Leonardo Batissaco

Melatonina para o tratamento da degeneração testicular em touros e seus efeitos sobre a bioquímica sérica e do plasma seminal, termodinâmica e hemodinâmica testicular e características espermáticas

São Paulo

2018

LEONARDO BATISSACO

Melatonina para o tratamento da degeneração testicular em touros e seus efeitos sobre a bioquímica sérica e do plasma seminal, termodinâmica e hemodinâmica testicular e características espermáticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3725
FMVZ

Batissaco, Leonardo

Melatonina para o tratamento da degeneração testicular em touros e seus efeitos sobre a bioquímica sérica e do plasma seminal, termodinâmica e hemodinâmica testicular e características espermáticas / Leonardo Batissaco. – 2018.
103 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

1. Melatonina. 2. Estresse térmico. 3. Bovinos. 4. Sêmen. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Melatonina para o tratamento da degeneração testicular em touros e seus efeitos sobre a bioquímica sérica e do plasma seminal, termodinâmica e hemodinâmica testicular e características espermáticas", protocolada sob o CEUA nº 2727170616 (ID 002865), sob a responsabilidade de **Eneiva Carla Carvalho Celeghini e equipe; Leonardo Batissaco; Vinicius José Moreira Nogueira; Vitor Hugo Guilger Gonzaga; Laura Nataly Garcia Oliveros** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 27/10/2016.

We certify that the proposal "Treatment with melatonin in Nelore bulls with testicular degeneration and its changes in serum and seminal plasma biochemistry, testicular thermodynamics and hemodynamics and sperm characteristics.", utilizing 24 Bovines (24 males), protocol number CEUA 2727170616 (ID 002865), under the responsibility of **Eneiva Carla Carvalho Celeghini and team; Leonardo Batissaco; Vinicius José Moreira Nogueira; Vitor Hugo Guilger Gonzaga; Laura Nataly Garcia Oliveros** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/27/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**Vigência da Proposta: de **07/2016** a **07/2017**Área: **Reprodução Animal**Origem: **Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga**Espécie: **Bovinos**sexo: **Machos**idade: **29 a 32 meses**N: **24**Linhagem: **Nelore**Peso: **545 a 660 kg**

Local do experimento: Centro de Biotecnologia da Reprodução Animal (CBRA - VRA) - FMVZ Campus de Pirassununga; Análises do sêmen no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (VRA - FMVZ - USP)

São Paulo, 12 de novembro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BATISSACO, Leonardo

Título: Melatonina para o tratamento da degeneração testicular em touros e seus efeitos sobre a bioquímica sérica e do plasma seminal, termodinâmica e hemodinâmica testicular e características espermáticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre ter iluminado meu caminho, me guiado, iluminado minhas decisões, as pessoas que ele colocou em meu caminho, tudo para cada vez mais me tornar um ser humano melhor, continuar evoluindo nesse mundo e sempre mantendo meus princípios;

À minha mãe, **Maristela**, o amor da minha vida, a mulher que tenho como exemplo de carinho, amor, determinação e bondade, que me criou e me deu amor incondicional sempre, tudo que sou hoje é devido a você, muito obrigado, te amo;

A meu pai, **Alderico**, por ser hoje e sempre meu herói, meu exemplo de vida, meu amigo, por ter me ensinado o valor da vida, a sempre buscar minha felicidade, e sempre fazer de tudo, mesmo fora do alcance, para me ajudar a conquistar tudo na vida, sou muito grato por tudo desde as risadas até as conversas sobre a vida, muito obrigado, te amo;

À minha irmã, **Marina**, por ter sido sempre minha companheira, confidente, e um exemplo de superação, pouco você sabe mas eu sempre me espelho em você para tudo que eu faço, sou seu fã número um, a coroa agora está com você, muito obrigado, te amo;

Aos meus avós (in memoriam), **Francisco, Maria, Francisca e Deolindo**, vocês que foram minha base na infância, que me trazem sentimentos nostálgicos e cheios de saudade, e fizeram grande parte da minha formação, gostaria muito de tê-los aqui para dividir essa conquista, amo vocês;

À **Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini**, minha orientadora, mãe na pós graduação, uma pessoa que a cada dia que passa admiro mais e mais, que me ensina todos os dias sobre muito mais além da pesquisa, uma das pessoas que conheço que possui mais ética profissional e amor pelo que faz, professora tudo que sou hoje na profissão e muito do que sou como pessoa é devido a seus ensinamentos, e por isso lhe agradeço eternamente;

Ao **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda**, uma pessoa de uma vivência e sabedoria incríveis, que me fez sentir realmente como um colega de profissão, lhe agradeço imensamente por todas as conversas e ensinamentos e por abrir as portas do Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) para a realização de nossas análises;

Ao **Prof. Dr. João Alberto Negrão**, pela ajuda e paciência com as dosagens de melatonina, obrigado por abrir as portas do Laboratório de Fisiologia Animal (LAFA) e dividir comigo tanto conhecimento, e a técnica de laboratório **Sandra Aparecida de Oliveira** pela ajuda e paciência com os testes e validações da dosagem de melatonina;

Ao **Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues**, por toda ajuda e ensinamentos nas análises estatísticas, desde as matérias em que participei até os momentos desesperados em sua sala tentando resolver a estatística do experimento, muito obrigado pelos ensinamentos e pela amizade;

A todos os outros professores do VRA de Pirassununga **Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi (Kiky)** e **Prof. Drs. Ed Hoffmann, André Furugen e Guilherme Pugliese** e aos professores do VRA de São Paulo **Profs. Drs. Mayra Elena Ortiz D'Avilla Assumpção, José Antonio Visintin, Claudia Barbosa Fernandes, Camila Infantsi Vannucchi, Clair Motos de**

Oliveira, Claudio Alvarenga de Oliveira, Pietro Sampaio Baruselli, Ricardo José Garcia Pereira e Marcílio Nichi pelos conselhos, pela convivência e pela amizade;

Aos funcionários do CBRA, **Clayton**, por toda paciência e sempre ajudar com tanto empenho, **João, Márcio, Zé Maria**, pela ajuda com os animais, pelas conversas e pela amizade sempre;

Às funcionárias do VRA (SP), **Harumi e Loide** por sempre ajudarem tão prontamente e principalmente pela amizade;

Aos meus colegas do LEPPaR, cada um foi um pedaço na minha história de vida, **Nataly** pela grande amizade, pelas risadas, pela parceria, por ser praticamente minha irmã colombiana; **Vitinho**, pela grande amizade encontrada na pós-graduação, por todos os apuros e risadas que passamos no experimento, **Flavia**, pelas risadas, amizades e conversas sobre a vida, **Vinicius**, pela amizade, risadas e conversas juntos, a **Maira (doci)** pelo companheirismo desde a graduação, pelas risadas e pelos ensinamentos, **Samara e Shirley** pela amizade e ajuda no experimento, **Bruna**, pela grande amizade e conselhos sobre a vida, **Luiza, Fabian e Felipe** pela amizade e companheirismo;

