

**A influência do fotoperíodo na reprodução do macho caprino e ovino**  
**The influence of photoperiod on reproduction of male goat and ram**  
**La influencia del fotoperiodo en la reproducción de machos cabríos y ovinos**

Recebido: 07/09/2020 | Revisado: 15/09/2020 | Aceito: 01/10/2020 | Publicado: 04/10/2020

**Júlio César Oliveira Dias**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9356-4264>

Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, Brasil

E-mail: [julio.dias@ifnmg.edu.br](mailto:julio.dias@ifnmg.edu.br)

**Cristina Mattos Veloso**

ORCID: <https://orcid.org/0000.0001.5811.8819>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [cristina.veloso@ufv.br](mailto:cristina.veloso@ufv.br)

## **Resumo**

Algumas espécies animais apresentam sazonalidade reprodutiva regulada, principalmente, pelo fotoperíodo diário, podendo ser modulada pelo clima e alimentação. Essa característica fisiológica é bem destacada e conhecida nas fêmeas, onde acontece um período de estação reprodutiva e outro de anestro. No entanto, nos machos de espécies sazonais, as variações reprodutivas não são consideradas suficientes para impedir a reprodução ao longo do ano, porém deve-se considerar tais alterações em algumas práticas zootécnicas e tomadas de decisões. O objetivo com essa revisão é abordar a influência do fotoperíodo sobre a reprodução dos machos caprinos e ovinos, e também, possíveis ações da melatonina na conservação espermática de forma direta e indireta.

**Palavras-chave:** Gonadotrofinas; Melatonina; Ritmo circadiano; Sazonalidade; Testosterona.

## **Abstract**

Some animal species exhibit reproductive seasonality regulated mainly by the daily photoperiod, may be modulated by climate and food. This physiological characteristic is well known and prominent in females, where happens a period of breeding season and other anestrus. However, in males of species seasonal the reproductive variations are not considered sufficient to prevent reproduction throughout the year, but must consider such changes in some husbandry practices and decision making. The aim of this review is to evaluate the influence of

photoperiod on reproduction of male goats and sheep, and also, possible actions of melatonin on sperm conservation directly and indirectly.

**Key-words:** Circadian rhythm; Gonadotropins; Melatonin; Seasonality; Testosterone.

## Resumen

Algunas especies animales presentan estacionalidad reproductiva regulada principalmente por el fotoperíodo diario, que puede ser modulado por el clima y la alimentación. Esta característica fisiológica es bien destacada y conocida en las hembras, donde hay un período de época reproductiva y otro de anestro. Sin embargo, en machos de especies estacionales, las variaciones reproductivas no se consideran suficientes para evitar la reproducción a lo largo del año, sin embargo, dichos cambios deben ser considerados en algunas prácticas zootécnicas y toma de decisiones. El propósito de esta revisión es abordar la influencia del fotoperíodo en la reproducción de machos cabríos y ovinos, y también, las posibles acciones de la melatonina en la conservación de los espermatozoides directa e indirectamente.

**Palabras clave:** Gonadotropinas; Melatonina; Ritmo circadiano; Estacionalidad; Testosterona.

## 1. Introdução

As espécies que apresentam um ciclo reprodutivo sazonal desenvolveram alternativas fisiológicas que permitem manifestar os períodos aptos à reprodução em momentos do ano que permitirão o nascimento de suas crias em épocas com melhor disponibilidade de alimento e temperatura (Goldman, 2001; Smith, 2012). Assim, o período gestacional e algumas variações ambientais, como o período de chuvas, levam alguns animais alterarem sua fisiologia, refletindo, principalmente, na gametogênese e manifestação de comportamentos reprodutivos.

Muitos trabalhos já foram realizados para analisar o comportamento reprodutivo sazonal de algumas espécies, principalmente nos animais de produção (Nagy, et al., 2000; Rosa & Bryant, 2003; Abecia, et al., 2012). Este fenômeno ocorre, principalmente, pelo fotoperíodo e alterações da duração do dia, e pode ser regulado por diversos fatores, tais como temperatura, nutrição, contato com o outro sexo, tempo e duração do parto e da lactação (Rosa & Bryant, 2003).

O principal hormônio que regula a sazonalidade na reprodução dos mamíferos é a melatonina, porém os seus mecanismos de ação na fisiologia reprodutiva ainda não estão totalmente esclarecidos (Malpaux, et al., 2001; Clarke, et al., 2009). Sabe-se, no entanto, que a sua síntese é maior durante os períodos de escuro, e assim, naqueles dias do ano onde o

fotoperíodo é decrescente, ou seja, o período de luminosidade durante o dia é menor, ocorre maior síntese e liberação deste hormônio na corrente sanguínea pela glândula pineal (Malpaux, 2006). Além disso, alguns trabalhos já mostraram a síntese desse hormônio em vários outros órgãos, inclusive naqueles relacionados à reprodução, como os ovários (Itoh, et al., 1999; Tosini & Fukuhara, 2002).

Essa regulação reprodutiva que a melatonina faz no organismo depende da concentração na corrente sanguínea e varia entre as espécies sazonais. Aquelas consideradas de “dias curtos”, como os pequenos ruminantes e búfalos, apresentam sua estação reprodutiva no final do verão, outono e inverno, quando o período de escuro durante o dia é maior que o de luz, e assim, ocorre maior síntese de melatonina (Abecia, et al., 2012). Já os equinos, apresentam sua estação reprodutiva durante a primavera e verão, quando a luminosidade é maior, e ocorre menor síntese de melatonina, sendo chamados de reprodutores de “dias longos” (Nagy, et al., 2000).

Durante a estação reprodutiva, a melatonina pode realizar suas ações regulatórias na reprodução, principalmente, de duas formas. A via principal é pela indução de uma maior liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, e, conseqüentemente, dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela adenohipófise. Tanto o FSH quanto o LH, são responsáveis pelo desenvolvimento, ativação e estímulo das gônadas, que produzem os hormônios sexuais e desenvolvimento dos gametas (Malpaux, et al., 2001; Clarke, et al., 2009). No entanto, a melatonina pode agir também diretamente sobre os testículos (Li, et al., 1998), os espermatozoides (Casao, et al., 2012) e plasma seminal (Casao, et al., 2010b), utilizando ou não seus receptores de membrana, para auxiliar na melhor conservação e qualidade espermática.

Assim, tem-se como objetivo por meio desta revisão mostrar a influência do fotoperíodo sobre a reprodução dos machos caprinos e ovinos, e também, possíveis ações da melatonina na conservação espermática de forma direta e indireta.

## **2. Metodologia**

Este trabalho é uma revisão da literatura voltada para o aspecto qualitativo (Pereira, et al., 2018), após a busca em base de dados científicas (Scientific Electronic Library Online - SciELO, Periódico Capes, PubMed e Google Scholar) e livros. As palavras-chaves foram pesquisadas individualmente ou combinadas em português e inglês, e após a leitura dos resumos e introduções foram selecionados os materiais que tinham como base o objetivo desta revisão após leitura.

### **3. Revisão de Literatura**

Os estudos relacionados à sazonalidade reprodutiva em machos são essenciais para o manejo e eficiência zootécnica da produção a campo. Ao se conhecer o processo reprodutivo sazonal de uma determinada espécie, pode-se fazer a correta escolha do reprodutor para estação de monta de um rebanho, além de identificar as melhores técnicas e períodos para a coleta e criopreservação do sêmen utilizado nas biotecnologias reprodutivas. Portanto, ao se compreender as variáveis reprodutivas dos animais sazonais podem ser criadas alternativas para diminuir ou eliminar os períodos de montas restritas, e aumentar a produção de produtos de origem animal/ano.

As características sazonais de reprodução se expressam com maior intensidade naqueles animais com origem em regiões de latitudes superiores a 35 °N ou 35 °S (Avdi, et al., 2004; Sarlós, et al., 2013). No entanto, estas alterações sazonais são muito mais delicadas em machos do que em fêmeas, as quais apresentam um período de anestro reprodutivo, enquanto a espermatogênese e atividade sexual são ininterruptas nos machos (Pelletier & Almeida, 1987). Dentre as principais características claramente observadas nos machos estão as mudanças no comportamento (libido), nas dimensões testiculares (massa e volume), na espermatogênese e secreção hormonal (Kafi, et al., 2004; Zamiri & Khodaei, 2005).

A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de diferenciação celular, pelo qual uma espermatogônia (2n), gradativamente, se diferencia em uma célula haploide altamente especializada, o espermatozoide. A produção espermática acontece com a liberação pulsátil de GnRH e a chegada subsequente de LH e FSH às células-alvo. O LH estimula as células de Leydig a secretarem testosterona, que se difunde através da membrana basal e regula as células de Sertoli e mióides, as quais contêm receptores androgênicos. Uma alta concentração local de testosterona (50 a 100 vezes maior que no plasma) é essencial para que se completem os estágios subsequentes da espermatogênese. O FSH estimula a produção da proteína transportadora de andrógeno (ABP), que forma um complexo com a testosterona. Esse complexo, ABP-T, é transportado com os espermatozoides para dentro do epidídimo, pois as células epiteliais do epidídimo requerem concentrações relativamente altas de testosterona para uma boa atividade de maturação espermática (Gardner & Hafez, 2004).

#### **3.1 Variação do volume testicular e sazonalidade**

As mudanças sazonais nas dimensões testiculares são precedidas pela diminuição de LH e aumento da secreção de FSH, como relatado em inúmeras raças de ovinos (Avdi, et al., 2004;

Kafi, et al., 2004; Dickson & Sanford, 2005; Barkawi, et al., 2006). A principal razão para o aumento do volume testicular na estação reprodutiva é a proliferação das células de Sertoli, as quais são essenciais para fornecer suporte estrutural, nutricional e funcional para a diferenciação e a proliferação das células germinativas (Sharpe, et al., 2003). O processo que leva ao aumento do número e da funcionalidade das células de Sertoli, ainda precisa ser totalmente esclarecido, mas já se sabe da necessidade do controle hormonal hipofisário (Escott, et al., 2011/2), o qual é regulado pelo fotoperíodo como descrito anteriormente.

A análise do perfil hormonal de machos caprinos em uma região com latitude 30° N durante as quatro estações do ano, mostrou que no verão, período que antecede a estação reprodutiva, a concentração plasmática de FSH ( $1,1 \pm 0,15$  mIU/mL) foi maior que o de LH ( $0,4 \pm 0,18$  mIU/mL). Durante a estação reprodutiva, no outono, a concentração plasmática de LH ( $2,9 \pm 0,16$  mIU/mL) foi maior que o de FSH ( $0,4 \pm 0,13$  mIU/mL) (Barkawi, et al., 2006). O aumento anterior à estação reprodutiva de FSH pode ser um mecanismo fisiológico do organismo para aumentar o volume testicular e aumentar a produção espermática. Durante a estação reprodutiva, o aumento de LH pode ser devido a influência da melatonina ativando um perfil predominantemente de pulsos de alta frequência de GnRH, que induz a secreção de LH e não de FSH.

