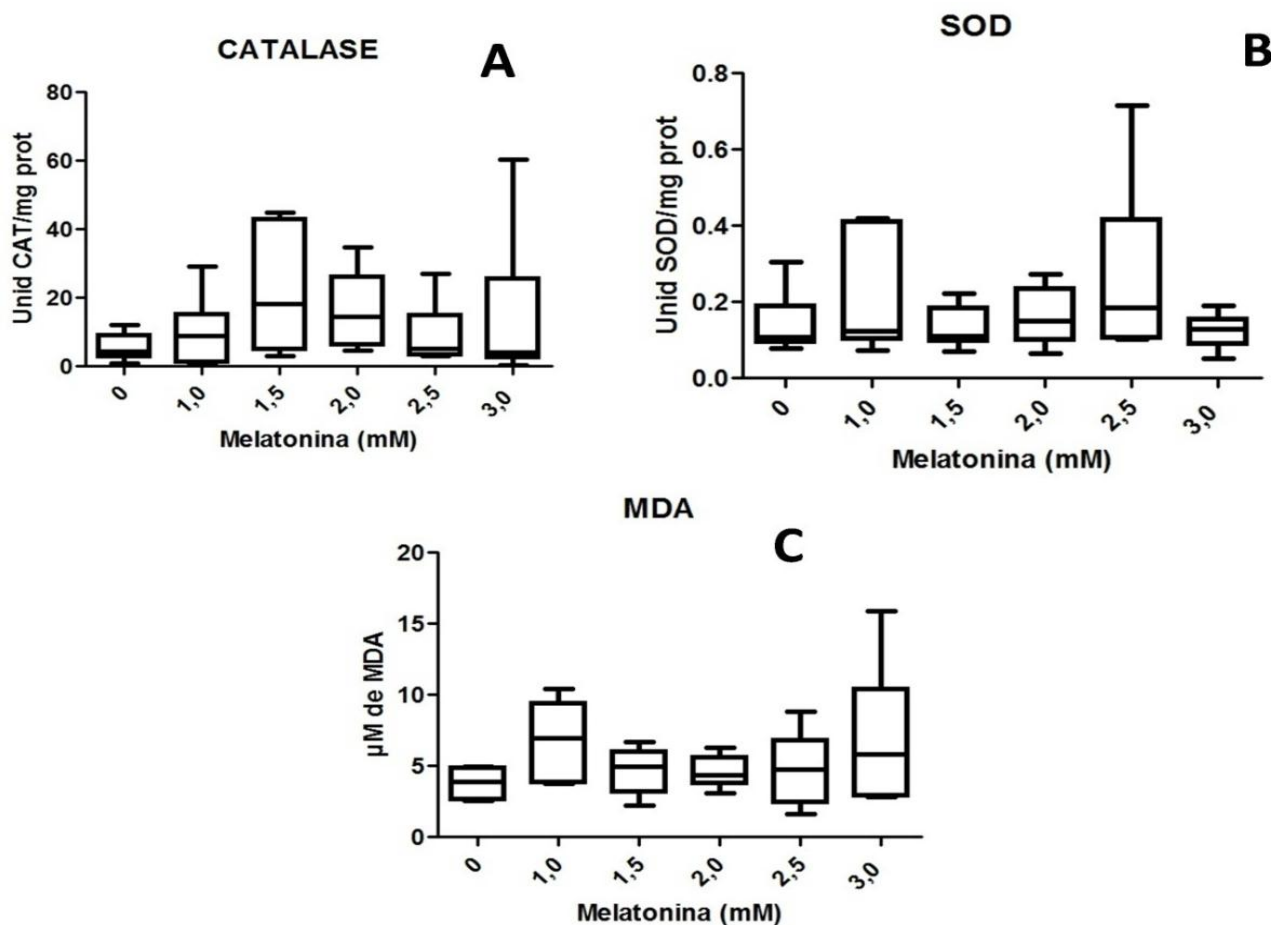
Fonte: da autora, 2020.