Aos outros colegas da pós-graduação do VRA, tanto de Pirassununga quanto de São Paulo obrigado a todos pela convivência, pelas risadas e pela amizade;

Aos meus amigos da Faculdade e da família CFH **Maku, Libidão, Hava, Augusto, Xacrete, Larissão, Antônio, Gordinho, Bebezão, Bada, Breuba, Giserda, Boguita, Rica e Fedezão**, pela amizade eterna e por serem minha segunda família, que cada vez cresce mais, independentemente do tempo que passe amo vocês;

Aos meus amigos de São Carlos **Biga, Zé, Breno, Romeu, Soldeira, Maturb, Cão e Gigli** obrigado pela amizade, pelas risadas, pelas cachaças juntos e por serem amigos que sei que duraram para sempre;

Aos animais, pois sem eles não seria possível a realização desse experimento;

Às agências de fomento pela bolsa e auxílio na execução desse estudo:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Processo nº 2016/05395-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*“Se você faz algo que goste, que realmente goste de fazer.
Aquilo deixa de ser um trabalho e vira uma diversão.”*

Stan Lee. Excelsior!

RESUMO

BATISSACO, L. **Melatonina para o tratamento da degeneração testicular em touros e seus efeitos sobre a bioquímica sérica e do plasma seminal, termodinâmica e hemodinâmica testicular e características espermáticas.** 2018. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A degeneração testicular é a mais frequente afecção reprodutiva em machos e leva a queda da qualidade espermática e, conseqüentemente, da fertilidade. Uma das principais causas é o estresse térmico, sendo caracterizada pelo aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio, assim, substâncias antioxidantes podem reduzir os impactos negativos ao sêmen desses animais. A melatonina tem alto fator antioxidante, além de atuar na proteção ao DNA espermático e na regulação da apoptose. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do tratamento exógeno com melatonina de longa ação sobre a recuperação do quadro de degeneração testicular em touros da raça Nelore. Para tal, foram realizados dois experimentos. O experimento 1 foi realizado para definir a dose exógena de melatonina (diluída em veículo oleoso e administrada por via intramuscular) que provocaria aumento por tempo prolongado na concentração sérica da mesma em bovinos. Foram utilizadas nove vacas ovariectomizadas distribuídas em três grupos: Controle (somente veículo oleoso); Melatonina 18 mg/50 kg de peso vivo; e Melatonina 27 mg/50 kg de peso vivo. Foram colhidas amostras de sangue no dia da aplicação e 4, 8, 16 e 24 dias após. A concentração de melatonina foi dosada pela técnica de ELISA. Os dados foram analisados utilizando o *software* Statistical Analysis System (SAS), pela ANOVA, adicionando-se o fator medidas repetidas no tempo. As probabilidades de interações ao longo do tempo foram determinadas pelo comando RANDOM (PROC GLIMMIX do SAS), com nível de significância de 5%. A aplicação de melatonina intramuscular diluída em veículo oleoso, na concentração de 18 mg/50 kg de peso vivo, provocou aumento estável por oito dias na concentração sérica de melatonina em bovinos. No experimento 2 foi avaliado o tratamento com melatonina sobre a degeneração testicular em touros, utilizando a dose estabelecida no experimento 1. A degeneração testicular foi induzida pela colocação de bolsas insuladoras testiculares por 96 horas. Foram utilizados 22 touros da raça Nelore distribuídos em 4 grupos: CON - touros não induzidos à degeneração testicular e não tratados (n=5); DT - touros induzidos à degeneração testicular e não tratados (n=6); ME - touros não induzidos à degeneração testicular e tratados com melatonina exógena (n=5); e DTME - touros induzidos à degeneração testicular e tratados com melatonina exógena (n=6). Foram realizadas colheitas de sêmen e sangue semanalmente, iniciando-se duas semanas antes

da colocação das bolsas testiculares; no dia da retirada; e por mais 11 semanas após. Foram analisadas as características clínicas, tais como perímetro escrotal, consistência testicular, homogeneidade testicular (presença de pontos hipercóicos) e hemodinâmica do parênquima e plexo pampiniforme e índice de resistência vascular. As características seminais avaliadas foram volume, concentração, motilidade e vigor subjetivos, análise computadorizada dos espermatozoides, membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, morfologia espermática, peroxidação lipídica e bioquímica do sêmen. O plasma sanguíneo foi utilizado para avaliar a peroxidação lipídica e componentes bioquímicos (proteína total, albumina, GGT, AST, ALT, creatina quinase, triglicérides, colesterol, HDL, BHB e NEFA). Os dados foram analisados utilizando o *software* SAS, pela ANOVA, adicionando-se o fator medidas repetidas no tempo. As probabilidades de interações ao longo do tempo foram determinadas pelo comando RANDOM (PROC GLIMMIX do SAS), com nível de significância de 5%. A insulação provocou queda na consistência testicular, motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomal e no potencial de membrana mitocondrial, bem como aumentou os defeitos espermáticos e a peroxidação lipídica. O tratamento com melatonina não mostrou influência sobre as características clínicas; contudo, apresentou melhora no vigor ($p=0.05$), na motilidade total ($p=0.05$) e no potencial mitocondrial ($p=0.003$) 15 dias após a aplicação da melatonina. Além disso, a melatonina diminuiu os valores de HDL, colesterol e BHB. O tratamento da degeneração testicular em touros (28 dias após a insulação) utilizando melatonina exógena em veículo de liberação lenta, na dose de 18 mg/kg, é eficiente em melhorar características de vigor, motilidade e potencial mitocondrial espermático.

Palavras chave: Melatonina; Estresse Térmico; Bovinos; Sêmen.

ABSTRACT

BATISSACO, L. **Melatonin for the treatment of testicular degeneration in bulls and its effects on serum and seminal plasma biochemistry, thermodynamics and testicular hemodynamics and sperm characteristics.** 2018. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Testicular degeneration is the most frequent reproductive affection in males and leads to a decrease in sperm quality and, consequently, fertility. One of the main causes is heat stress, being characterized by the increase in the production of reactive oxygen species, thus, antioxidant substances can reduce the negative impacts to the semen of these animals. Melatonin has a high antioxidant factor, besides acting in the protection of sperm DNA and in the regulation of apoptosis. The present study aimed to evaluate the effects of exogenous treatment with long acting melatonin on the recovery of testicular degeneration in Nelore bulls. Therefore, two experiments were conducted. Experiment 1 was performed to define the exogenous dose of melatonin (diluted in oily vehicle and administered intramuscularly) which would cause a prolonged increase in serum concentration of melatonin in cattle. Nine ovariectomized cows were divided into three groups: Control (only oily vehicle); Melatonin 18 mg/50 kg of body weight; and Melatonin 27 mg/50 kg of body weight. Blood samples were collected on the day of application and at 4, 8, 16 and 24 days after administration. The melatonin concentration was measured by ELISA. The data were analyzed using the Statistical Analysis System (SAS) software, by ANOVA, adding the factor repeated measures in time. The probabilities of interactions over time were determined by the RANDOM command (PROC GLIMMIX from SAS), with a significance level of 5%. The application of intramuscular melatonin, diluted in oily vehicle at the concentration of 18 mg/50 kg of live weight, caused stable increase for eight days in the serum concentration of melatonin in cattle. In experiment 2 was evaluated melatonin treatment on testicular degeneration in bulls, using that dose assessed in the experiment 1. Testicular degeneration was induced by the placement of testicular insulation bags for 96 hours. Twenty two Nelore bulls were distributed in 4 groups: CON - bulls not induced to testicular degeneration and untreated (n = 5); DT - bulls induced to testicular degeneration and untreated (n = 6); ME - bulls not induced to testicular degeneration and treated with exogenous melatonin (n = 5); and DTME - bulls induced to testicular degeneration and treated with exogenous melatonin (n = 6). Semen and blood samples were collected weekly, starting two weeks before the placement of testicular bags; on the day of removal; and for another 11 weeks thereafter. Clinical characteristics such as scrotal perimeter,

