

## EFEITO DA MELATONINA NA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INTRACELULAR AO SÊMEN CAPRINO CRIOPRESERVADO

Domingos Lollobrigida de Souza Netto<sup>1</sup>, Ítalo Augusto da Costa Soares<sup>2</sup>, Carlos Thiago Silveira Alvim Mendes de Oliveira<sup>3</sup>, Andreia Ferreira Machado<sup>4</sup>, Oswaldo de Barros Lollobrigida<sup>5</sup>,  
Ciro Alexandre Alves Torres<sup>7</sup>

**Resumo:** Superprodução de espécies reativas de oxigênio e diminuição da capacidade antioxidante do sêmen podem aumentar os efeitos deletérios na célula espermática criopreservada. Sêmen colheitados de quatro bodes foi diluído e congelado utilizando as seguintes concentrações de melatonina que se constituíram os tratamentos: 0µl (controle), 1µl, 1mM, 2mM, 3mM e 4mM, para posterior análise por citometria de fluxo. Não houve interação ( $P>0.05$ ) entre tratamentos relacionando a produção de peróxido de hidrogênio e integridade da membrana plasmática. Contudo a partir da concentração de dois mM de melatonina os valores de membrana plasmática lesionada em conjunto com a elevada concentração de peróxido de hidrogênio indicam possível efeito citotóxico ou alterações na osmolaridade advindo da adição do antioxidante no diluente. Conclui-se que os efeitos benéficos da melatonina não foram observados na criopreservação de sêmen caprino.

**Palavras-chave:** Antioxidante, espécies reativas de oxigênio, espermatozoides, hormônio

---

<sup>1</sup>Mestrando em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: domingoslollobrigida@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Doutorando em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: italomedvet@hotmail.com

<sup>3</sup>Doutor em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: ctsamo@gmail.com

<sup>4</sup>Mestranda em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: andreia\_fmachado@hotmail.com

<sup>5</sup>Graduando em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: o.lollobrigida@gmail.com.

<sup>6</sup>Professor Orientador, Doutor em Endocrinologia e Fisiologia da Reprodução – Universidade de Wisconsin-Madison, Professor Voluntário Contratado do Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: cirotorres11@gmail.com

## Introdução

A criopreservação espermática é amplamente utilizada na espécie caprina, porém o processo de congelamento e descongelamento causam danos moleculares e prejudicam a capacidade de fertilização dos espermatozoides devido a altas taxas de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A melatonina possui propriedades antioxidantes que auxiliam na preservação da qualidade e viabilidade espermática. Nesse estudo analisou via citometria de fluxo, a capacidade da melatonina em diferentes concentrações em melhorar a qualidade do sêmen caprino criopreservado.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA) com o número de registro 81/2014, no setor de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa e foram utilizados quatro reprodutores caprinos adultos considerados aptos a reprodução via exame andrológico (CBRA, 2013), sendo coletados sete ejaculados por animal. Diluídas em meio comercial Botubov® a base de gema de ovo, as distintas concentrações de melatonina foram distribuídas nos seguintes tratamentos: T1: Controle sem melatonina; T2: 1 $\mu$ M; T3: 1mM; T4: 2 mM; T5: 3 mM; T6: 4 mM. Após a diluição o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL e em seguida submetidos a temperatura de 5 °C por três horas seguindo a curva de resfriamento e tempo de equilíbrio do semen. O pré-congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido por quinze minutos. O descongelamento do sêmen em banho-maria a 37° C por 30 segundos, seguido da avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular mediante utilização do fluoróforo diacetato de diclorodihidrofluoroscéia (DCFDA), que ao penetrar na célula é oxidado pelo peróxido de hidrogênio intracelular emitindo fluorescência verde. Foram contabilizadas vinte mil células por amostra e dispostas em quatro categorias: células com membrana plasmática íntegra sem peróxido de hidrogênio intracelular, células

com membrana plasmática lesionada sem peróxido de hidrogênio intracelular, células com membrana plasmática lesionada e com peróxido de hidrogênio intracelular e células com membrana plasmática íntegra e com peróxido de hidrogênio intracelular, sendo as médias analisadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Não houve diferença ( $P > 0.05$ ) entre os tratamentos para as características analisadas: população de espermatozoides com presença de peróxido de hidrogênio intracelular e espermatozoides com membrana plasmática íntegra. Mesmo com o valor alto de média, foi verificado um decréscimo significativo na população de espermatozoides com membrana plasmática íntegra quando a concentração de melatonina excedeu o valor de dois mM no diluente (tabela 1). Pode se dizer que a melatonina não comprometeu a integridade da membrana de modo a inibir excessivamente a síntese das espécies reativas de oxigênio (CARVALHO *et al.*, 2002, LAMIRANDE *et al.*, 1997; SANOCKA & KURPISZ, 2004), mas devido à possíveis efeitos citotóxicos ou alterações osmóticas advindas da adição do antioxidante nessas concentrações.

Tabela 1. Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção ou não de peróxido de hidrogênio e viabilidade espermática, em amostras de sêmen caprino criopreservado em diferentes concentrações de melatonina, avaliadas por citometria de fluxo

Tratamento	Com Peróxido de Hidrogênio	Membrana Íntegra
0	94.43 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup>	34.18 $\pm$ 2.57 <sup>a</sup>
1 $\mu$ M	94.12 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	32.73 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>
1mM	94.48 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>	29.90 $\pm$ 2.47 <sup>a</sup>
2mM	93.51 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>	28.75 $\pm$ 2.17 <sup>ab</sup>
3mM	94.23 $\pm$ 1.59 <sup>a</sup>	23.62 $\pm$ 2.45 <sup>bc</sup>
4mM	94.76 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	19.48 $\pm$ 1.78 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes nas médias dentro da mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Não houve interação ( $P>0.05$ ) de raça e tratamento para membrana plasmática íntegra ou lesionada sem peróxido de hidrogênio intracelular, e membrana plasmática lesionada e presença de peróxido de hidrogênio intracelular (tabela 2). A alta população de espermatozoides com membrana plasmática lesionada, aliado à presença de peróxido de hidrogênio intracelular observado entre os tratamentos quando a concentração de melatonina excedeu dois mM são indícios que essas concentrações de melatonina possam ter provocado danos osmóticos e/ou efeitos citotóxicos à célula espermática, embora tais alterações possam ser apenas decorrentes do estresse oxidativo inerente ao processo de criopreservação (WATSON, 2000; GREEN & WATSON, 2001).

Tabela 2. Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio e viabilidade da membrana plasmática, em amostras de sêmen caprino criopreservado em diferentes concentrações de melatonina, avaliadas por citometria de fluxo

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

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes nas médias dentro da mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ ).

\*T: tratamentos.

## Conclusões

Conclui-se que os resultados obtidos quanto à adição de melatonina não apresentaram o efeito antioxidante esperado na criopreservação de sêmen caprino.

## Agradecimentos

Os pesquisadores agradecem o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa, Brasil) e a BOTUPHARMA (São Paulo, Brasil) pela doação dos diluentes usados na criopreservação de sêmen.

## Referências Bibliográficas

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

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: **CBRA**, 104p, 2013.

GREEN, C. E; WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v. 122, p. 889-898. 2001.

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

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

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