Legenda: Teste de médias Kruskal-Wallis a 5% de significância. CAT – catalase (U cat/mg proteína); SOD – superóxido dismutase (U sod/mg proteína); MDA – malondialdeído (μM de MDA).

Foi realizada uma Correlação de Pearson entre os valores de CAT, SOD, MDA, proteína total, níveis de melatonina (em mM) e concentração espermática. Entretanto, não foi encontrada nenhuma correlação significativa ($p>0,05$) entre esses valores.

Na Figura 15 estão representados os gráficos relacionados com a distribuição dos níveis de catalase, superóxido dismutase e malondialdeído, de acordo com os tratamentos instituídos com diferentes concentrações de melatonina comparados com grupo controle.

Figura 15 – níveis de catalase, superóxido dismutase e malondialdeído em amostras de sêmen congelado com diferentes concentrações de melatonina



Legenda: A - Níveis de catalase; B - superóxido dismutase (SOD) e C - malondialdeído (MDA).

Fonte: da autora, 2020.

5. DISCUSSÃO

A criopreservação de sêmen promove muitos benefícios na reprodução assistida, mas alguns danos celulares ocorrem devido a diversas reações inerentes ao processo de congelamento (KIM; YU; KIM, 2010; CHELUCCI et al., 2015; BELALA et al., 2016). Nós desenvolvemos e aplicamos o canister para manutenção do sêmen sobre o vapor de nitrogênio, trazendo uma nova perspectiva para o processo de congelamento, minimizando o desperdício de nitrogênio, eliminando o contato direto com esse agente corrosivo, e permitindo que essa etapa seja mais ágil, prática e de fácil execução. Com

esse instrumento, que está sob depósito de patente, nós pretendemos facilitar o congelamento de sêmen não só de cão, mas de diversas espécies que tenham demanda por essa técnica.

Nesse estudo buscou-se encontrar melhorias no protocolo de congelamento de sêmen canino, para que a perda na qualidade do sêmen descongelado seja a mínima possível, principalmente quando se pensa em danos celulares relacionados com estresse oxidativo. Com este trabalho pode-se realizar um protocolo satisfatório de congelamento e descongelamento voltado para cães da raça Bulldog Francês, além de permitir uma avaliação completa do sêmen fresco no software CASA-SCA motility, definindo os padrões cinéticos dessa raça em específico.

A qualidade do sêmen in natura utilizado para congelamento tem grande importância na qualidade do sêmen pós-descongelamento (CBRA, 2013; HIDALGO et al., 2015), e nos exames de avaliação espermática realizados neste experimento, previamente ao congelamento, o sêmen se mostrou com altos valores dos parâmetros cinéticos, morfologia, concentração e integridade de membrana, que reforça o princípio de que o congelamento só deve ser realizado se sêmen tem um mínimo de qualidade atestada.

No presente trabalho, quando avaliados os parâmetros cinéticos do sêmen fresco, anteriormente ao congelamento, no software CASA-SCA motility, os valores encontrados estavam de acordo com relatos na literatura sobre sêmen canino (KARGER et al., 2016; CHELUCCI et al., 2015). Uma correlação positiva ($p < 0,05$) foi encontrada entre todas variáveis analisadas pelo CASA-SCA motility no sêmen fresco, assim como Karger et al. (2016), o que reforça a hipótese de que os parâmetros que avaliam a cinética espermática estão altamente relacionados (taxas de motilidade, VCL, VSL, VAP e BCF), demonstrando que uma variação em um determinado parâmetro cinético possa ter influência sobre outro parâmetro analisado.

Sabe-se que ocorre uma diminuição significativa na qualidade do sêmen descongelado quando comparado com o sêmen fresco, principalmente quando se avalia motilidade total e progressiva e qualidade da movimentação espermática. (KIM; YU; KIM, 2010; SUCCU et al., 2011; BELALA et al., 2016), devido a fatores intrínsecos ao processo de congelamento do sêmen. Portanto, as diferenças encontradas nesse estudo,

quando comparada qualidade do sêmen canino fresco e descongelado, reforçam o que já foi observado em outros trabalhos envolvendo sêmen canino.