testicular consistency, testicular homogeneity (presence of hypercoic points) and parenchyma and pampiniform plexus hemodynamics and the vascular resistance index were analyzed. The seminal characteristics evaluated were subjective volume, concentration, motility and vigor, computerized analysis of spermatozoa, plasma, acrosomal and mitochondrial membranes, sperm morphology, lipid peroxidation and biochemistry of semen. Blood plasma was used to evaluate lipid peroxidation and biochemical components (total protein, albumin, GGT, AST, ALT, creatine kinase (CK), triglycerides, cholesterol, HDL, BHB and NEFA). Data were analyzed using the SAS software by ANOVA, adding the factor repeated measures in time. The probabilities of interactions over time were determined by the RANDOM command (PROC GLIMMIX from SAS), with a significance level of 5%. Insulation caused reduction on testicular consistence, motility, integrity of plasma membranes, integrity of acrosome, mitochondrial potential, as well as increased sperm defects and lipid peroxidation. Treatment with melatonin showed no influence on clinical characteristics, however, showed improvement in vigor ($p = 0.05$), total motility ($p = 0.05$) and mitochondrial potential ($p = 0.003$) 15 days after melatonin application. Besides that, melatonin decreased HDL, cholesterol and BHB values. The treatment of testicular degeneration in bulls (28 days after insulation) using exogenous melatonin in a slow-release vehicle, at a dose of 18 mg/kg, is efficient in improving sperm characteristics of vigor, motility and mitochondrial potential.

Keywords: Melatonin; Heat Stress; Bovine; Semen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Concentração de melatonina sérica obtida por Kumar et al. (2016) em animais tratados com 18 mg de melatonina para cada 50 kg de peso vivo em comparação com animais controle por 36 dias.....	34
Figura 2 -	Esquema de aplicação dos tratamentos e colheita de sangue em bovinos .	34
Figura 3 -	Esquema experimental indicando os períodos das colheitas de sangue e sêmen, indução da degeneração testicular por insulação escrotal e aplicação de melatonina exógena (18 mg/50 kg de peso vivo).....	37
Gráfico 1 -	Médias $\pm$ E.P.M. da concentração de melatonina sérica para os grupos controle (animais receberam uma aplicação de solução placebo), 18 mg e 27 mg de melatonina/50 kg de peso vivo, durante o período antes da aplicação (D-0) até 24 dias após a aplicação do tratamento (D-24).....	46
Gráfico 2 -	Médias $\pm$ E.P.M. da consistência testicular (1 a 5) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	47
Gráfico 3 -	Médias $\pm$ E.P.M. de motilidade subjetiva (%) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	48
Gráfico 4 -	Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de células apresentando concomitantemente membranas plasmática e acrossomal integras e alto potencial mitocondrial (%) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	51
Gráfico 5 -	Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de células apresentando membrana plasmática íntegra (%) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	51

Gráfico 6 -	Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de células apresentando membrana acrossomal íntegra (%) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	52
Gráfico 7 -	Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de defeitos maiores (%) observados na morfologia espermática quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	55
Gráfico 8 -	Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de defeitos totais (%) observados na morfologia espermática quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	55
Gráfico 9 -	Médias $\pm$ E.P.M. de TBARS induzido do sêmen (ng de TBARS/108 de espermatozoides) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Media $\pm$ E.P.M. da característica vigor (1-5) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	49
Tabela 2 -	Média $\pm$ E.P.M. da motilidade total observada pelo sistema CASA (%) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	50
Tabela 3 -	Médias $\pm$ E.P.M. de células possuindo alto potencial mitocondrial (%) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	53
Tabela 4 -	Médias $\pm$ E.P.M. de defeitos menores (%) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	54
Tabela 5 -	Médias $\pm$ E.P.M. de TBARS espontâneo do sangue (ng de TBARS/mL) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).....	56
Tabela 6 -	Média $\pm$ E.P.M. das análises bioquímicas de HDL e colesterol do sangue quando comparados os animais que receberam melatonina aos que não receberam melatonina.....	57
Tabela 7 -	Média $\pm$ E.P.M. das análises bioquímicas de HDL, ALB, BHB e colesterol do sangue comparando-se o tratamento com melatonina aos grupos insulados ou controle no período pós tratamento com melatonina (semanas 5 a 11).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
AI	Membrana acrossomal íntegra
ALH	Amplitude lateral de cabeça
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
BCF	Frequência de batimento
BHB	Beta hidroxibutirato
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
CK	Creatina quinase
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
E.P.M.	Erro padrão da média
FITC-PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada com isotiocionado de fluoresceína
GGT	Gama-glutamil transferase
H33342	Hoechst 33342
HDL	Lipoproteína de alta densidade
Hz	Hertz
JC-1	Iodeto de 5,5', 6,6'-tetra-cloro-1,1', 3,3'-tetrametilbenzimidazolil-carbocianina
kg	Quilogramas
LIN	Linearidade
mg	Miligrama
min	Minuto
mM	Milimolar
mL	Mililitro

n	Unidade Amostral
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
nm	Nanômetro
p	Probabilidade
PFA	Proteínas de fase aguda
PI	Iodeto de propídeo
PIAIA	Membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial
PROC	Procedimento
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
STR	Retilinearidade
TALP	Tyrode's albumina lactato piruvato
VAP	Velocidade média do trajeto
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