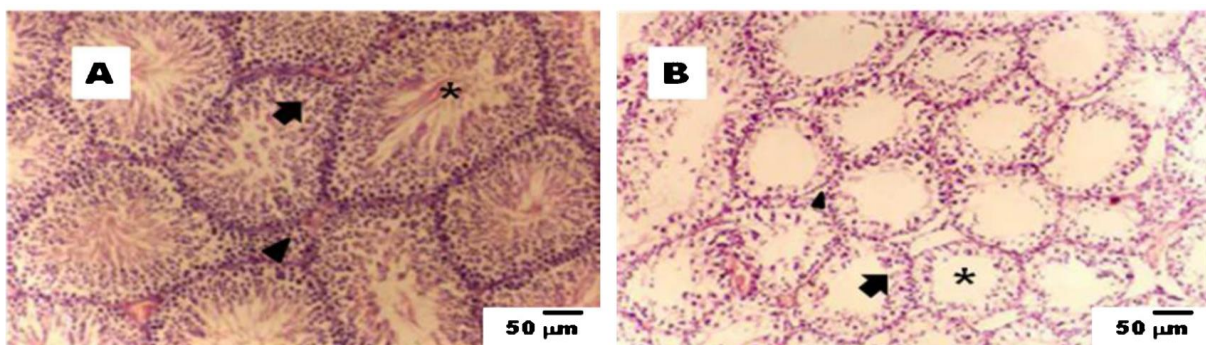
Os testículos dos mamíferos podem ser divididos em duas áreas principais, com morfologia e funções distintas. A região intertubular contém o tecido intersticial e é composta por células conjuntivas e esteroidogênicas (de Leydig), vasos sanguíneos e linfáticos. Essa região preenche os espaços entre os cordões sexuais ou túbulos seminíferos, onde se encontram as células de Sertoli e as células germinativas em desenvolvimento (Gardner & Hafez, 2004). Barkawi et al. (2006) ao avaliarem a influência sazonal do fotoperíodo na reprodução de carneiros, observaram que a área, a espessura do epitélio seminífero e o número de camadas espermáticas na parede dos túbulos seminíferos na estação reprodutiva ( $65,4 \pm 17,0$  %;  $53,0$   $\mu\text{m}$ ; e  $5,6 \pm 0,55$ , respectivamente), foram maiores que as encontradas fora da fase de estação ( $49,8 \pm 7,9$  %;  $19$   $\mu\text{m}$ ;  $2,5 \pm 0,58$ , respectivamente). Por outro lado, a área ocupada pelo tecido intersticial na estação reprodutiva foi menor ( $34,6 \pm 17,0$  %) que a encontrada na estação não-reprodutiva ( $50,2 \pm 7,9$  %). Essas alterações testiculares ocorrem para aumentar a produção espermática durante a época de estação reprodutiva das fêmeas, podendo ser necessário, no entanto, a diminuição da área intersticial para um maior aumento da área produtora dos espermatozoides.

Sarlós et al. (2013) mostraram que os aumentos das dimensões testiculares em carneiros foram substancialmente influenciados pela estação reprodutiva ( $r= 0,87$ ). Por consequência, o

aumento do perímetro escrotal pode ter permitido a moderada correlação negativa estabelecida com as anormalidades nas células espermáticas ( $r = -0,50$ ) (Sarlós, et al., 2013). Portanto, é possível que o maior espaço/volume testicular na fase reprodutiva permita um menor número de apoptoses celular, além de levar ao aumento do número das células de Sertoli, que aumenta o aporte nutricional e estrutural das células germinativas.

Na Tabela 1, alguns resultados de trabalhos com pequenos ruminantes são apresentados mostrando as variações de alguns parâmetros reprodutivos, como o perímetro. Já na Figura 1, pode-se observar a variação na estrutura dos túbulos seminíferos em hamsters, que são animais considerados reprodutores de “dias longos”, expostos a dois fotoperíodos (longo e curto).

**Figura 1.** Epitélio dos túbulos seminíferos dos testículos de hamsters expostos ao fotoperíodo longo (A) ou curto (B). Os asteriscos indicam o lúmen do túbulo seminífero, setas apontam para células da linhagem espermatogênica e pontas de seta apontam para tecido intersticial (hematoxilina-eosina; aumento de 40x).



Fonte: Boggio, et al. (2013).

### 3.2 Tempo de reação e sazonalidade

O tempo de reação (TR) do reprodutor é o período transcorrido desde a visualização e contato com a fêmea até a primeira ejaculação (Chenoweth, 1981). É um parâmetro muito utilizado para analisar o comportamento sexual do macho reprodutor. Em caprinos, durante o TR pode se observar antes da cópula ou ejaculação algumas outras características como, ato de cheirar e lambar a região anogenital, reflexo de Flehmen, ato de bater e raspar o casco no chão, acotovelamento e escoiceamento da fêmea, emissão de som característico, exteriorização e retração da língua, ereção/exposição do pênis, reflexo de monta e montas sem introdução do pênis na vagina com posterior ejaculação (montas sem serviço) (dados pessoais).

Barkawi et al. (2006) observaram maior libido de bodes Zaraibi no outono (estação

reprodutiva), com menor número de montas (1,7) e tempo de reação mais curto (21,4 segundos) que na contra-estação (2,4 e 87,4 segundos, respectivamente). Em carneiros deslanados tropicais, também foi encontrado menor TR na estação reprodutiva (14,64 segundos) que fora dela (26,46 segundos) (Aguirre, et al., 2007). Esse aumento da libido pode ser devido a maior concentração de testosterona circulante, já que este hormônio além de ser responsável pela eficiência da espermatogênese, também influencia na manifestação das características sexuais secundárias, como os feromônios. Além disso, a testosterona está em níveis mais elevados durante a estação de monta e acompanha uma tendência sazonal anual de síntese e secreção (Santiago-Moreno, et al., 2005; Todini, et al., 2007).

### **3.3 Síntese de testosterona e sazonalidade**

O hormônio testosterona é quase que exclusivamente produzido pelas células de Leydig (tecido intersticial), podendo também ser secretado pela região cortical da adrenal (Siegel, et al., 1992). Dentre as suas funções reprodutivas, podem-se destacar a regulação das células de Sertoli estimulando os estádios finais da espermatogênese, o prolongamento da vida útil dos espermatozoides no epidídimo, estímulo ao desenvolvimento dos órgãos reprodutivos secundários, e a manutenção das características sexuais secundárias e da libido do macho (Gardner & Hafez, 2004). Segundo Odonnell et al. (1994), o desenvolvimento das espermátides alongadas a partir das arredondadas é altamente dependente de testosterona. Portanto, a testosterona está diretamente envolvida em vários processos reprodutivos e apresenta flutuações em suas concentrações plasmáticas entre as estações reprodutivas (Santiago-Moreno, et al., 2005; Todini, et al., 2007).

Estudos realizados em carneiros mostraram que a sazonalidade do fotoperíodo influencia fortemente a síntese de testosterona ( $r= 0,71$ ), ou seja, a produção de testosterona é maior na estação reprodutiva (Sarlós, et al., 2013). Porém, ainda não se sabe, se a baixa atividade na sua síntese fora da época da estação reprodutiva (primavera/verão) é devido somente à diminuição da concentração de gonadotrofinas por influência do fotoperíodo (crescente), ou uma combinação de fatores fisiológicos e ambientais (fotoperíodo crescente+altas temperaturas) (Barbosa, et al., 1999).

Além dos dados apresentados na tabela 1, outros trabalhos também apresentam a variação das concentrações plasmáticas da testosterona durante o ano. Todini et al. (2007) observaram nas raças caprinas Ionica, Garganica, Maltese e Red Syrian que a produção de testosterona (ng/mL) durante a estação reprodutiva foi maior ( $8,37 \pm 0,56$ ;  $9,12 \pm 0,43$ ;  $4,53 \pm$

0,43;  $5,20 \pm 0,47$ , respectivamente) que na estação não reprodutiva ( $2,01 \pm 0,26$ ;  $1,77 \pm 0,20$ ;  $1,47 \pm 0,12$ ;  $2,93 \pm 0,46$ ). Em Muflão, uma raça de carneiro selvagem, a concentração plasmática máxima de testosterona ocorreu durante o outono (estação reprodutiva), enquanto em carneiros Merino, uma raça domesticada, a maior concentração de testosterona circulante ocorreu durante o verão (Santiago-Moreno, et al., 2005). As diferenças entre raças podem ser explicadas, de acordo com Lincoln et al. (1990), pelas variações nos mecanismos neuroendócrinos centrais ao transmitir as informações do fotoperíodo para o hipotálamo, o qual controla a secreção de GnRH/LH. Contrariamente, Roselli et al. (2002) afirmaram que variações nas concentrações de testosterona podem ser devido mais como resultado de uma diferença na receptividade funcional do testículo ao LH, do que a sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise ou no metabolismo periférico e clearance de testosterona.

Como foi descrito anteriormente, durante a estação reprodutiva ocorre um aumento do volume e massa testicular que influenciam positivamente na síntese de testosterona. Zamiri et al. (2010) e Sarlós et al. (2013) demonstraram correlação positiva entre a concentração de testosterona plasmática e o perímetro escrotal ( $r=0,58$  e  $r=0,62$ , respectivamente). Além disso, também foi registrado correlação negativa entre a testosterona e as anormalidades espermáticas ( $r=-0,43$ ) (Sarlós et al. 2013), mostrando a importância deste hormônio para a correta produção das células espermáticas, principalmente nas fases finais (Odonnell et al. 1994). Assim, conclui-se que o aumento de volume do testículo na estação reprodutiva, leva a uma maior secreção de testosterona para permitir a perfeita produção das células espermáticas, além do desenvolvimento das características sexuais secundárias e comportamentais necessárias nesta fase.

### **3.4 Características seminais e sazonalidade**

Como pode ser observado de forma resumida na Tabela 1, quanto maior a latitude da região onde foi realizado o experimento, maior é a variação dos parâmetros reprodutivos entre a estação de reprodução e estação não-reprodutiva (Aguirre, et al., 2007). Segundo alguns autores, diferentemente das fêmeas, a variação de muitos desses parâmetros durante o ano não compromete a capacidade de fertilização do macho (Roca, et al., 1992; Karagiannidis, et al., 2000; Kafi, et al., 2004; Aguirre, et al., 2007; Sarlós, et al., 2013).

De acordo com os trabalhos apresentados, sêmen de qualidade e quantidade superior é coletado no final do verão e durante o outono (Roca, et al., 1992; Karagiannidis, et al., 2000; Kafi, et al., 2004; Barkawi, et al., 2006). Segundo Sarlós et al. (2013) existe correlação negativa



entre a sazonalidade e anormalidades espermáticas ( $r = -0.55$ ), ou seja, durante o período de estação reprodutiva ocorrem menores índices de espermatozoides defeituosos que comprometem a qualidade espermática e sua eficiência de fertilização.