Os valores de motilidade total do sêmen descongelado, nos diferentes tratamentos, são condizentes com os dados encontrados por Succu et al. (2011), Lucio et al. (2016) e Lucio et al. (2016) que também encontraram cerca de 20% a 29% de motilidade no sêmen descongelado, sendo relatados até 11% de motilidade. Esses valores podem ser discordantes entre alguns estudos, conforme pequenas variações no protocolo de diluição utilizado, nível de crioprotetor adicionado ou até mesmo qualidade do sêmen fresco pré-congelamento. Para valores de motilidade progressiva, VAP, VCL, VSL, BCF também foram observadas por outros autores (SUCCU et al., 2011; URBANO et al., 2013; GOERICKE-PESCH et al., 2015).

Em alguns estudos é feita a padronização da concentração espermática antes do congelamento do sêmen (SETYAWAN et al., 2015; KHAN et al., 2017). Entretanto, a concentração espermática das amostras de sêmen nas diferentes coletas se mostrou a mesma ($p > 0,05$), portanto, não houve necessidade de se corrigir a concentração, onde a proporção de sêmen:diluidor foi realizada de forma uniforme (v/v) para todas as amostras de sêmen, na proporção 1:1 (v/v) (KARGER et al., 2016; SÁNCHEZ-CALABUIG et al., 2017; VAN DEN BERGHE et al., 2018). Além disso, era necessário um valor fixo de volume para o cálculo da quantidade (em miligramas) da melatonina a ser adicionada em cada amostra, portanto a diluição foi previamente estabelecida.

Diferentes diluidores para sêmen canino são utilizados nos protocolos de congelamento, sendo os melhores resultados relatados devido ao uso de Tris-gema, frutose ou glicose e ácido cítrico (MOURA et al., 2013; KHAN et al., 2017; SÁNCHEZ-CALABUIG et al., 2017), o que justifica a utilização de tal composição para o diluidor usado nesse estudo.

Os índices de células normais e de células com alterações morfológicas são muito importantes de serem mensurados, visto que a morfologia normal está diretamente relacionada com a qualidade do sêmen (CARDOSO; SILVA; SILVA, 2005). Não houve diferença significativa na morfologia espermática ($p > 0,05$) assim como resultados obtidos por Varesi et al. (2014) e Urbano et al., (2013). Desta forma, foi possível concluir que as concentrações de melatonina acrescentadas ao sêmen nesse estudo não influenciaram na morfologia espermática do sêmen canino descongelado.

Além disso, é possível afirmar que o processo de congelamento utilizado nesse estudo não alterou a morfologia celular, demonstrando que o protocolo utilizado não trouxe efeitos deletérios para a morfologia.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) da quantidade de proteína em miligramas entre os tratamentos e o grupo controle e, portanto, devido a essa igualdade nos níveis de proteína, pode-se inferir que, nem a ação das enzimas e nem o desempenho do sêmen durante o congelamento possam ter sido influenciados por esse aspecto.

Muitos estudos vêm sendo realizados acerca dos efeitos benéficos da melatonina sob qualidade de sêmen em diferentes espécies como bovinos, suínos, eqüinos, ovinos, cães e humanos, avaliando-se principalmente os efeitos da adição de melatonina no congelamento de sêmen para diminuir maiores danos celulares (SILVA et al., 2011; SUCCU et al., 2011; ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; EGERSZEGI et al., 2014; YANG et al., 2014; CLAUSTRAT; LESTON, 2015).

Nesse estudo, a adição de melatonina no protocolo de congelamento de sêmen canino não proporcionou diferença nos diversos parâmetros de qualidade do sêmen avaliado. Além disso, nesse trabalho, não foi observada diferença significativa em relação ao estresse oxidativo quando comparados níveis de CAT, SOD e MDA com o grupo controle. Em estudos recentes a melatonina também não mostrou diferença significativa na qualidade do sêmen de equino (SILVA et al., 2011), peixes (ASSIS, 2019), cão (VARESI et al., 2014) e javali (MARTIN-HIDALGO et al., 2011). Nós não observamos alteração morfológica nas células quando sêmen congelado com melatonina, assim como Varesi et al. (2014), que também não observou alterações no índice de fragmentação de DNA em sêmen canino. Dessa forma, com base nesse estudo e nos demais trabalhos citados anteriormente, não foi possível confirmar a hipótese de uma possível ação benéfica da melatonina com a célula espermática no congelamento de sêmen canino, que poderia causar melhorias na sua conformação morfológica ou integridade de membrana.