-	menos
%	por cento
/	por
±	mais ou menos
:	para (1:1)
<	menor
>	maior
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual
=	igual
®	marca registrada
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	20
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1.	FISIOPATOLOGIA DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR.....	22
2.2.	CARACTERÍSTICAS TESTICULARES NA DEGENERAÇÃO TESTICULAR.....	24
2.3.	CARACTERÍSTICAS SEMINAIS NA DEGENERAÇÃO TESTICULAR.....	25
2.4.	PERFIL BIOQUÍMICO DO SANGUE E SÊMEN.....	25
2.5.	TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR: MELATONINA E SEUS EFEITOS.....	27
3.	HIPÓTESE.....	30
4.	OBJETIVO.....	31
4.1.	OBJETIVOS GERAIS.....	31
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1.	EXPERIMENTO 1: MELATONINA EXÓGENA EM VEÍCULO OLEOSO EM BOVINOS: DETERMINAÇÃO DA DOSE PARA AUMENTAR A CONCENTRAÇÃO SÉRICA POR TEMPO PROLONGADO.....	33
5.1.1.	Delineamento experimental.....	33
5.1.2.	Preparo da Melatonina.....	35
5.1.3.	Colheita de sangue.....	35
5.1.4.	Dosagem de melatonina.....	35
5.1.5.	Análise estatística.....	35
5.2.	EXPERIMENTO 2: EFEITO DO TRATAMENTO EXÓGENO DE MELATONINA SOBRE A RECUPERAÇÃO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM TOUROS.....	36
5.2.1.	Delineamento experimental.....	36
5.2.2.	Avaliações clínicas.....	37
5.2.2.1.	Avaliações testiculares.....	38
5.2.3.	Colheita de sêmen.....	39
5.2.4.	Avaliação do sêmen.....	39
5.2.5.	Análises da bioquímica do plasma seminal e sanguínea.....	42

5.2.6.	Análise estatística.....	44
6.	RESULTADOS	45
6.1.	EXPERIMENTO 1.....	45
6.2.	EXPERIMENTO 2.....	46
7.	DISCUSSÃO	59
7.1.	EXPERIMENTO 1.....	59
7.2.	EXPERIMENTO 2.....	60
8.	CONCLUSÃO	65
9.	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICES	77
	ANEXOS	97

.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira tem grande destaque na produção mundial de bovinos, sendo que o país ocupa o segundo lugar na exportação de carne e possui o maior rebanho efetivo. Segundo dados do IBGE (2017) o efetivo de bovinos no Brasil foi de 214,9 milhões de cabeças. Embora os números sejam promissores, a produtividade do rebanho ainda possui margem para expandir e sua expansão depende principalmente das taxas de fertilidade do rebanho. Apesar do grande avanço na biotecnologia aplicada à reprodução animal nos últimos anos, atualmente somente 11,7% das fêmeas bovinas em idade reprodutiva do rebanho brasileiro são submetidas à inseminação artificial (Index ASBIA, 2017). Esses dados mostram que por volta de 90% do rebanho bovino do país a reprodução ocorre em regime de monta natural, mostrando a necessidade da qualidade tanto genética quanto do potencial reprodutivo dos touros.

As regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil representam mais de 50% do efetivo do rebanho (21 e 35%, respectivamente) (IBGE, 2017), regiões essas de clima tropical, apresentando altas temperaturas ao longo do ano. O aumento da temperatura ambiental pode levar a falha na termorregulação testicular e consequentemente a um processo de degeneração testicular (CELEGHINI et al., 2017).

A degeneração testicular é uma condição que tem grande impacto sobre o desempenho reprodutivo dos machos. Esta corresponde a alterações no parênquima testicular desencadeando mudanças nas estruturas das células de linhagem germinativa e modificações bioquímicas (GARCIA, 2017). A mesma normalmente decorre da perda de termorregulação testicular com o aumento da temperatura testicular que resulta no aumento do metabolismo celular. No entanto, não há aumento significativo da vascularização testicular e resulta na hipóxia celular levando ao estresse oxidativo (SETCHELL, 1998; HANSEN, 2009). Em decorrência deste processo, ocorre fragmentação de DNA (PAUL et al., 2009) e apoptose celular (PÉREZ-CRESPO et al., 2008; PAUL et al., 2009).

O tratamento atual da degeneração testicular consiste em retirar o agente causador. Os danos ocasionados pelo aumento da temperatura testicular decorrentes do estresse térmico são severos e de recuperação lenta (GABALDI et al., 1999), sendo um dos principais mecanismos indutores das espécies reativas de oxigênio, e consequentemente, do estresse oxidativo causado (HANSEN et al., 2009). Nestes casos,

somente a retirada do agente causador não é suficiente para o sucesso do tratamento (BICUDO et al., 2007). A suplementação com substâncias antioxidantes pode auxiliar o retorno da função das espermatogônias, células de Leydig e Sertoli (HSU et al., 1998).

A melatonina é um neuro-hormônio derivado do triptofano que é liberado principalmente pela glândula pineal, participando de várias funções homeostáticas, como regulação da reprodução e ritmos circadianos (REITER et al., 2000). Estudos mostram que a melatonina age sobre os espermatozoides reduzindo a taxa de peroxidação lipídica e danos ao DNA (PARLAKTAS et al., 2014), melhora a motilidade total, motilidade progressiva, linearidade, deslocamento lateral da cabeça, integridade da membrana espermática e diminui os defeitos espermáticos totais (ASHRAFI et al., 2013).

Além disso, aumenta as taxas de lactato produzidas pelas células de Sertoli, tendo efeito anti-apoptótico sobre as células em desenvolvimento (ROCHA et al., 2014), além de possuir efeito anti-inflamatório sobre os macrófagos do testículo (ROSSI et al., 2014). Em humanos foi também observada grande queda na atividade da DNase ácida, sugerindo que o uso da melatonina diminuiu a taxa de apoptose e fragmentação de DNA (SOKOLOVIC et al., 2015). A melatonina também tem potencial na modulação da vascularização, causando vasodilatação ou vasoconstrição dependente da ligação a receptores específicos (LEMLEY E VONNAHME, 2017). Também foi relatado ter ação direta na regulação do metabolismo lipídico no fígado (SUN et al., 2015) além de regular o metabolismo da glicose (ESPINO et al., 2011).

Com base nessas informações o presente estudo tem por finalidade propor um tratamento sistêmico com melatonina exógena em veículo oleoso, que promova a liberação lenta e ação por tempo prolongado para contribuir na reversão do quadro de degeneração testicular em touros, melhorando assim a recuperação da qualidade espermática. No entanto, não existem relatos na literatura sobre a aplicação intramuscular de melatonina diluída em veículo oleoso para uso em bovinos, sendo propostas duas doses de melatonina, baseados em estudos prévios em bubalinos (KUMAR et al., 2016), avaliando o tempo de duração de sua elevação na circulação sistêmica, antes de escolher a dose que pode ser mais eficiente na atuação do tratamento da degeneração testicular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A degeneração testicular corresponde a alterações no parênquima testicular desencadeando mudanças nas estruturas das células da linhagem germinativa e modificações bioquímicas (GARCIA, 2017). A degeneração testicular acomete tanto homens quanto animais e possui fatores predisponentes multifatoriais. Essa alteração resulta em diminuição da fertilidade, visto que leva à redução da produção de espermatozoides e da qualidade espermática (ALVES, 2014; CELEGHINI et al., 2017). Nesta revisão de literatura serão abordadas informações atuais sobre a fisiopatologia da degeneração testicular, bem como seus principais achados clínicos reprodutivos, espermáticos e bioquímicos para realizar o diagnóstico, além dos tratamentos preconizados e a ação da melatonina sobre a produção espermática e como um potencial tratamento da degeneração testicular em touros.