**Tabela 1.** Influência da sazonalidade na circunferência testicular, concentração plasmática de testosterona e alterações seminais de ovinos e caprinos.

ESPÉCIE	RAÇA	LATITUDE	FASE	CE (cm)	TESTOSTERONA	AUTOR
Ovina	Black Racka	47° 29' N (Hungria)	Estação	31,77 ± 0,26	19,76 ± 1,96 (ng/mL)	Sarlós, et al., 2013.
			Anestro	27,65 ± 0,36	6,34 ± 0,75 (ng/mL)	
	Moghani	39° 26' N (Irã)	Estação	34,5	4,47 (nmol/mL)	Zamiri, et al., 2010.
			Anestro	30,0	3,04 (nmol/mL)	
	Persian Karakul	29° 50' N (Irã)	Estação	33,3 ± 1,4	6,2 ± 1,2 (ng/mL)	Kafi; Safdarian; Hashemi, 2004.
			Anestro	31,9 ± 1,2	4,1 ± 1,3 (ng/mL)	
	Pelibuey	18° 37' N (México)	Estação	30,90 ± 0,12	8,68 ± 0,44 (ng/mL)	Aguirre; Orihuela; Vázquez, 2007.
			Anestro	29,59 ± 0,32	6,03 ± 0,65 (ng/mL)	
Caprina	Saanen Inglês	51° 46' N (Inglaterra)	Estação	26,8 ± 0,31	-	Ahmad; Noakes, 1996.
			Anestro	23,2 ± 0,22	-	
	Alpino	40° 37' N (Grécia)	Estação	-	-	Karagiannidis; Varsakeli; Karatzas, 2000.
			Anestro	-	-	
	Saanen	40° 37' N (Grécia)	Estação	-	-	Karagiannidis; Varsakeli; Karatzas, 2000.
			Anestro	-	-	
	Damascus	40° 37' N (Grécia)	Estação	-	-	Karagiannidis; Varsakeli; Karatzas, 2000.
			Anestro	-	-	
	Murciano-Granadina	37° 59' N (Espanha)	Estação	-	-	Roca, et al., 1992.
			Anestro	-	-	
	Zaraibi	30° 1' N (Egito)	Estação	25,4 ± 0,22	8,2 ± 0,47 (ng/mL)	Barkawi, et al., 2006.
			Anestro	26,2 ± 0,34	2,6 ± 0,56 (ng/mL)	

CE: circunferência testicular (cm).

**Tabela 1.** Continuação.

ESPÉCIE	RAÇA	LATITUDE	FASE	VS (mL)	CS (10 <sup>9</sup> /mL)	TC (x10 <sup>9</sup> )	CA (%)	MOT (%)	AUTOR	
Ovina	Black Racka	47° 29' N (Hungria)	Estação	0,91 ± 0,05	5,75 ± 0,25	5,41 ± 0,42	6,15 ± 0,73	-	Sarlós, et al., 2013.	
			Anestro	0,55 ± 0,05	6,15 ± 0,24	3,44 ± 0,33	16,90 ± 1,70	-		
	Moghani	39° 26' N (Irã)	Estação	1,60	4,84	-	9,2	84,9	Zamiri, et al., 2010.	
			Anestro	0,93	3,44	-	14,2	69,3		
	Persian Karakul	29° 50' N (Irã)	Estação	1,3 ± 0,3	-	4,6 ± 1,7	-	-	Kafi; Safdarian; Hashemi, 2004.	
			Anestro	1,0 ± 0,2	-	4,3 ± 1,05	-	-		
	Pelibuey	18° 37' N (México)	Estação	0,86 ± 0,02	4,40 ± 0,16	3,37 ± 0,17	-	-	Aguirre; Orihuela; Vázquez, 2007.	
			Anestro	0,73 ± 0,05	4,02 ± 0,19	2,73 ± 0,27	-	-		
	Caprina	Saanen Inglês	51° 46' N (Inglaterra)	Estação	0,87 ± 0,04	4,37 ± 0,14	3,64 ± 0,14	13,65 ± 0,62	79,71 ± 0,71	Ahmad; Noakes, 1996.
				Anestro	0,40 ± 0,01	5,51 ± 0,21	2,22 ± 0,13	16,32 ± 1,15	72,70 ± 1,47	
Alpino		40° 37' N (Grécia)	Estação	1,42 ± 0,04	3,50 ± 0,09	4,92 ± 0,18	8,9 ± 0,14	64,04 ± 0,70	Karagiannidis; Varsakeli; Karatzas, 2000.	
			Anestro	1,09 ± 0,04	3,77 ± 0,10	4,11 ± 0,20	11,9 ± 0,20	55,11 ± 0,91		
Saanen		40° 37' N (Grécia)	Estação	1,27 ± 0,04	3,42 ± 0,09	4,37 ± 0,20	7,41 ± 0,25	68,73 ± 0,67	Karagiannidis; Varsakeli; Karatzas, 2000.	
			Anestro	1,01 ± 0,04	3,82 ± 0,08	3,78 ± 0,15	9,5 ± 0,30	59,64 ± 0,82		
Damascus		40° 37' N (Grécia)	Estação	1,18 ± 0,03	3,54 ± 0,09	4,12 ± 0,13	5,68 ± 0,26	69,04 ± 0,56	Karagiannidis; Varsakeli; Karatzas, 2000.	
			Anestro	1,00 ± 0,03	3,83 ± 0,09	3,73 ± 0,14	7,21 ± 0,33	61,20 ± 0,61		
Murciano- Granadina		37° 59' N (Espanha)	Estação	1,21 ± 0,02	3,35 ± 0,06	4,06 ± 0,09	5,55 ± 0,23	89,36 ± 0,88	Roca, et al., 1992.	
			Anestro	0,88 ± 0,02	4,73 ± 0,10	4,17 ± 0,15	6,80 ± 0,33	89,30 ± 0,83		
Zaraibi		30° 1' N (Egito)	Estação	0,98 ± 0,03	4,7 ± 0,10	4,6 ± 0,02	8,8 ± 0,46	79,5 ± 1,37	Barkawi, et al., 2006.	

VS: volume seminal (mL); C: concentração seminal (10<sup>9</sup>/mL); TC: total de células (x10<sup>9</sup>); CA: células anormais (%); MOT (%). Fonte: Autores.

Apesar das variações reprodutivas sazonais não serem consideradas suficientes para impedir os carneiros de serem usados para a reprodução ao longo do ano, deve-se considerar tais alterações para algumas práticas zootécnicas e tomadas de decisões. Por apresentar melhor qualidade, Zamiri et al. (2010) recomendam o sêmen de carneiro produzido durante o outono (estação) para se realizar o armazenamento (criopreservação). Durante a estação reprodutiva, também se pode fazer a correta seleção dos melhores machos para fase de monta e coleta de sêmen para inseminação artificial (Roca, et al., 1992; Barkawi, et al., 2006), sem condenar de forma equivocada os machos com menores índices reprodutivos. Além disso, conhecer os parâmetros reprodutivos dos machos de cada raça permite criar alternativas no manejo de animais em sistemas intensivos de criação, que buscam, por exemplo, terem dois partos por ano em seus rebanhos (Barkawi, et al., 2006).

Portanto, de forma geral, os trabalhos apresentam resultados semelhantes quanto à variação sazonal da testosterona plasmática e dos parâmetros andrológicos em pequenos ruminantes, com a estação de monta sendo comum nas épocas de fotoperíodo decrescente (final do verão/outono) (Figura 2).

### **3.5 A melatonina na reprodução do macho**

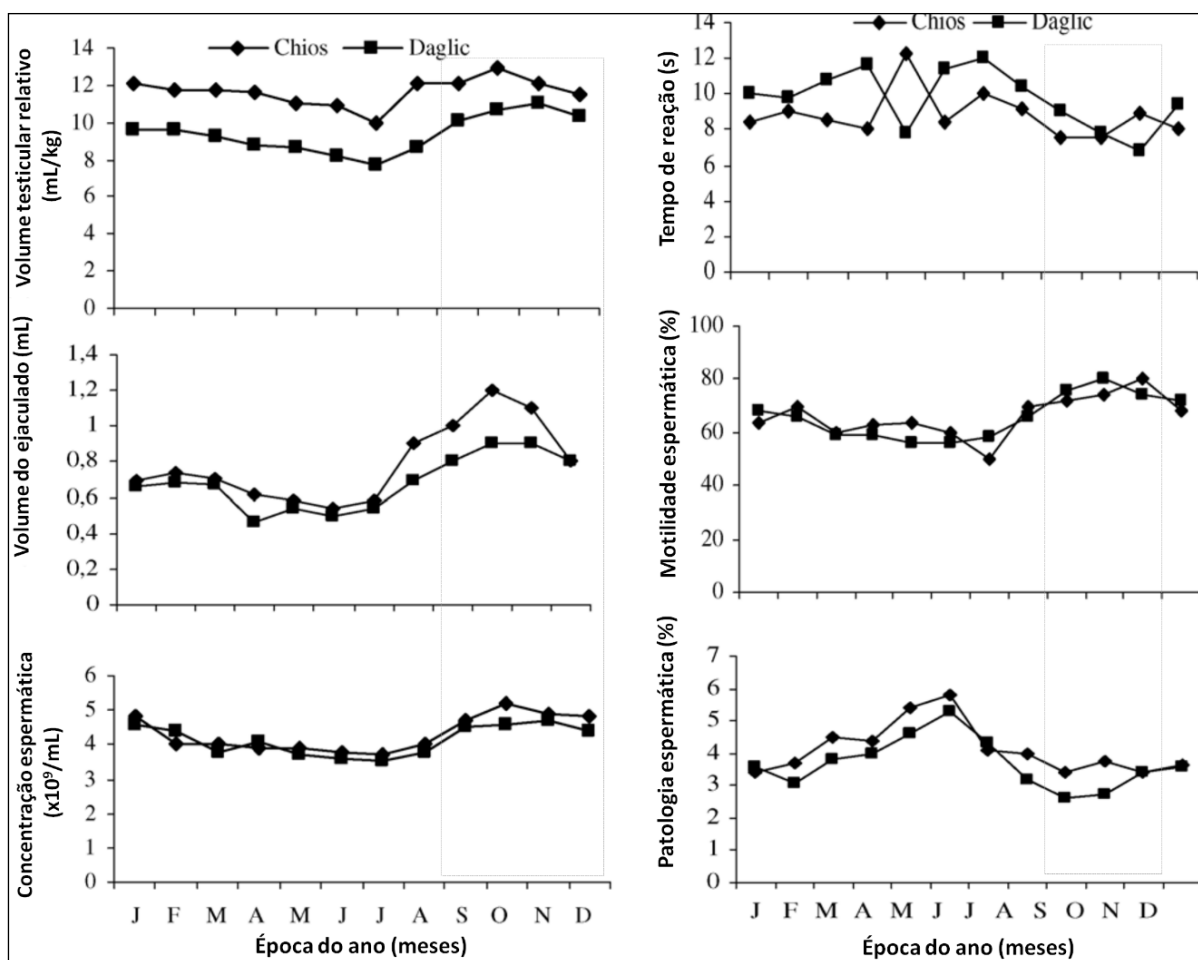
A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é sintetizada a partir do triptofano, e secretada principalmente pela glândula pineal de mamíferos, mas existem várias estruturas reprodutivas periféricas que a produzem provavelmente para seu próprio uso (Itoh, et al., 1999; Tosini & Fukuhara, 2002). Ainda se tem sugerido que as mitocôndrias de todas as células eucarióticas produzem melatonina (Tan, et al., 2013). Obviamente, se esta hipótese for verdadeira, não haveria nenhuma célula no organismo que não sintetizasse esta importante indolamina (Reiter, et al., 2013).