Resultados positivos foram encontrados por Ashrafi, Kohram e Ardabili (2013), como aumento dos níveis de SOD e CAT e diminuição de MDA quando utilizado 2mM de melatonina no sêmen bovino. Em sêmen humano, trabalhos realizados por Ortiz et al. (2010) e Plessis, Hagenaar e Lampiao (2010) relataram aumento de motilidade total e

progressiva e diminuição de células estáticas no sêmen *in natura* com 1mM e 2mM de melatonina, respectivamente. Porém, esse efeito positivo da melatonina pode ter sido observado devido à diferença entre espécies, protocolos de congelamento realizados de forma distinta, com outras temperaturas e outros crioprotetores utilizados.

Silva et al. (2011) ao avaliar a presença dos receptores de melatonina MT1 e MT2 no sêmen pelo método de Western blotting, confirmaram que não existe tais receptores nos espermatozóides de equino, cães e suínos, quando comparado com marcadores moleculares de controle positivo como células de astrócitos, cérebro e ácido pancreático. Possivelmente, essa ausência de receptores pode justificar a dificuldade da melatonina em realizar ações biológicas diretas no sêmen canino. Porém, sabe-se que a melatonina pode agir através de mecanismos independentes do receptor (KLESZCZYNSKI et al., 2018), tendo a capacidade de remover radicais livres do meio celular (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013; CRUZ et al., 2014) e de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes por vias de ativação próprias (REITER et al., 2009).

Sabe-se ainda que a adição de altas concentrações de melatonina no meio de diluição pode causar prejuízos na qualidade do sêmen pós-descongelamento, e que a resposta positiva à adição do antioxidante é dose-dependente (SUCCU et al., 2011; ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013). Portanto, a concentração máxima de melatonina para sêmen canino deve ser determinada.

Nesse estudo, assim como em outros trabalhos, a viabilidade espermática e os indicadores do estresse oxidativo se mostraram semelhantes quando comparado sêmen congelado com diferentes concentrações de melatonina e o grupo controle. Os parâmetros cinéticos, morfologia espermática, integridade de membrana e níveis de catalase, superóxido dismutase e malondialdeído não diferiram estatisticamente quando o sêmen foi congelado sem adição de melatonina e quando adicionados 1 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM e 3,0 mM.

6. CONCLUSÃO

O protocolo de congelamento rápido voltado para sêmen de cães da raça Bulldog Francês se mostrou satisfatório e de fácil execução com a incorporação do canister que foi desenvolvido para agilizar e facilitar a técnica de congelamento.

Ao avaliar a adição de diferentes concentrações de melatonina no congelamento de sêmen canino, concluiu-se que não houve melhoras significativas na qualidade do sêmen descongelado e nem nos eventos relacionados ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984.
- 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, n. 1–4, p. 25–30, 2013.
- ASSIS, I. L. et al. Effect of melatonin on cryopreserved sperm of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). **Cryoletters**, v. 40, n. 3, p. 152-158, 2019.
- BELALA, R. S. F. et al. Benefits of Cholesterol and α -Tocopherol Loaded Cyclodextrins in Dog Semen Cryopreservation. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 167, n. 1–2, p. 22–27, 2016.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; COLLIN, F. Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. **Toxicology**, v. 278, p. 55-67, 2010.
- CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Métodos de avaliação de sêmen canino congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 3-4, p. 179-187, 2005.
- CARPENTIERI, A. et al. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 4, p. 437-444, 2012.
- CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 3. ed., 104 p. Belo Horizonte, MG: CBRA, 2013.
- CHELUCCI, S. et al. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 83, p. 1064-1074, 2015.
- CLAUSTRAT, B.; LESTON, J. Melatonin: Physiological Effects in Humans. **Neurochirurgie**, v. 61, n. 2–3, p. 77–84, 2015.
- CRUZ, M. H. C. et al. Role of Melatonin on Production and Preservation of Gametes and Embryos: A Brief Review.” **Animal Reproduction Science**, v. 145, n. 3–4, p. 150–60, 2014.
- DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increase expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2000.
- DORADO, J. et al. Influence of Sampling Factors on Canine Sperm Motility Parameters Measured by the Sperm Class Analyzer Influence of Sampling Factors on Canine Sperm Motility Parameters Measured by the Sperm Class Analyzer.” **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 57, p. 318-325, 2011.
- EGERSZEGI, I. et al. Effect of Melatonin Treatment on Semen Parameters and