2.1. FISIOPATOLOGIA DA DEGENERACÃO TESTICULAR

Normalmente a degeneração testicular ocorre pela perda da termorregulação testicular (MOULE; WAITES, 1963), que pode ser consequência do aumento da temperatura ambiental e de alterações testiculares e escrotais tais como criptorquidismo, dermatites escrotais, hidrocele e hematocele (ALVES, 2014). Inflamações ou traumas testiculares, lesões vasculares, infecções (SETCHELL, 1998; HANSEN, 2009) e até deficiência nutricional como a carência de vitamina A (retinol) (GOFF, 2006; ALVES, 2014) também podem predispor a alteração. Quando a degeneração tem caráter leve a moderado (com pouco acometimento das espermatogônias tronco, células de Leydig e de Sertoli) a mesma pode ser reversível, com retomada da espermatogênese por volta de 60 dias após a retirada do agente causador (LAGERLOF, 1938; BICUDO et al., 2007; ALVES et al., 2016).

Sabe-se que os espermátócitos são as células mais sensíveis ao aumento de temperatura testicular, seguidos das espermátides, dos espermatozoides e das espermatogônias (SETCHELL, 1998; PÉREZ-CRESPO et al., 2008), sendo assim, se a causa primária da degeneração testicular for retirada, a produção espermática pode voltar à normalidade (HANSEN, 2009). Além das alterações de temperatura, a degeneração

testicular pode ocorrer em função da desestruturação da barreira hemato-testicular (MRUK; CHENG, 2004).

A temperatura testicular adequada deve ser de 2 a 6°C menor que a corpórea (KASTELIC et al, 1996a;b), sendo essa atingida devido a mecanismos de troca de calor contra-corrente pelo plexo pampiniforme, aproximação ou afastamento dos testículos do corpo pelos músculos da túnica dartus e cremaster, troca de calor pela superfície escrotal e as glândulas sudoríparas apócrinas escrotais (BLAZQUEZ et al., 1988; HANSEN, 2009). O desbalanço do mecanismo termorregulatório dos testículos, aumenta o metabolismo celular; contudo, a hemodinâmica testicular não aumenta na mesma proporção, gerando hipóxia celular (SETCHEL, 1998). Com isso, ocorre desbalanço das espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a estresse oxidativo, maior fragmentação do DNA e apoptose das células dos túbulos seminíferos (PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009; PAUL et al., 2009; JANCOSK e STEFANOVIC, 2014; ALVES et al., 2015). As ROS podem levar a lesão das espermatogônias, células de Leydig e células de Sertoli fazendo com que a espermatogênese seja prejudicada (BICUDO et al., 2007).

As ROS são radicais livres, átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL, 1991). Dentre as ROS, as mais importantes são: Radical hidroxilo (OH⁻), Ânion superóxido (O₂⁻), Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Óxido nítrico (NO₂), sendo o O₂⁻ e o H₂O₂ os principais; o último é gerado através da dismutação enzimática ou não enzimática do H₂O₂ (HALLIWELL, 1989). São muitos os antioxidantes que combatem os efeitos das ROS. No sêmen humano foram identificadas enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD, glutathione peroxidase/reductase – GPx e catalase), como também outros antioxidantes, incluindo albumina (ALB), glutathione, piruvato, taurina, hipotaurina e as vitaminas E e C (DE LAMIRANDE et al., 1997).

Além disso, o espermatozoide possui capacidade limitada para resistir ao estresse oxidativo, sendo extremamente dependente da proteção antioxidante do plasma seminal (VERNET et al., 2004). Outro fator importante, é a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática, que proporcionam a fluidez requerida e desta forma estão ligados aos eventos envolvidos na fertilidade (LENZI et al., 2000). Porém, na presença de ligações duplas destas moléculas, os espermatozoides acabam se tornando susceptíveis à ação dos radicais livres e começam o processo de peroxidação lipídica (VERNET et al., 2004).

2.2.CARACTERÍSTICAS TESTICULARES NA DEGENERAÇÃO TESTICULAR

Na degeneração testicular, o exame clínico pode revelar alterações como redução na consistência testicular e maior heterogeneidade do parênquima testicular, bem como oscilações nos padrões de temperatura da superfície escrotal (ALVES, 2014). Desta forma, além dos exames de inspeção, palpação e biometria testiculares podem ser utilizadas outras ferramentas como a ultrassonografia e a termografia dos testículos na busca de maior eficiência no diagnóstico de degeneração testicular (BATISSACO et al., 2013; ALVES, 2014).

A ultrassonografia pode contribuir para o diagnóstico de doenças dos órgãos genitais dos machos (MARTINO et al., 2014), sendo a ultrassonografia com Doppler colorido eficaz para avaliar as alterações vasculares nos testículos (LAM et al., 2005), fornecendo informações sobre arquitetura vascular, direção e velocidade do fluxo sanguíneo (BATISSACO et al., 2013). Além disso, as informações de resistência vascular fornecidas pelo índice de resistência (RI), tem sido amplamente utilizadas na rotina clínica para identificar infertilidade/dispermia em homens (BIAGIOTTI et al., 2002). Em carneiros foi observada alta correlação entre a hemodinâmica testicular constatada pela ultrassonografia Doppler colorido e os dados de morfologia espermática (BATISSACO et al., 2013).

A termografia também pode servir como método auxiliar no diagnóstico, porém com alguns pontos a serem aprofundados ainda. Normalmente essas avaliações são feitas antes da avaliação espermática e seus achados serão complementares aos achados laboratoriais e juntos possibilitarão o correto diagnóstico da doença (COULTER et al., 1988; ARTEAGA et al., 2005; CAPRARO et al., 2008; DUDEA et al., 2010; NETO et al., 2011). Em homens com distúrbios reprodutivos, varicocele e causas idiopáticas de oligozoospermia, quando comparados a homens sem problemas reprodutivos, notaram-se diferenças significativas entre as temperaturas da superfície escrotal (GAZVANI et al., 2000).

2.3. CARACTERÍSTICAS SEMINAIS NA DEGENERAÇÃO TESTICULAR

As características seminais são de grande valia no diagnóstico da degeneração testicular, sendo caracterizada principalmente pelo aumento nas alterações morfológicas, dentre eles os defeitos de cabeça e cauda, cabeças isoladas e gotas citoplasmáticas proximais (PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009). Além das análises clássicas, como concentração, motilidade e morfologia espermáticas (ARRUDA et al., 2011), outras análises, tais como aqueles com uso de programas computadorizados de análise de motilidade e a utilização de sondas fluorescentes para a verificação da integridade e função celular, podem ser métodos muito importantes na avaliação de espermatozoides de animais que apresentem degeneração testicular (ARRUDA et al., 2011).