Esse hormônio sintetizado quase que exclusivamente durante a ausência de luz é um dos componentes essenciais na regulação reprodutiva dos animais sazonais, já que todo o eixo reprodutivo é positivamente ou negativamente influenciado pela melatonina (Reiter, et al., 2013).

Os estudos relacionados aos efeitos benéficos da melatonina sobre os espermatozoides ainda não mostraram claramente se eles ocorrem por ações diretas no esperma ou consequência de uma alteração na função do eixo HHG (Reiter, et al., 2013), ou ambos os mecanismos. O fornecimento de melatonina exógena a carneiros tem mostrado aumento da frequência de liberação pulsátil de GnRH e, conseqüentemente, hormônio luteinizante (LH), hormônio

folículo estimulante (FSH) e testosterona (Webster, et al., 1991; Lincoln & Clarke, 1997; Rosa, et al., 2000). Assim, a melhoria na qualidade do sêmen pode ser devida as ações diretas da melatonina sobre os espermatozoides, por exemplo, como um antioxidante, ou indiretas, com ações mediadas pelo LH, FSH e, especialmente, a testosterona. A presença de melatonina no fluido seminal de carneiro se encontra em concentrações mais elevadas do que no soro sanguíneo (Casao, et al., 2009), o que aumenta a possibilidade da melatonina de ter ações diretas sobre os espermatozoides (Reiter, et al., 2013).

**Figura 2.** médias mensais dos parâmetros andrológicos em carneiros da raça Chios e Daglic durante o ano.



Fonte: Adaptado de Gündogan (2007).

Os receptores de membrana para melatonina, MT1 e MT2, foram identificados em carneiros por imunocitoquímica agrupados em quase todas as áreas do espermatozoide: cabeça (região equatorial e pós-acrossomal), pescoço ou peça conectora e regiões da cauda (Casao, et al., 2012). No entanto, a razão para a distribuição heterogênea dos receptores de melatonina

ainda não foi decifrada (Reiter, et al., 2013). Esses receptores também foram identificados nas células do epitélio epididimário, com densidade regulada pela testosterona e hidrocortisona (Li, et al., 1998; Shiu, et al., 2000). Em ratos, a melatonina tem a função de modular a proliferação da linhagem celular epididimária (Li, et al., 1999), que auxilia a musculatura lisa na movimentação espermática nos ductos do epidídimo (Reiter, et al., 2013).

A vesícula seminal e próstata apresentaram mudanças no tamanho e função em animais que são classificados como reprodutores sazonais sensíveis ao fotoperíodo. No entanto, essas mudanças são secundárias as alterações na síntese e secreção de andrógenos que são regulados pelas gonadotrofinas (Reiter, 1975; Chaves, et al., 2012).

### **3.6 Melatonina como molécula antioxidante e protetora do DNA celular**

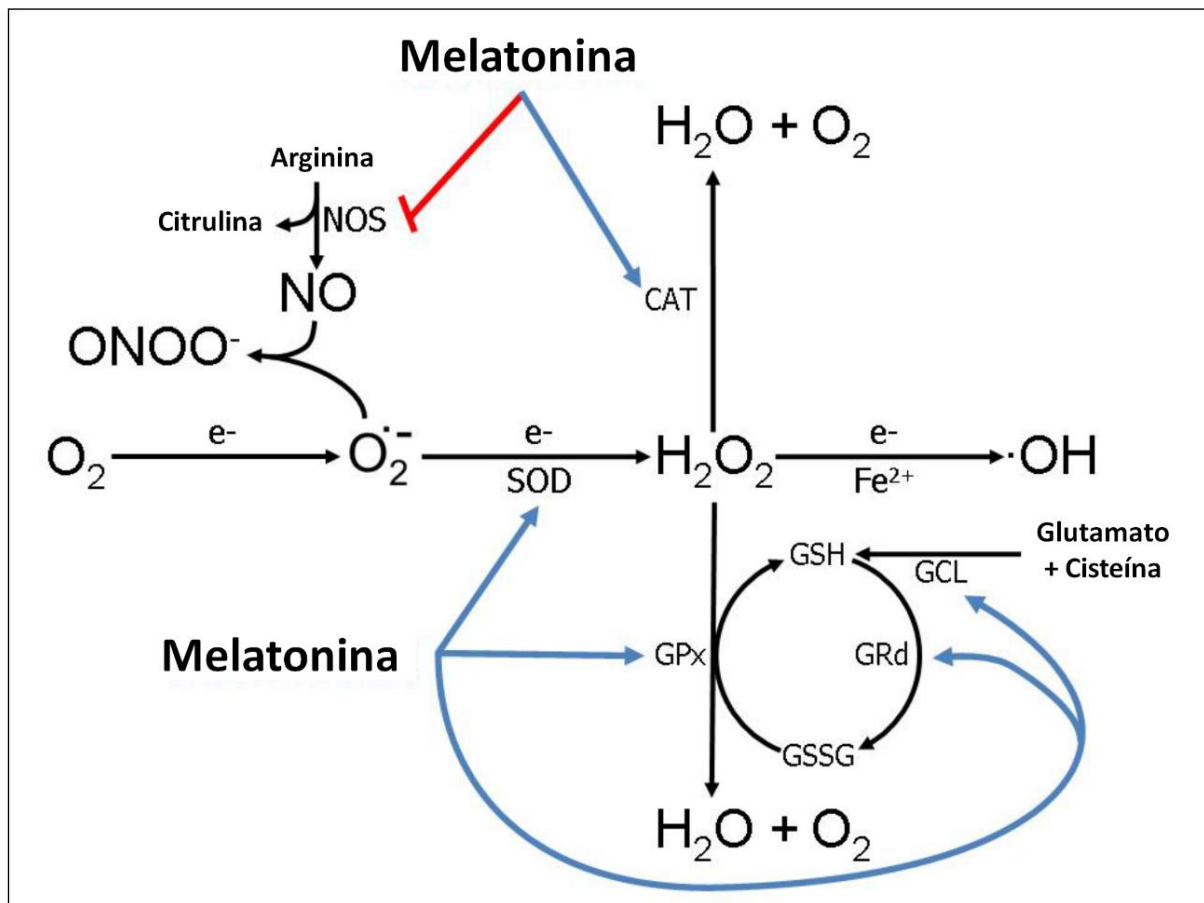
A melatonina influencia, independente de receptores, a fisiologia reprodutiva do macho estimulando enzimas antioxidantes, e também, sequestrando radicais livres (OH e ONOO<sup>-</sup>) que poderiam levar a danos e apoptose das células espermática (Rodriguez, et al., 2004; Du Plessis, et al., 2010) (Figura 3).

Quando a função mitocondrial dos espermatozoides, como em qualquer outra célula, está comprometida, ocorre um vazamento dos elétrons da cadeia respiratória levando a excessiva produção de radicais livres que danificam as organelas e os espermatozoides, que eventualmente, sofrem apoptose (Reiter, et al., 2013). Shang et al. (2004) usando sêmen humano induziram a síntese de radicais livres, e verificaram o aumento na atividade da succinato desidrogenase mitocondrial, a geração de ROS e a redução do potencial de membrana mitocondrial. O grau de alteração de cada um destes parâmetros foi reduzido na presença de melatonina e os autores sugeriram a utilização deste antioxidante em diluentes seminais para proteger os espermatozoides de danos oxidativos.

Essas alterações danosas que prejudicam a funcionalidade espermática e a fertilidade, muitas vezes ocorrem também por contaminantes ambientais (Reiter, et al., 2013). Espermatozoides de ratos, retirados do epidídimo, e incubados com mercúrio apresentaram redução na motilidade e na atividade de enzimas antioxidantes, e aumento na geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e produtos de peroxidação lipídica. Quando coincubados com melatonina (mercúrio + melatonina) todas as mudanças induzidas pelo metal pesado foram revertidas para os níveis encontrados em espermatozoides normais (Rao & Gangadharan, 2008). Outra questão ambiental são os pesticidas organofosforados utilizados em lavouras e que podem levar a alterações no genoma celular. Roedores tratados com *Diazinon*, um pesticida muito utilizado

para controlar insetos em culturas de frutas e legumes, apresentaram extensa ruptura do DNA e da cromatina em espermatozoides epididimários. Porém, quando a melatonina foi administrada antes do fornecimento do pesticida, os danos ao DNA foram drasticamente diminuídos (Sarabia, et al., 2009).

**Figura 3.** ações da melatonina reduzindo radicais livres. A melatonina estimula muitas enzimas antioxidantes incluindo a superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GRd) e glutamiliglicina ligase (GCL); e também, inibe enzimas pró-oxidativas como, óxido nítrico sintase (NOS). O radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) são referidos como espécies reativas de oxigênio (ROS), e o óxido nítrico (NO) e ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) são referidos como espécies reativas de nitrogênio (RNS).



Fonte: Adaptado de Reiter, et al., (2013).

Os profissionais que trabalham em locais de altas altitudes, como pilotos de aeronaves, estão sempre submetidos à hipóxia, que pode danificar os espermatozoides (Tamme, et al., 2010), principalmente, os que estão concentrados na cauda do epidídimo (Kurcer, et al., 2010).

Uma vez que os efeitos danosos causados pela isquemia/reperfusão sanguínea são principalmente uma consequência da geração excessiva de radicais livres, a capacidade da melatonina de diminuir os danos dos espermatozoides no epidídimo foi atribuída à atividade de eliminação de radicais livres de forma direta (Reiter, et al., 2013). Roedores expostos a altas altitudes (4500 m acima do nível do mar) por 33 dias resultaram em aumento de teratozoospermia (teratospermia), assim como, elevada peroxidação lipídica e danos ao DNA. A administração regular de melatonina em condições de hipóxia amenizou parcialmente as ações destrutivas do ambiente de baixo oxigênio (Vargas, et al., 2011).