Endocrine Function in Black Racka Rams out of the Breeding Season. **Small Ruminant Research** v. 116, n. 2–3, p. 192–198, 2014.

FANG, L. et al. Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish. **Cryobiology**, v. 69, p. 386-393, 2014.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing. **Nature**, v. 408, p. 239–247, 2000.

GOERICKE-PESCH, S. et al. Effect of Seminal Plasma Vesicular Structures in Canine Frozen-Thawed Semen. **Theriogenology**, v.84, n. 9, p. 1490–1498, 2015.

HIDALGO, M. et al. DNA integrity of canine spermatozoa during chill storage assessed by the sperm chromatin dispersion test using bright-field or fluorescence microscopy. **Theriogenology**, v. 84, p. 399-406, 2015.

KARGER, S. et al. Prognostic Value of a Pre-Freeze Hypo-Osmotic Swelling Test on the Post-Thaw Quality of Dog Semen. **Animal Reproduction Science**, v. 166, p. 141–47, 2016.

KHAN, J. et al. Effect of Cholesterol-Loaded Cyclodextrins on Cryosurvival of Dog Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals** v. 52, p. 265–268, 2017.

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

KLESZCZYNSKI, K. et al. Melatonin and its metabolites ameliorate UVR-induced mitochondrial oxidative stress in human mnt-1 melanoma cells. **International Journal of Molecular Science**, v. 19, n. 3786, 2018.

KODERLE, M.; AURICH, C.; SCHAFER-SOMI, S. The Influence of Cryopreservation and Seminal Plasma on the Chromatin Structure of Dog Spermatozoa. **Theriogenology**, v. 72, p. 1215–1220, 2009.

LI, C.; ZHOU, X. Melatonin and Male Reproduction. **Clinica Chimica Acta**, v. 446, p. 175–180, 2015.

LUBOSHITZKY, R. et al. Melatonin Administration Alters Semen Quality in Healthy Men. **Journal of Andrology**, v.23, n. 4, p. 572–578, 2002.

LUCIO, C. F.; et al. Oxidative Stress at Different Stages of Two-Step Semen Cryopreservation Procedures in Dogs. **Theriogenology**, v, 85, n. 9, p. 1568–1575, 2016.

LUCIO, C. F. et al. Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation. **Cryobiology**, v. 72, p. 135-140, 2016.

LUCONI, M.; FORTI, G.; BALDI, E. Pathophysiology of sperm motility. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 1433-1447, 2006.

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

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, n. 8, p. 1550–1560, 2011.

MASON, S. J. Current review of artificial insemination in dog. **Vet Clin Small Anim**, article in press, 2018.

MOURA, C. S. et al. Efeito Da Temperatura de Descongelção Na Integridade de Espermatozoides Criopreservados de Cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 1057–1064, 2013.

MOURA, C. S. et al. 2015. Teste de Avaliação in Vitro e Criopreservação Do Sêmen de Cão Utilizando Diferentes Diluidores. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 8, n. 2, p. 102–106, 2015.