Métodos de análise por sondas fluorescentes tem sido de grande valia no auxílio do diagnóstico dessas alterações (CELEGHINI et al., 2007). Carneiros induzidos à degeneração testicular apresentaram, 21 dias após o estresse térmico, redução de 30% nas células PIAIA, sendo essa porcentagem normalizada somente 49 dias após a retirada do insulto (ALVES et al., 2016). Resultados similares foram encontrados em bovinos ($p=0.0003$), nos quais animais insulados apresentavam somente $4,38 \pm 2,40\%$ de integridade de membranas (PIAIA), enquanto os animais controle apresentavam $49,5 \pm 12,01\%$ de integridade (GARCIA, 2004).

2.4. PERFIL BIOQUÍMICO DO SANGUE E SÊMEN

Além das alterações testiculares e seminais, pode haver alterações tanto locais quanto sistêmicas, alterações metabólicas e no perfil sanguíneo dos animais acometidos pela degeneração testicular. Essas alterações levam ao desbalanço de determinadas enzimas que podem servir como biomarcadores de doenças reprodutivas (AQUINO-CORTEZ et al., 2016)

Inúmeras pesquisas têm demonstrado que o perfil metabólico do animal influencia suas funções reprodutivas (ROBINSON, 1996). A utilização do perfil metabólico em animais de produção pode auxiliar na avaliação de rebanhos, atuando como uma importante ferramenta no diagnóstico clínico de doenças do metabolismo (PEIXOTO; OSÓRIO, 2007). A interação entre o perfil metabólico e a reprodução é estudada desde a década de 70 em bovinos leiteiros por diversos autores (PAYNE et al., 1970; BLOWEY

et al., 1973; ROWLANDS et al., 1975; ROWLANDS, 1980). Entretanto, na bovinocultura de corte os trabalhos ainda são escassos e não conclusivos.

Nas situações de injúria tecidual, o fígado do animal produz uma série de produtos denominados reagentes da fase aguda, entre esses, as proteínas de fase aguda (PFA), que são consideradas indicadores de resposta aguda de processos inflamatórios de diferentes causas (GRUYS et al., 1994). Essas proteínas têm sido consideradas como potenciais indicadores da presença de doenças e bem-estar em animais e também estão relacionadas a sanidade do rebanho (MURATA et al., 2004). A resposta de fase aguda é uma reação complexa e inespecífica de um organismo animal e se desenvolve rapidamente após qualquer injúria tecidual, antes mesmo do estímulo da resposta imune específica e, em muitos casos, antes do início dos sinais clínicos, por isso, as proteínas de fase aguda (PFA) podem ser consideradas marcadores precoces de qualquer processo patológico (CERÓN et al., 2005). Em humanos, Itasqui et al. (2016) observaram maior presença de proteínas de fase aguda no plasma seminal de homens com espermatozoides apresentando menor atividade mitocondrial e menor integridade de acrossomo.

Sabe-se que o perfil metabólico sanguíneo e as características do rebanho são importantes ferramentas para o diagnóstico e prevenção de distúrbios metabólicos que afetam a saúde, a fertilidade e a capacidade reprodutiva dos animais (GONZÁLEZ et al., 2000), sendo o fígado o principal órgão metabólico do animal, que é responsável pela síntese de diversas proteínas, incluindo as proteínas de fase aguda que estão relacionadas aos processos inflamatórios. Diversos são os marcadores bioquímicos e seus locais de ação como marcadores hepáticos aspartato aminotransferase (AST), marcador de função hepática e metabolismo muscular (PEIXOTO et al., 2006); gama-glutamil transferase (GGT), marcador sérico de doenças hepatobiliares (KANEKO et al., 2008); a creatina kinase (CK), usada como diferencial para AST, pois é um indicador musculo-específico (KANEKO et al., 2008). O colesterol tem sua importância como precursor de hormônios, e sua queda pode reduzir a produção de hormônios esteroides (GODOY et al., 2004).

Em humanos, as características de alanina aminotransferase (ALT), GGT, colesterol e CK do plasma seminal não apresentaram correlação com as características de qualidade espermática (concentração, motilidade e motilidade progressiva); entretanto, proteína total, albumina e AST apresentaram correlação positiva com concentração espermática, e fosfatase alcalina apresentou correlação positiva com motilidade (ZHANG et al., 2015a)

Assim como o plasma sanguíneo pode conter grandes informações de um perfil bioquímico acerca das alterações causadas pela degeneração, o plasma seminal pode ter informações importantes de um processo degenerativo. Lu et al. (2016) realizaram um estudo em humanos com modelo de obesidade, e mostraram correlação positiva entre triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) do sangue com os triglicerídeos no plasma seminal. Também observaram correlação negativa entre triglicerídeos, colesterol e LDL do plasma seminal com a motilidade progressiva (LU et al., 2016).

Como pode-se observar diversos estudos foram realizados acerca de marcadores bioquímicos e sua relação com a qualidade espermática em humanos, entretanto são escassos os estudos em bovinos acerca do tema. O estresse térmico pode levar a alterações em proteínas do plasma seminal responsáveis pela proteção, maturação e capacidade fertilizante dos espermatozoides (ROCHA et. al., 2015). Também em homens foi demonstrado que o estresse térmico pode alterar os níveis de óxido nítrico e óxido nítrico sintase do plasma seminal (ZHANQ et. al, 2015).

2.5. TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR: MELATONINA E SEUS EFEITOS

O tratamento da degeneração testicular tem como ponto limitante o fato de seus sinais clínicos serem observados apenas quando a alteração atinge grau moderado a grave. A recomendação é que o agente causador seja retirado; no entanto, quando os sinais clínicos são observados, é possível que o fator causador já não esteja mais presente. De forma adicional, deve ser feita a terapia de suporte, utilizando antioxidantes como a vitamina E e o selênio (ALVARENGA; PAPA, 2009), já que a suplementação com essas substâncias pode auxiliar o retorno da função das espermatogônias, células de Leydig e Sertoli (HSU et al., 1998). Alguns estudos demonstraram que a utilização de substâncias antioxidantes auxiliou na diminuição da peroxidação lipídica, maior taxa de retorno à espermatogênese (VIGUERAS-VILLASEÑOR et al., 2011), na produção de testosterona, formação e desenvolvimento normal de espermatozoides (BEHNE et al., 1996), além de melhora no aspecto histológico testicular e aumento da concentração sérica de testosterona e LH (SAKR et al., 2011). Outros estudos utilizaram-se do tratamento com somatotropina recombinante bovina 24 dias após o período de insulação, onde a insulação causou queda em motilidade, integridade de membranas, morfologia

espermática e concentrações de testosterona e IGF-1, entretanto o tratamento só mostrou efeito sobre a redução de células com cabeça piriforme (GARCIA, 2004; SOUZA, 2004).

O tratamento atual da degeneração testicular consiste em retirar o agente causador. Entretanto, a sintomatologia clínica da degeneração testicular é observada quando a doença atinge grau moderado a grave. Nestes casos, somente a retirada do agente causador não é suficiente para o sucesso do tratamento (BICUDO et al., 2007).