Quando espermatozoides de humanos foram incubados com 2 mM de melatonina *in vitro*, durante 120 min. e avaliados posteriormente, a porcentagem de espermatozoides móveis, com mobilidade progressiva e rápida foram todos elevadas (Du Plessis, et al., 2010). Estas alterações foram acompanhadas por um aumento na viabilidade do esperma analisado por meio de sonda fluorescente Iodeto de Propídio (IP), o qual passa pelas membranas celulares de células lesionadas ou com metabolismo deficiente, corando o DNA. No mesmo trabalho, a melatonina também reduziu as concentrações de óxido nítrico no esperma, mas não na geração de ROS.

Na produção de “semen sexado”, os espermatozoides que carregam os cromossomos X e Y são separados por citometria de fluxo para produzir um sêmen comercial que permite o nascimento de crias com o sexo desejado (Johnson, 2000). No entanto, a taxa de prenhez ao utilizar este tipo de sêmen é menor que a aquela obtida ao se utilizar o sêmen convencional, pois o processo de sexagem, e também de criopreservação logo após, produzem muitos radicais livres que comprometem a funcionalidade do esperma (Agawal & Probakaran, 2005). Li et al. (2012) usaram melatonina como protetor do esperma de búfalos Nili-Ravi durante o processo de sexagem. Eles concluíram que a melatonina no diluidor de sêmen, devido a sua capacidade de sequestrar efetivamente espécies reativas de oxigênio, é altamente útil ao proteger os espermatozoides de búfalos durante a coloração, classificação (processo de sexagem) e congelamento. Eles também previram que espermatozoides bubalinos tratados com melatonina teriam uma melhor capacidade de fertilização e taxas de prenhez aumentadas após a transferência de embriões ou inseminação artificial.

### **3.7 Melatonina e conservação do sêmen**

A criopreservação espermática é realizada em várias espécies, porém o processo de congelamento e descongelamento causam danos moleculares e prejudicam a capacidade



fertilizadora dos espermatozoides. A melatonina já foi utilizada em vários trabalhos para preservar a qualidade e viabilidade espermática durante a estocagem.

Succu et al. (2011) adicionaram melatonina (em concentrações de 0,001 a 1 mM) no diluente de congelação de carneiros para determinar se a presença da indolamina iria diminuir os danos celulares e melhorar a qualidade dos espermatozoides após o descongelamento. Na concentração de 1 mM, a melatonina apresentou, após o descongelamento, as maiores porcentagens de espermatozoides móveis, de motilidade progressiva, de espermatozoides com velocidade média rápida e média, altas concentrações de ATP intracelular e maior integridade do DNA. Além disso, os oócitos fertilizados por espermatozoides tratados com melatonina exibiram maiores taxas de clivagem do que aqueles fertilizados por espermatozoides de carneiro congelados sem melatonina. Como a criopreservação do sêmen está associada a produção de elevadas concentrações de reagentes tóxicos, incluindo ROS e RNS (Ortega Ferrusola, et al., 2009), a melatonina agiria como um antioxidante contribuindo para diminuir os danos contra o espermatozoide.

Além da adição de melatonina no diluente de criopreservação, também já foram utilizados em carneiros implantes subcutâneos de melatonina durante e fora da estação reprodutiva, e após a coleta e criopreservação, a qualidade do ejaculado foi avaliada (Kaya, et al., 2001). Os resultados mostraram que a melatonina melhorou a viabilidade pós-descongelamento durante a estação reprodutiva, e melhorou, em ambas as fases reprodutivas, as taxas de acrossomos intactos. Assim, o sêmen de carneiros tratados com melatonina antecipadamente parece ser mais bem conservado durante a criopreservação (Reiter, et al., 2013).

Em suínos, a melatonina na concentração de 1  $\mu$ M foi adicionada ao sêmen com o objetivo de aumentar a vida útil do espermatozoide refrigerado (a 17 °C) (Martin-Hildago, et al., 2011). Após os períodos de 1, 4 ou 7 dias, foram analisados os parâmetros referentes a motilidade total e progressiva por análise computacional. Também foram analisados por citometria fluxo, o estado de potencial de membrana mitocondrial com JC-1, a viabilidade celular com IP, a fluidez da membrana (que inversamente se correlaciona com o grau de peroxidação lipídica) (Garcia, et al., 1997) com M-540/YoPro-1, e o estado do acrossoma com FITC-PNA/PI. No dia 7, o número de espermatozoides estáticos aumentou e a porcentagem de espermatozoides móveis progressivos foi reduzida. As características de velocidade (velocidade curvilínea, a velocidade em linha reta, e a velocidade média de precursor) foram elevadas pelo tratamento de melatonina. As medidas de citometria documentaram que a melatonina aumentou a porcentagem de espermatozoides viáveis com acrossoma intacto e uma

porcentagem significativamente maior de espermatozoides permanecendo viáveis durante o período de armazenamento de 7 dias.

### 3.8 Melatonina como redutora de apoptose

Casao et al. (2010c) investigou se o ejaculado de carneiro durante a estação não-reprodutiva, incubado com melatonina nas concentrações 1µM, 10 nM e 100 pM, reduziria a apoptose espermática e melhoraria a qualidade do sêmen, ao avaliar a fertilização *in vitro* (FIV). Os resultados não mostraram influência da melatonina nos parâmetros de motilidade e de viabilidade espermática, porém, na concentração de 1 µM, a melatonina diminuiu a capacitação e a translocação de fosfatidilserina (marcador utilizado para estudar o fenômeno apoptótico). Por outro lado, a 100 pM melatonina aumentou a capacitação em curto prazo, o que levou a elevadas taxas de fertilização e clivagem de oócitos na fertilização *in vitro*.

Em equinos, a incubação a 37 °C por 3 horas, do sêmen com melatonina (0, 50 pM, 100 pM, 200 pM ou 1 µM) mostrou redução nas alterações que estão normalmente associados com apoptose (aumento da permeabilidade da membrana plasmática e do baixo potencial de membrana mitocondrial), além de baixas concentrações de produtos de peroxidação lipídica e uma maior fluidez (menos rigidez) das membranas plasmáticas dos espermatozoides (Silva, et al., 2011). A peroxidação dos lipídeos é considerada como um grave risco durante a criopreservação de esperma e a sua redução com a melatonina, juntamente com os melhoramentos funcionais relacionados, é altamente notável. Eles concluíram que as ações protetoras da melatonina foram uma consequência de suas ações diretas no sequestro de radicais livres e indiretas na estimulação de enzimas antioxidantes (provavelmente receptor-mediado).

Em trabalhos com sêmen humano (Espino, et al., 2010), a melatonina foi testada quanto à sua capacidade para proteger os espermatozoides humanos da apoptose depois da exposição à agentes tóxicos. Após a sua incorporação, a melatonina inibiu o aumento da atividade das caspase-3 e caspase-9, que são essenciais para a realização do processo apoptótico, além de reduzir a externalização da fosfatidilserina que é um dos primeiros eventos da apoptose, e também dos níveis de radicais livres que podem levar a morte das células. Assim, como as técnicas de reprodução assistida induzem a produção de radicais livres e apoptose, e com base nos dados já descobertos por outros pesquisadores, Espino et al. (2010) também sugeriram a possibilidade de utilização de melatonina como um componente do meio de armazenamento para a preservação espermática, devido as suas atividades antioxidante e anti-apoptótica.

### **3.9 Melatonina como indutor da capacitação e hiperativação espermática e reação acrossômica**

A capacitação espermática é um processo de modificação estrutural e funcional necessário que o espermatozoide deve passar para obter a capacidade de fertilizar os oócitos. Essas modificações ocorrem ao nível molecular da membrana plasmática e resultam em alterações morfológicas (reação acrossômica) e fisiológicas (hiperativação do flagelo), sendo todo o processo dependente de alterações da permeabilidade da membrana ligadas ao transporte dos íons  $Ca^{2+}$ . A reação acrossômica é caracterizada pela fusão entre a membrana plasmática e a acrossomal externa, resultando em formação de vesículas e permitindo a liberação de enzimas do conteúdo acrossômico (Bendahmane, et al., 2001). Já a hiperativação, caracteriza-se por mudanças no padrão do batimento flagelar, fato que facilita a penetração dos espermatozoides através dos diversos envoltórios dos oócitos (Fujinoki, et al., 2006).

A hiperativação após a adição de melatonina foi observada em espermatozoides de suínos (Martin-Hidalgo, et al., 2011) e de hamsters (Fujinoki, 2008). A hiperatividade nos estágios iniciais de armazenamento pode ter sido resultado de uma elevada síntese de ATP, já que a melatonina pode promover a eficiência do complexo mitocondrial e a produção de ATP (Martin, et al., 2000; Martin, et al., 2002; Leon, et al., 2004). Devido à sua elevada solubilidade lipídica, a melatonina passa facilmente através do plasmalema de células e entra nas mitocôndrias (Jou, et al., 2007). Algumas das ações da melatonina sobre a motilidade do esperma também podem ter sido uma consequência de sua interação com a calmodulina (Pozo, et al., 1997; Benitez-King & Anton-Tay, 1993) que, entre as suas várias funções, influencia elementos do citoesqueleto, e assim, regula a motilidade dos espermatozoides (Reiter, et al., 2013).

Fujinoki (2008) sugeriu que a melatonina produzida no ovário serviria como o agente de ativação para os espermatozoides no trato reprodutivo feminino. No entanto, como a melatonina é sintetizada em vários tecidos do trato reprodutivo feminino, a fonte deste hormônio que auxilia na hiperativação do esperma no útero e, ou, tuba uterina permanece indefinida (Reiter, et al., 2013). Fujinoki (2008) também descobriu que o tratamento de esperma hamster com luzindol, um antagonista dos receptores de membrana da melatonina, MT1/MT2, bloqueou a hiperativação, enquanto a incubação de espermatozoide com dois diferentes antagonistas para MT2 não conseguiu alterar a resposta hiperativa. Assim, pode-se pressupor que a ação da melatonina sobre a hiperatividade espermática é mediada pelo receptor MT1.

Após a capacitação, os espermatozoides estão aptos a realizarem a fecundação após se

ligarem a Zona Pelúcida que envolve o oócito. Casao et al. (2010) examinaram pelo Teste de Ligação à Zona Pelúcida a habilidade da melatonina em influenciar a fertilidade do espermatozoide. Ao utilizarem o sêmen de carneiros com e sem implantes de melatonina, eles observaram maior facilidade de ligação do espermatozoide ao oócito do sêmen de animais que receberam melatonina. Além disso, ovelhas inseminadas com sêmen de doadores tratados com melatonina, exibiram uma melhoria na fertilidade e fecundidade. Assim, os autores concluíram que o uso de melatonina poderia ser um meio eficaz para melhorar a qualidade do espermatozoide e melhorar a sua capacidade fertilizadora.