ORTIZ, A. et al. High Endogenous Melatonin Concentrations Enhance Sperm Quality and Short-Term in Vitro Exposure to Melatonin Improves Aspects of Sperm Motility. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 2, p. 132–139, 2010.

ORTIZ, I. et al. 2017. Comparison of DNA Fragmentation of Frozen-Thawed Epididymal Sperm of Dogs Using Sperm Chromatin Structure Analysis and Sperm Chromatin Dispersion Test. **Animal Reproduction Science**, v. 187, p. 74–78, 2017.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.). **Cryopreservation and Freeze-drying Protocols**, Totowa: Humana Press, p. 39-57, 2007.

PLESSIS, S. S.; HAGENAAR, K.; LAMPÍAO, F. The in Vitro Effects of Melatonin on Human Sperm Function and Its Scavenging Activities on NO and ROS. **Andrologia**, v. 42, n. 2, p. 112–116, 2010.

REITER, R. J. Melatonin: lowering the high price of free radicals. **Physiology**, v. 15, n. 5, p. 246-250, 2009.

ROTA, A. et al. Pregnancy and Conception Rate after Two Intravaginal Inseminations with Dog Semen Frozen Either with 5% Glycerol or 5% Ethylene Glycol. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 1, p. 94–97, 2010.

SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J. et al. Cryopreservation of Canine Sperm Using Egg Yolk and Soy Bean Based Extenders. **Reproductive Biology**, v. 17, n. 3, p. 233–38, 2017.

SETYAWAN, E. M. N. et al. Maintaining Canine Sperm Function and Osmolyte

Content with Multistep Freezing Protocol and Different Cryoprotective Agents. **Cryobiology**, v. 71, n. 2, p. 344–349, 2015.

SETYAWAN, E. N. M. et al. Spermine Reduces Reactive Oxygen Species Levels and Decreases Cryocapacitation in Canine Sperm Cryopreservation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 4, p. 927–32, 2016.

SILVA, C. M. B. et al. Melatonin Reduces Lipid Peroxidation and Apoptotic-like Changes in Stallion Spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 2, p. 172–79, 2011.

SUCCU, S. et al. Melatonin Protects Ram Spermatozoa from Cryopreservation Injuries in a Dose-Dependent Manner. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 3, p. 310–18, 2011.

TESI, M. et al. Variables Affecting Semen Quality and Its Relation to Fertility in the Dog: A Retrospective Study. **Theriogenology**, v. 118, p. 34–39, 2018.

TSIKAS, D. Assessment of Lipid Peroxidation by Measuring Malondialdehyde (MDA) and Relatives in Biological Samples : Analytical and Biological Challenges. **Analytical Biochemistry**, v. 524, p. 13–30, 2017.

UCHOA, D. C. et al. Criopreservação de sêmen e inseminação artificial em cães. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 132-142, 2012.

URBANO, M. et al. Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the spermchromatin dispersion test. **Animal Reproduction Science**, v. 143, n. 1-4, p. 118-125, 2013.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas Ao Oxigênio (ROS) e a Utilização de Antioxidantes Na Criopreservação Do Sêmen Suíno. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 31, n. 1, p. 47–53, 2007.

VAN DEN BERGHE, F. A Two-Step Dilution Tris-Egg Yolk Extender Containing Equex STM Significantly Improves Sperm Cryopreservation in the African Wild Dog (*Lycaon Pictus*). **Cryobiology**, v. 80, p. 18–25, 2018.

VARESI, S. et al. DNA Integrity of Fresh and Frozen Canine Epididymal Spermatozoa. **Reproductive Biology**, v. 14, n. 4, p. 257–61, 2014.

VERSTEGEN, J. P. et al. Long-Term Motility and Fertility Conservation of Chilled Canine Semen Using Egg Yolk Added Tris – Glucose Extender : In Vitro and in Vivo Studies. **Theriogenology**, v. 64, p. 720–33, 2015.

YANG, W. C. et al. Melatonin Regulates the Development and Function of Bovine Sertoli Cells via Its Receptors MT1 and MT2. **Animal Reproduction Science**, v. 147, n. 1–2, p. 10–16, 2014.