A melatonina é um dos hormônios produzidos na glândula pineal que é responsável pela regulação de diversos processos fisiológicos (ZHANG; ZHANG, 2014). Em humanos foram encontrados receptores para melatonina no hipotálamo e na hipófise, sugerindo que a mesma tem função na regulação da produção de GnRH, LH e FSH (WEAVER et al., 1993; JOHNSTON et al., 2006). Essa grande regulação da melatonina se dá principalmente em animais estacionais, cuja liberação varia em função da época do ano (GARCÍA et al., 2003). Em ratos, o tratamento com melatonina diminuiu as secreções de LH e FSH e testosterona, causando queda na estimulação das células de Sertoli e Leydig (LANG et al., 1984).

Apesar dessa queda na testosterona causada pela melatonina a mesma tem um grande papel na proteção do testículo contra degeneração e da qualidade espermática por seu mecanismo antioxidante. A melatonina é um ótimo antioxidante e tem se mostrado mais efetiva que a vitamina E (PIERI et al., 1994). A suplementação com substâncias antioxidantes pode auxiliar o retorno da função das espermatogônias, células de Leydig e Sertoli (HSU et al., 1998) sendo então uma forma de tratamento.

O tratamento com 50 mg/kg de melatonina reduziu significativamente os níveis de indicadores de stress oxidativo e de peroxidação lipídica em um modelo de rato com torção testicular (PARLAKTAS et al., 2014). O tratamento com 2 mM de melatonina diretamente no sêmen de bovinos mostrou melhora em motilidade total, motilidade progressiva, linearidade, deslocamento lateral da cabeça, viabilidade, integridade da membrana espermática e morfologia normal total, assim como o tratamento com 3 mM mostrou uma alta capacidade antioxidante e uma baixa taxa de peroxidação lipídica quando comparados aos animais controle (ASHRAFI et al., 2013).

Além disso, estudos histopatológicos revelaram que secções dos testículos de ratos com torção induzida continham resíduos citoplasmáticos, desorganização das células nos túbulos e estruturas grandes semelhantes a vacúolos enquanto que secções de um grupo tratado com melatonina com lesões de torção induzidas da mesma maneira exibiram microestruturas semelhantes aos de animais controle não lesionados

(KANTNER, 2010).

Estudos *in vitro* com células de Sertoli mostraram que a ação da melatonina exógena (por meio de seus receptores MT1 e MT2) aumenta diretamente a expressão dos genes *Dhh*, *Kitl*, *Pdgfa*, *Claudin*, *Occludin*, *Inhba*, *Inhbb* e *Inha*, e influenciam a secreção de Inibina B de uma forma dose/tempo dependente. Esses genes participam ativamente na formação da barreira hemato-testicular, regulação das células de Leydig, na espermatogênese e no mecanismo de apoptose (YANG et al., 2014).

Outro estudo em humanos mostra que a aplicação de melatonina aumenta as taxas de lactato produzidas pelas células de Sertoli, tendo esse efeito anti-apoptótico nas células em desenvolvimento (ROCHA et al., 2014). Foi encontrado também em humanos que a melatonina tem um efeito anti-inflamatório sobre os testículos (ROSSI et al., 2014). Em humanos foi também observado uma grande queda na atividade da DNase ácida, sugerindo que o uso da melatonina diminuiu a taxa de apoptose e fragmentação de DNA (SOKOLOVIC et al., 2015).

Apesar de estudos mostrarem que vacas mantidas em locais com fotoperíodo mais longo produzem mais leite que vacas mantidas em locais de fotoperíodo mais curto (PETERS et al., 1978; TUCKER; RINGER, 1982; DAHL et al., 2000), estudos mais recentes comprovam que não existe diferença entre as concentrações de melatonina de bovinos durante os diversos períodos do ano (OGINO et al., 2013). Isso mostra que independente do período, a administração exógena de melatonina pode causar aumento na concentração sérica.

Apesar de já ser conhecido que touros com degeneração testicular apresentem redução drástica na produção de espermatozoides, na motilidade progressiva, no número de espermatozoides vivos e normais por ejaculado (KASTELIC, 2001) e haver alterações ultrassonográficas presentes (BATISSACO et al., 2013) ainda são escassos os estudos que abordem um maior entendimento de outros fatores acometidos como o perfil sanguíneo e seminal, hemodinâmica testicular e alterações de temperatura escrotal, que podem ser indicativos de um processo degenerativo.

3. HIPÓTESE

1 - A administração exógena de melatonina diluída em veículo oleoso por via intramuscular é eficiente em aumentar a concentração sérica de melatonina por tempo prolongado em touros bovinos da raça Nelore.

2 - A administração de melatonina é capaz de restaurar os danos causados aos espermatozoides em decorrência do processo de degeneração testicular, reduzindo o tempo de retorno da qualidade espermática, observado pelo aumento da motilidade e integridade de membranas espermáticas, queda na taxa de peroxidação lipídica, aumento da vascularização testicular e queda nas proteínas de fase aguda no plasma seminal.

3- A administração de melatonina 28 dias após a insulação aumenta a vascularização testicular devido a regeneração epitelial e não altera a temperatura escrotal.

4- A administração de melatonina altera o perfil bioquímico sanguíneo devido sua interação sistêmica e pode alterar também o perfil bioquímico do plasma seminal.

4. OBJETIVOS

4.1.OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo visou analisar a eficácia do tratamento de bovinos com degeneração testicular com suplementação de melatonina exógena em veículo oleoso e sua ação como possível adjuvante na retomada da normalidade testicular, qualidade seminal, bem como sobre as alterações sistêmicas refletidas no perfil bioquímico sanguíneo e seminal.

4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia de uma aplicação única de melatonina exógena sobre o aumento e manutenção da concentração sérica da mesma.
- Avaliar os efeitos do tratamento com melatonina em touros com degeneração testicular, considerando:
 - o Características testiculares: temperatura escrotal, consistência testicular, perímetro testicular, vascularização do parênquima testicular e do plexo pampiniforme.
 - o Características seminais: volume, concentração, motilidade, vigor, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica.
 - o Perfil bioquímico sanguíneo e do plasma seminal: ureia, creatinina, GGT, AST, CK, fosfatase alcalina, BHB, colesterol, triglicérides, glicose, proteína total e proteínas de fase aguda (fibrinogênio e haptoglobina).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Para esse estudo, foram utilizados animais pertencentes à prefeitura do *Campus* “Fernando Costa”, alocados no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo, localizado na cidade de Pirassununga/SP. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, em pastagem de capim *Brachiaria brizantha*, com água e sal mineral *ad libitum* e suplementação diária de concentrado, segundo exigências estabelecidas pelo NRC (2001), durante o período experimental.

As análises laboratoriais do sêmen e o processamento de amostras foram realizados nos Laboratórios de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR) e no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA), ambos do CBRA/VRA/FMVZ/USP, Pirassununga-SP. As análises da peroxidação lipídica por TBARS foram realizadas no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, São Paulo-SP. Os componentes metabólicos e proteína de fase aguda foram quantificados no Laboratório Multiusuário de Análises Clínicas Veterinárias e as dosagens de melatonina sérica foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal (LAFA), ambos do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, *Campus* “Fernando Costa”, Pirassununga-SP.