### **3.10 O plasma seminal e a sazonalidade**

Em várias espécies, o plasma seminal (PS) contém fatores (íons ou proteínas) que podem influenciar a viabilidade espermática, como por exemplo, mantendo a motilidade espermática (Graham, 1994) ou melhorando a sua viabilidade (Ashworth, et al., 1994). Alguns estudos ainda, demonstram a capacidade do PS de carneiros de reparar a integridade da membrana dos espermatozoides que sofreram choque térmico (Barrios, et al., 2000) e, ou, de evitar crioinjúrias (Pérez-Pé, et al., 2001). Por outro lado, os efeitos prejudiciais do PS na motilidade, viabilidade, e sobrevivência após o congelamento-descongelamento (Graham, 1994; Pellicer-Rubio & Combarous, 1998) também têm sido relatados. Estes resultados indicam que o PS é uma mistura complexa que contém uma grande variedade de componentes que afetam a sobrevivência e motilidade dos espermatozoides (Domínguez, et al., 2008)

A composição molecular do plasma seminal possui características inerentes a cada espécie, podendo diferir entre os tipos e a atuações das proteínas espermáticas que nele se encontram (Souza, et al., 2009). Ainda se pode considerar a variação sazonal nos níveis de proteínas (Domínguez, et al., 2008), açúcares (Matsuoka, et al., 2006) e íons (Zamiri & Khodaei, 2005).

Além dos componentes adquiridos de forma fisiológica ou endógena, o plasma seminal pode ainda adquirir moléculas e, ou, estruturas do ambiente após a sua ejaculação. Azawi e Ismaeel (2012) observaram que houve um significativo efeito sazonal na contagem bacteriana do sêmen de carneiros, sendo maior no meio do verão e no outono, ou seja, no período da estação reprodutiva. Esses microrganismos podem prejudicar a qualidade do sêmen ejaculado, principalmente se for utilizado para criopreservação (Azawi & Ismaeel, 2012). Além de serem causas de doenças, eles podem alterar o equilíbrio osmótico do meio, produzir substâncias tóxicas aos espermatozoides, e diminuir os nutrientes destinados às células espermáticas

contidos nos meios de conservação. As bactérias mais frequentemente isoladas no sêmen de carneiro são *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis* e *Staphylococcus aureus* (Yániz, et al., 2010). Como essas espécies necessitam de uma temperatura ótima para crescimento entre 25 e 45 °C, acredita-se que o aumento da temperatura e de possíveis secreções uretrais na época da estação, estimule o crescimento bacteriano na mucosa do pênis (Azawi & Ismaeel, 2012).

A presença ou ausência de determinadas substâncias do plasma seminal que sustentam as células espermáticas, ou seja, mantêm sua integridade funcional e fisiológica, podem influenciar na eficiência da fertilização. Essas funções de auxílio e preservação do ambiente ideal para os espermatozoides são realizadas por essas substâncias plasmáticas tanto internamente, no armazenamento dos espermatozoides na cauda do epidídimo, quanto após a ejaculação, através da criação de um microambiente favorável para o movimento de espermatozoides (Evans & Maxwell, 1987). Assim, as informações sobre a variação sazonal da composição do plasma seminal podem ser utilizadas na produção de soluções utilizadas como diluentes ou como meio de armazenamento de espermatozoides (Zamiri, et al., 2010).

Alguns íons, como, o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  e  $\text{K}^{+}$  ajudam estabelecer o equilíbrio osmótico do plasma seminal, e também são elementos essenciais nos componentes de muitas enzimas (Zamiri & Khodaei, 2005). Portanto, a análise bioquímica do plasma seminal pode ser importante para a avaliação da qualidade espermática dos machos reprodutores. Zamiri et al. (2010) observaram níveis mais baixos de  $\text{K}^{+}$  e  $\text{Na}^{+}$  no fluido seminal de carneiros na contra-estação (72,7 e 70,2 mg/dL, respectivamente), que na estação reprodutiva (94,1 e 72,4 mg/dL, respectivamente). Ainda foi observado que a correlação da percentagem de espermatozoides vivos e da motilidade espermática com o nível seminal de  $\text{K}^{+}$  ( $r= 0,61$  e  $0,49$ , respectivamente) e nível de  $\text{Na}^{+}$  ( $r= 0,48$  e  $0,34$ , respectivamente) foram positivas (Zamiri, et al., 2010). Assim, quanto maior a presença destes elementos no plasma seminal, possivelmente melhor será a qualidade e viabilidade espermática.

Diluentes seminais a base de gema de ovo ou leite para congelamento de espermatozoides usualmente contêm glicose ou frutose. No sêmen ejaculado, a frutose é o maior sacarídeo presente, e tem um papel no metabolismo do espermatozoide, o qual a utiliza para produção de adenosina trifosfato (ATP) (Kamp, et al., 1996; Rigau, et al., 2001; Rigau, et al., 2002). A frutose é sintetizada a partir da glicose sanguínea pelas glândulas acessórias, que são estimuladas pela testosterona (Kumar & Farooq, 1994). O sêmen de Carneiros da raça Sulfock foi coletado durante o curso de um ano e as mudanças sazonais nas concentrações de frutose no plasma seminal, e de glicose e testosterona no plasma sanguíneo foram analisadas. A

concentração de frutose aumentou na estação reprodutiva, com o máximo em outubro (179,8 mg/dL) e o mínimo na primavera (6,9 mg/dL). A concentração plasmática de glicose e testosterona em (79,3 mg/dL e 10,2 ng/mL) foi também significativamente maior na estação reprodutiva do que na contra estação (52,1 mg/dL e 1,8 ng/mL). Desta forma, a constatação de mudanças sazonais dos níveis de frutose no plasma seminal durante o ano, pode auxiliar na determinação da apropriada concentração deste carboidrato a ser adicionada nos diluentes seminais (Matsuoka, et al., 2006).

Um recente estudo (Casao, et al., 2010b) demonstrou também a presença sazonal da melatonina no plasma seminal de carneiros, e suas correlações positivas com os níveis de testosterona e com a atividade de enzimas antioxidantes no mesmo fluido. O tratamento com melatonina exógena em carneiros durante a estação não reprodutiva modificou o perfil do plasma seminal ao aumentar a melatonina endógena, testosterona e  $17\beta$  estradiol, e também a presença de enzimas antioxidantes como a glutadiona peroxidase e redutase (Casao, et al., 2013). Assim, as diferenças sazonais na qualidade espermática e na fertilidade de carneiros pode ser devido à presença de melatonina no plasma seminal agindo diretamente nos espermatozoides (Casao, et al., 2010c) através da ligação com seus receptores de membrana (Casao, 2012), ou variando a composição do plasma seminal.

Como relatado anteriormente, algumas funções do plasma seminal nem sempre promovem a melhoria e conservação das células espermáticas. Neste caso, ele pode afetar a qualidade do sêmen e a capacidade de fertilização devido a atividade de alguns elementos que o compõe (Maxwell, et al., 2007).

Em caprinos, o plasma seminal tem um efeito negativo sobre a sobrevivência dos espermatozoides quando são utilizados diluente a base de gema de ovo (Roy, 1957; Iritani & Nishikawa, 1963). Essa interferência é causada por uma enzima conhecida como coaguladora de gema de ovo (EYCE), uma fosfolipase A secretada pelas glândulas bulbouretral (Iritani & Nishikawa, 1963). Essa enzima hidrolisa os triglicerídeos das membranas plasmáticas dos espermatozoides e as tornam mais fusogênica, induzindo assim à reação acrossômica (Upreti, et al., 1999). Além disso, ela também hidrolisa a lecitina da gema do ovo em lisolecitina que é tóxica aos espermatozoides (Pellicer-Rubio & Combarous, 1998), e induz a condensação da cromatina (Sawyer & Brown, 1995). Somado a isso, tem sido demonstrado que a atividade das glândulas sexuais acessórias em ruminantes aumenta durante a época de reprodução (Santiago-Moreno, et al., 2005), sendo uma característica negativa para as células espermática no processo de criopreservação durante este período.

Lavar amostras de sêmen caprino antes do processo de congelação, no entanto, é um

processo demorado e que pode danificar as células se realizado de forma inadequada. Alguns trabalhos indicam que a remoção do plasma seminal é necessária para maximizar a motilidade e preservar a integridade acrossomal na descongelação (Memon et al, 1985; Ritar & Salamon, 1991), enquanto outros relatam resultados positivos para o sêmen congelado sem passar pelo processo de lavagem (Azerêdo et al, 2001; Ritar & Salamon, 1982). Coloma et al. (2010) ao remover o plasma seminal de bodes (*Capra pyrenaica*) observou o efeito benéfico durante a época de fotoperíodo decrescente, mostrando que o sêmen caprino apresenta um aumento da atividade fosfolipase durante a época da estação reprodutiva. Desta forma, os efeitos negativos da congelação-descongelação sobre a qualidade espermática (motilidade, integridade da membrana plasmática e do acrossoma) foram mais graves nas amostras de sêmen não lavadas do que naquelas da qual foi removido o plasma seminal.

No entanto, ao se analisar as possíveis funções e ações do plasma seminal, será observada a importância da sua presença, no que se diz respeito à conservação da qualidade espermática, principalmente, quando criopreservado.

Como descrito anteriormente, em países de regiões com clima temperado, a estação reprodutiva é determinada pelo fotoperíodo, o qual regula a secreção de gonadotrofinas, e estas modulam as gônadas dos animais sazonais. Já nas regiões tropicais e subtropicais, os caprinos se reproduzem em todas as épocas do ano, pois não sofrem interferência do fotoperíodo, porém os fatores ambientais, tais como alimentação e temperatura, regulam os períodos reprodutivos (Malpaux, 2006). De Souza et al. (2009), ao estudarem o plasma seminal de bodes da raça Alpina no Nordeste do Brasil, observaram que o sêmen de melhor qualidade e um grupo de proteínas de 13 kDa e 45 kDa foram encontrados somente no período de alto índice pluviométrico. Assim, eles concluíram que o aumento das chuvas e, conseqüentemente, de alimentos, estimularia a síntese de proteínas do PS que influenciariam positivamente na qualidade do sêmen.

Várias proteínas do plasma seminal são aderidas à superfície do esperma ejaculado (Metz, et al., 1990; Desnoyers & Manjunath, 1992; Amann, et al., 1999), mantendo a estabilidade da membrana plasmática do espermatozoide até a capacitação, que se inicia no trato reprodutivo da fêmea (Cross, 1996) e é um pré-requisito para a fertilização (Desnoyers & Manjunath, 1992). Vários componentes do PS previnem e revertem danos causados pelo choque térmico na membrana espermática e melhoram a viabilidade e fertilidade do sêmen congelado-descongelado (Barrios, et al., 2000; Barrios, et al., 2005; Fernandez-Juan, et al., 2006). Em bovinos, esse grupo de proteína é chamado de “proteínas plasmáticas seminais bovinas” (BSP) ou (PDC-109), sendo as mais estudadas as BSP A1/A2. Proteínas homólogas

às encontradas em bovinos foram descobertas em caprinos (GSP 14/15 kDa) (Villemure, et al., 2003) e em ovinos (RSP 15) (Bergeron, et al., 2005). A possibilidade dessas proteínas, influenciadas pelo fotoperíodo, serem sintetizadas em diferentes níveis durante o ano levou Domínguez et al. (2008) a realizarem um estudo onde se incluiu o plasma seminal de diferentes épocas do ano de carneiros no diluente de congelação, com o objetivo de se prevenir ou reverter os danos causados pelo choque térmico durante o processo de criopreservação/descongelação. As proteínas do plasma seminal que se ligam aos espermatozoides foram afetadas pela estação, uma vez que a inclusão do plasma seminal do outono (estação reprodutiva) aumentou a motilidade espermática, diferentemente dos plasmas seminais coletados na primavera ou verão (Domínguez, et al., 2008).

#### **4. Considerações Finais**

A melatonina é um hormônio sintetizado principalmente durante o período de escuro e pode influenciar na fisiologia reprodutiva do macho de forma direta ou indireta. Esse hormônio pode tanto regular a síntese de gonadotrofinas e estas agirem nos testículos estimulando a esteroidogênese e gametogênese, quanto pode agir diretamente nos órgãos reprodutores e plasma seminal. A síntese de melatonina aumenta durante a estação reprodutiva dos caprinos e ovinos, a qual segue um padrão sazonal anual regulada pelo fotoperíodo. Apesar do volume seminal, da qualidade seminal e da concentração de testosterona serem maiores na estação reprodutiva (final do verão e outono), os menores valores destes parâmetros nas outras épocas do ano não são responsáveis por mudanças na qualidade e quantidade do sêmen que possam prejudicar a fertilização. No entanto, o conhecimento destas variações sazonais auxilia nas tomadas de decisões zootécnicas.

Os autores sugerem que em trabalhos posteriores sobre a fisiologia da reprodução do macho que estão sob influência da luminosidade ambiental, também sejam abordados os animais selvagens e outros animais domésticos, podendo compará-los aos pequenos ruminantes.

#### **Referências**

Abecia, J. A., Forcada, F., González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130, 173-179.



Agawal, A., Probakaran, A. S. (2005). Mechanism, measurements, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43, 963–974.

Aguirre, V., Orihuela, A., Vázquez, R. (2007). Effect of semen collection frequency on seasonal variation in sexual behaviour, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair rams (*Ovis aries*). *Tropical Animal Health and Production*, 39, 271–277.

Ahmad, N., Noakes, D. E. (1996). Seasonal variations in the semen quality of young british goats. *British Veterinary Journal*, 152, 225-236.

Amann, R. P., Hammerstedt, R. H., Shabanowitz, R. B. (1999). Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases binding to an egg-membrane substrate. *Journal of Andrology*, 20, 34–41.

Ashworth, P. J., Harrison, R. A., Miller, N. G., Plummer, J. M., Watson, P. F. (1994). Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, 6, 173–80.

Avdi, M., Banos, G., Stefos, K., Chemineau, P. (2004). Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. *Theriogenology*, 62, 275–282.

Azawi, O. I., Ismaeel, M. A. (2012). Effects of seasons on some semen parameters and bacterial contamination of Awassi ram Semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 403-406.

Azerêdo, G. A., Esper, C. R., Resende, K. T. (2001). Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research*, 41, 257–263.

Barbosa, O. R., Tutida, L., Hubler, M. R. N. O., Akimoto, L. S., Moraes, G. V. (1999). Influência das estações do ano nas concentrações séricas de 3,5,3' triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e testosterona (Tes) de carneiros. *Acta Scientiarum*, 21(3), 599-605.

Barkawi, A. H., Elsayed, E. H., Ashour, G.; Shehata, E. (2006). Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Ruminant*

*Research*, 66, 209–213.

Barrios, B.; Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A.; Osada, J.; Muiño-Blanco, Cebrián-Pérez, J. A. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 63, 1531–1537.

Barrios, B.; Fernández-Juan, M., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. A. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*, 26, 539–549.

Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P. (2005). Isolation and Characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, 71, 461–470.

Bendahmane, M., Lynch, C., Tulsiani, D. R. P. (2001). Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 390, 1–8.

Benitez-King, G., Anton-Tay, F. (1993). Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, 49, 35–41.

Boggio, V., Cutrera, R., Carbone, S., Scacchi, P., Ponzo, O. J. (2013). Leptin inhibits the reproductive axis in adult male Syrian hamsters exposed to long and short photoperiod. *Reproductive Biology*, 13, 203–208.

Casao, A., Luna, C.; Serrano, E. (2009). Quantification of melatonin on oxidized proteins and lipids in ram Semen in the breeding and non-breeding season. *XIII Jornadas sobre Produccion Animal, AIDA: Zaragoza, Spain*, 723–725.

Casao, A., Veja, S., Palacín, I., Pérez-Pé, R., Laviña, A., Quintín, F. J., Sevilla, E., Abecia, J. A.; Cebrián-Pérez, J. A., Forcada, F., Muiño-Blanco, T. (2010). Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in *Rasa Aragonesa* rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 425–432.

Casao, A., Cebrián, I., Asumpção, M. E., Pérez-Pé, R., Abecia, J. A., Forcada, F., Pérez-Cebrián, J. A., Muiño-Blanco, T. (2010b). Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(59), 1-9, 2010.

Casao, A., Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Grasa, P., Abecia, J. A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T. (2010c). Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *Journal of Pineal Research*, 48, 39–46.

Casao, A., Gallego, M., Abecia, J. A., Forcada, F., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J. A. (2012). Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in *Rasa aragonesa* ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 953–961.

Casao, A., Pérez-Pé, R., Abecia, J. A., Forcada, F., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. A. (2013). The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of *Rasa Aragonesa* rams. *Animal Reproduction Science*, 138, 168–174.

Chaves, E. M., Aguilera-Merlo, C., Cruceño A., Fogal, T., Piezzi, R., Scardapane, L.; Dominguez, S. (2012). Seasonal morphological variations and age-related changes of the seminal vesicle of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): an ultrastructural and immunohistochemical study. *The Anatomical Record*, 295, 886–895.

Chenoweth, P. J. (1981). Libido and mating behavior in bulls, boars and rams. A review. *Theriogenology*, 16, 155-177.

Clarke, I. J., Smith, J. T., Caraty, A., Goodman, R. L., Lehman, M. N. (2009). Kisspeptin and seasonality in sheep. *Peptides*, 30, 154-163.

Coloma, M. A., Toledano-Díaz, A., López-Sebastian, A., Santiago-Moreno, J. (2010). The influence of washing Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm on the effects of cryopreservation in dependency of the photoperiod. *Theriogenology*, 73, 900–908.

Cross, N. L. (1996). Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biology of Reproduction*, 54, 138–45.

Desnoyers, L., Manjunath, P. (1992). Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 10149–10155.

Dickson, K. A., Sanford, L. M. (2005). Breed diversity in FSH, LH and testosterone regulation of testicular function and in libido of young adult rams on the south eastern Canadian prairies. *Small Ruminant Research*, 56, 189–203.

Domínguez, M. P., Falcinelli, A., Hozbor, F., Sánchez, E., Cesari, A., Alberio, R. H. (2008). Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, 69, 564–573.

Du Plessis, S. S., Hageenaar, K., Lampiao, F. (2010). The *in vitro* effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia*, 42, 112–116.

Escott, G. M., Da Rosa, L. A., Loss, E. S. (2011/2). Regulação hormonal do transporte de glicose e aminoácido e sua relação com as funções e o desenvolvimento das células de Sertoli: uma revisão. *Ciência em Movimento*, 27, 85-98.

Espino, J., Bejarano, I., Ortiz, A., Lozano, G. M., Garcia, J. F., Pariente, J. A.; Rodriguez, A. B. (2010). Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 94, 1915–1917.

Evans, G., Maxwell, W. M. C. (1987). Artificial insemination of sheep and goats. *Butterworth Publishers*, 53, 25-29.

Fernandez-Juan, M., Gallego, M., Barrios, B., Osada, J.; Cebrián-Pérez, J. A.; Muñio-Blanco, T. (2006). Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. *Journal of Andrology*, 27, 588–595.

Fujinoki, M., Suzuki, T., Takayama, T., Shibahara, H., Ohtake, H. (2006). Profiling of proteins

phosphorylated or dephosphorylated during hyperactivation via activation on hamster spermatozoa. *Reproduction Medicine and Biology*, 5, 123–135.

Fujinoki, M. (2008). Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction*, 136, 533–541.

Garcia, J. J., Reiter, R. J., Guerrero, J. M., Escames, G., Yu, B. P., Oh, C. S., Muñoz-Hoyos, A. (1997). Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Letters*, 408, 297–300.

Gardner, D. L.; Hafez, E. S. E. (2004). Espermatozoide e plasma seminal. In: Hafez, E. S. E. & Hafez, B. (Ed.) *Reprodução Animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 97-110.

Graham J. (1994). Effect of seminal plasma on the motility of the epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*, 41, 1151–1162.

Goldman, B. D. (2001). Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*, 16, 283-301.

Gündogan, M. (2007). Seasonal variation in serum testosterone, T3 and andological parameters of two Turkish sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 67, 312-316.

Iritani, A.; Nishikawa, Y. (1963). Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen; IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 8, 113–117.

Itoh, M. T.; Ishizuka, B.; Kuribayashi, Y.; Amemiya, A.; Sumi, Y. (1999). Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, 5, 402–408.

Johnson, L. A. (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 93–107, .

Jou, M. J.; Peng, T. I.; Yu, P. Z.; Jou, S. B.; Reiter, R. J.; Chen, J. Y.; Wu, H. Y.; Chen, C. C.; Hsu, L. F. (2007). Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *Journal of Pineal Research*, 43, 389–403.

Kafi, M.; Safdarian, M.; Hashemi, M. (2004). Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Small Ruminant Research*, 53, 133–139.

Kamp, G.; Busselmann, G.; Lauterwein, J. (1996). Spermatozoa: models for studying regulatory aspects of energy metabolism. *Experientia*, 52, 487-494.

Karagiannidis, A.; Varsakeli, S.; Alexopoulos, C.; Amarantidis, I. (2000). Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research*, 37, 125-130.

Karaginnidis, A.; Varsakeli, S.; Karatzas, G. (2000). Characteristics and seasonal variations in the semen of alpine, seamen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, 53, 1285-1293.

Kaya, A.; Aksoy, M.; Baspinar, N.; Yildiz, C.; Ataman, M. B. (2001). Effect of melatonin implantation to sperm donor rams on post-thaw viability and acrosomal integrity of sperm cells in the breeding and non-breeding season. *Reproduction in Domestic Animals*, 36, 211–215.

Kumar, A.; Farooq, A. (1994). Effect of oxytocin on the concentration of fructose in the accessory glands of mouse. *Life Sciences*, 55, 19-24.

Kurcer, Z.; Hekimoglu, A.; Aral, F.; Baba, F.; Sahna, E. (2010). Effect of melatonin on epididymal sperm quality after testicular ischemia/reperfusion in rats. *Fertility and Sterility*, 93, 1545–1549.

Leon, J.; Acuña-Castroviejo, D.; Sainz, R. M.; Mayo, J. C.; Tan, D. X.; Reiter, R. J. (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Sciences*, 75, 765–790.

Li, L.; Xu, J. N.; Wong, Y. H.; Wong, J. T. Y.; Pang, S. F.; Shiu, S. Y. W. (1998). Molecular and cellular analyses of melatonin receptor-mediated cAMP signaling in rat corpus epididymis. *Journal of Pineal Research*, 25, 219–228.

Li, L.; Wong, J. T. Y.; Pang, S. F.; Shiu, S. Y. W. (1999). Melatonin-induced stimulation of rat corpus epididymal epithelial cell proliferation. *Life Sciences*, 65, 1067–1076, .

Li, X. X.; Yang, X. G.; Lu, Y. Q.; Lu, S. S.; Zhang, M.; Yao, H. I.; Meng, L. J.; Lu, K. H. (2012). Protective effects of melatonin against oxidative stress in flow cytometry-sorted buffalo sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 299–307.

Lincoln, G. A.; Lincoln, C. E.; Mcneilly, A. S. (1990). Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88, 623-633.

Lincoln, G. A.; Clarke, I. J. (1997). Refractoriness to a static melatonin signal develops in the pituitary gland for the control of prolactin secretion in the ram. *Biology of Reproduction*, 57, 460–467.

Martin, M.; Macías, M.; Escames, G.; Reiter, R. J.; Agapito, M. T.; Ortiz, G. G.; Acuña-Castroviejo, D. (2000). Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *Journal of Pineal Research*, 28, 242–248.

Martin, M.; Macías, M.; León, J.; Escames, G.; Khaldy, H.; Acuña-Castroviejo, D. (2002). Melatonin increases the activity of oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34, 348–357.

Martin-Hildago, D.; Barón, F. J.; Bragado, M. J.; Carmona, P.; Robina, A.; García-Marín, L. J.; Gil, M. C. (2011). The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. *Theriogenology*, 75, 1550–1560.

Malpoux, B.; Migaud, M.; Tricoire, H.; Chemineau, P. (2001). Biology of mammalian photoperiodism and critical role of pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, 16, 336-347.

Malpoux, B. (2006). Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: NEILL, J. D. & Knobil, E. (Ed.). *Physiology of Reproduction*. 3. ed. London: Elsevier, 2231–2281.

Matsuoka, T.; Imai, H.; Asakuma, S.; Kohno, H.; Fukui, Y. (2006). Changes of fructose concentrations in seminal plasma and glucose and testosterone concentrations in blood plasma in rams over the course of a year. *Journal of Reproduction and Development*, 52(6), 805-810.

Maxwell, W. M. C.; Graaf, S. P.; Ghaoui, R. E. H.; Evans, G. (2007). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society for Reproduction and Fertility. Supplement*, 64, 13–38.

Memon, M. A.; Bretzlaff, K. N.; Ott, R. S. (1985). Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 473–475.

Metz, K. W.; Berger, T.; Clegg, E. D. (1990). Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. *Theriogenology*, 34, 691–700.

Nagy, P.; Guillaume, P.; Daels, P. (2000). Seasonality in mares. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 245-262.

Odonnell, L.; Mclachlan, R. I.; Wreford, N. G.; Robertson, D. M. (1994). Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology*, 135, 2608-2614.

Ortega Ferrusola, C.; González Fernández, L.; Macías García, B.; Salazar-Sandoval, C.; Morillo Rodríguez, A.; Rodríguez Martínez, H.; Tapia, J. A.; Peña, F. J. (2009). Effect of cryopreservation on nitric oxide production in stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 81, 1106–1111.



Pelletier, J.; Almeida, G. (1987). Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 34, 215–226.

Pellicer-Rubio, M. T., Combarrous, Y. (1998). Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Journal of Reproduction and Fertility*, 112, 95–105.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Recuperado de [https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic\\_Computacao\\_MetodologiaPesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_MetodologiaPesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1).

Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J. A.; Muiño-Blanco, T. (2001). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, 56, 425–434.

Pozo, D.; Reiter, R. J.; Calvo, J. R.; Guerrero, J. M. (1997). Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 65, 430–442.

Rao, M. V.; Gangadharan, B. (2008). Antioxidant potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 22, 935–942.

Reiter, R. J. (1975). Exogenous and endogenous control of the annual reproductive cycle in the male golden hamster: participation of the pineal gland. *Journal of Experimental Zoology*, 191, 111–120.

Reiter, R. J.; Rosales-Corral, S. A.; Manchester, L. C.; Tan, D. X. (2013). Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 7231-7272.

Rigau, T.; Farré, M.; Ballester, J.; Mogas, T.; Peña, A.; Rodríguez-Gil, J. E. (2001). Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, 56, 801-815.

Rigau, T.; Rivera, M.; Palomo, M. J.; Fernández-Novell, J. M.; Mogas, T.; Ballester, J.; Peña, A.; Otaegui, P. J.; Guinovart, J. J.; Rodríguez-Gil, J. E. (2002). Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*, 123, 579-591.

Ritar, A. J.; Salamon, S. (1991). Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Ruminant Research*, 4, 29–37.

Ritar, A. J., Salamon, S. (1982). Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 35, 305–312.

Roca, J.; Martinez, E.; Vazquez, J. M.; Coy, P. (1992). Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Animal Reproduction Science*, 29, 255-262.

Rodriguez, C.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Antolín, I.; Herrera, F.; Martín, V.; Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal Pineal Research*, 36, 1–9.

Rosa, H. J. D.; Juniper, D. T.; Bryant, M. J. (2000). Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentrations, sexual behavior and ability to induce ovulation in seasonally anestrous ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120, 169–176.

Rosa, H. J. D.; Bryant, M. J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, 48, 155–171.

Roselli, C. E.; Stormshak, F.; Stellflug, J. N.; Resko, J. A. (2002). Relationship of serum testosterone concentrations to mate preferences in rams. *Biology of Reproduction*, 67, 263-268.

Roy, A. (1957). Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, 179, 318–319.

Santiago-Moreno, J., Gómez-Brunet, A., González-Bulnes, A., Toledano-Díaz, A., Malpoux, B.; López-Sebastián, A. (2005). Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. *Domestic Animal Endocrinology*, 28, 416–429.

Sarabia, L., Maurer, I., Bustos-Obregon, E. (2009). Melatonin prevents damage elicited by organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 663–668.

Sarlós, P., Egerszegi, I., Balogh, O., Molnar, A.; Cseh, S.; Ratky, J. (2013). Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Ruminant Research*, 111, 90–95.

Sawyer, D. E., Brown, D. B. (1995). The use on an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reproductive Toxicology*, 9, 351–357.

Shang, X. J., Li, K., Ye, Z. Q.; Chen, Y. G., Yo, X., Huang, Y. F. (2004). Analysis of lipid peroxidative levels in seminal plasma of infertile men by high-performance liquid chromatography. *Archives of Andrology*, 50, 411–416.

Sharpe, R. M., Mckinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J. S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125, 769-784.

Shiu, S. Y.; Li, L.; Siu, S. W.; Xi, S. C.; Fong, S. W.; Pang, S. F. (2000). Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. *Biological Signals and Receptors*, 9, 172–187.

Siegel, S. F., Finegold, D. N., Urban, M. D., Mcvie, R.; Lee, P. A. (1992). Premature pubarche: etiological heterogeneity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 74, 239-247.

Silva, C. M., Marcías-García, B., Miró-Morán, A., González-Fernández, L., Morillo-Rodrigues, A., Ortega-Ferrusola, C., Gallardo-Bolaños, J. M., Stilwell, G., Tapia, J. A.; Peña, F. J. (2011).

Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *Journal of Pineal Research*, 51, 172–179.

Souza, A. F., Leitão, M. C. G., Batista, A. M.; Porto, A. L. F., Lima Filho, J. L., Guerra, M. M. P. (2009). Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. *Ciência Rural*, 39, 1166-1172.

Smith, J. T. (2012). The role of kisspeptina and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 43, 75-84.

Succu, S., Berlinguer, F., Pasciu, V., Satta, V., Leoni, G. G.; Naitana, S. (2011). Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *Journal of Pineal Research*, 50, 310–318.

Tamme, L. A.; Still, D. L.; Acromite, M. T. (2010). Hypoxia and flight performance of military instructor pilots in a flight simulator. *Aviation, Space and Environmental Medicine*, 81, 654–659.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Liu, X., Rosales-Corral, S. A., Castroviejo, D. A., Reiter, R. J. (2013). Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evaluation in eukaryotes. *Journal of Pineal Research*, 54, 127–138.

Todini, L.; Malfatti, A.; Terzano, G. M.; Borghese, A.; Pizzillo, M.; Debenedetti, A. (2007). Seasonality of plasma testosterone in males of four Mediterranean goat breeds and in three different climatic conditions. *Theriogenology*, 67, 627–631.

Tosini, G., Fukuhara, C. (2002). The mammalian retina as a clock. *Cell and Tissue Research*, 309, 119-126.

Upreti, G. C., Hall, E. L., Koppens, D., Oliver, J. E., Vishwanath, R. (1999). Studies on the measurement of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) and PLA<sub>2</sub> inhibitor activities in ram semen. *Animal Reproduction Science*, 56, 107-121.

Vargas, A., Bustos-Obregon, E., Hartley, R. (2011). Effects of hypoxia on epididymal sperm parameters and protective role of ibuprofen and melatonin. *Biological Research*, 44, 161–167.

Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P. (2003). Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1:39.

Webster, J. R., Suttie, J. M., Veenvliet, B. A., Manley, T. R., Littlejohn, R. P. (1991). Effect of melatonin implants in secretion of luteinizing hormone in intact and castrated rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92, 21–31.

Yániz, J. L., Marco-Aguado, M. A., Mateos, J. A., Santolaria, P. (2010). Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Animal Reproduction Science*, 122, 142–149.

Zamiri, M. J., Khodaei, H. R. (2005). Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat-tailed rams. *Animal Reproduction Science*, 88, 245–255.

Zamiri, M. J., Khalili, B., Jafaroghli, M., Farshad, A. (2010). Seasonal variation in seminal parameters, testicular size, and plasma testosterone concentration in Iranian Moghani rams. *Small Ruminant Research*, 94, 132–136.

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Julio Cesar Oliveira Dias – 90%

Cristina Mattos Veloso – 10%