Para este estudo foram realizados dois experimentos. O experimento 1 foi realizado para definir a dose exógena de melatonina, em veículo oleoso e administrada por via intramuscular, que provocaria aumento por tempo prolongado na concentração sérica da mesma em bovinos e definir a dose a ser utilizada no experimento 2, sendo comparadas as doses de 18 mg e 27 mg/50 kg de peso vivo de melatonina. O experimento 2 foi realizado para avaliar a eficácia do tratamento da degeneração testicular com melatonina exógena em veículo oleoso, cuja dose foi baseada nos resultados do experimento 1, sobre a recuperação das características da degeneração testicular em touros da raça Nelore.

5.1 EXPERIMENTO 1: MELATONINA EXÓGENA EM VEÍCULO OLEOSO EM BOVINOS: DETERMINAÇÃO DA DOSE PARA AUMENTAR A CONCENTRAÇÃO SÉRICA POR TEMPO PROLONGADO

5.1.1. Delineamento experimental

Afim de determinar a concentração ideal de melatonina exógena a ser aplicada foram testadas as concentrações de 0, 18 e 27 mg/50 kg de peso vivo. Para isso, nove vacas da raça Nelore ovariectomizadas, com idade média entre 3 e 4 anos e escore de condição corporal médio de 8, foram distribuídas em 3 grupos: CON - animais submetidos a uma única aplicação de solução placebo (veículo oleoso) (n=3); MEL18 - animais submetidos a uma única aplicação de melatonina na concentração de 18 mg/50 kg de peso vivo (n=3); e MEL27 - animais submetidos a uma única aplicação de melatonina na concentração de 27 mg/50 kg de peso vivo (n=3).

Para a escolha da concentração de melatonina a ser testada foi tomado por base a concentração descrita por Kumar et al. (2016) para bubalinos, os quais utilizaram a concentração de 18 mg/50 kg de peso vivo com resultados satisfatórios, conseguindo manter a concentração de melatonina elevada durante aproximadamente 20 dias, conforme ilustrado na figura 1. Porém, também foi testada uma concentração 50% maior, a fim de verificar se uma concentração maior seria mais efetiva.

Figura 1: Concentração de melatonina sérica obtida por Kumar et al. (2016) em animais tratados com 18 mg de melatonina para cada 50 kg de peso vivo em comparação com animais controle por 36 dias.

Fig. 1. Comparison of concentration of serum melatonin (MLT) in summer anoestrous buffaloes administered with slow-release melatonin @ 18 mg/50 kg b. wt. with control. Day 0 is the day of administration of melatonin

Fonte: Kumar et al. (2016).

Foram realizadas colheitas de sangue para a dosagem de melatonina (tubos Vacutainer® sem anticoagulante), sendo uma previamente à aplicação do tratamento (D-0); e quatro colheitas nos dias 4 (D4), 8 (D8), 16 (D16) e 24 (D24) após o tratamento, conforme ilustrado na figura 2. O tratamento foi realizado imediatamente após a colheita de sangue no D-0. Tanto as colheitas de sangue quanto os tratamentos foram realizados sempre no mesmo horário (13:00) para reduzir a interferência do ciclo circadiano sobre as análises.

Figura 2: Esquema de aplicação dos tratamentos e coleta de sangue em fêmeas bovinas.

*Tratamentos: CON - animais submetidos a uma única aplicação de solução placebo (veículo oleoso) (n=3); MEL18 - animais submetidos a uma única aplicação de melatonina na concentração de 18 mg/50 kg de peso vivo (n=3); e MEL27 - animais submetidos a uma única aplicação de melatonina na concentração de 27 mg/50 kg de peso vivo (n=3)

5.1.2. Preparo da Melatonina

Foi utilizada melatonina cristalina em pó (M5250, Sigma Aldrich), sendo essa incorporada em veículo oleoso (óleo de gergelim, S3547, Sigma Aldrich) por homogeneização a 37°C, nas concentrações de 18 e 27 mg/mL. A diluição foi feita em fluxo laminar para evitar contaminação. Após a diluição, as soluções foram armazenadas em frascos âmbar em geladeira (-20°C) até seu uso.

5.1.3. Colheita de sangue

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular, utilizando o sistema Vacutainer®, nos momentos previamente descritos, com uso de tubos secos sem a adição de anti-coagulante. Em seguida foi feita a centrifugação dos tubos (Centrífuga clínica Centerbio®, modelo 80-2B-15 mL), a 2000xg por 20 minutos a temperatura de -4°C para a obtenção do soro, sendo 4,5 mL do mesmo separado em três microtubos de 1,5 mL com o auxílio de pipetas, identificados e armazenados congelados a -80°C.

5.1.4. Dosagem de melatonina

A dosagem da melatonina foi realizada pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) por meio de kits específicos (IBL International, Hamburgo, Alemanha) em duplicata, com prévia validação das diluições e do protocolo para bovinos. As diluições e análises de cada amostra de soro foram feitas de acordo com o protocolo e as instruções do fabricante (ANEXO A), com leitura em microplacas a 405 nm. Os dados finais de cada amostra foram ajustados de acordo com a curva padrão fornecida pelo kit comercial e foram expressos em pg/mL.

5.1.5. Análise estatística

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2004), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). A variável atendeu às premissas estatísticas, não sendo necessário a transformação ou a retirada dos outliers. Os dados foram submetidos à Análise de Variância, pelo procedimento GLIMMIX (PROC GLIMMIX), sendo testada a melhor matriz (menor AICC) para cada variável e adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem, por meio do comando RANDOM. As análises por tempo somente foram realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos foram significativas. As diferenças entre os tratamentos dentro dos tempos foram analisadas pelo teste de média de Tukey. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$.

5.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO DO TRATAMENTO EXÓGENO DE MELATONINA SOBRE A DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM TOUROS

5.2.1. Delineamento experimental

Foram utilizados 22 touros da raça Nelore, distribuídos em quatro grupos experimentais: CON - touros não induzidos à degeneração testicular e não tratados (n=5); DT - touros induzidos à degeneração testicular e não tratados (n=6); ME - touros não

induzidos à degeneração testicular e tratados com melatonina exógena (n=5); e DTME - touros induzidos à degeneração testicular e tratados com melatonina exógena (n=6). Num delineamento fatorial 2x2.

A degeneração testicular foi induzida por meio da insulação escrotal, realizada pela colocação de bolsas insuladoras nos testículos, sendo essas compostas por três camadas: uma camada externa impermeável, uma camada média de material isolante térmico e uma camada interna antiabrasiva. As bolsas foram mantidas por 96 horas.

O tratamento com melatonina consistiu na aplicação intramuscular (IM) da solução preparada de melatonina cristalina em pó (M5250, Sigma Aldrich) incorporada em veículo oleoso (óleo de gergelim, S3547, Sigma Aldrich) e homogeneizada a 37°C, na concentração de 18 mg/mL, como descrito no experimento 1. A aplicação foi realizada nos touros na quarta semana pós-insulação, após a confirmação por métodos convencionais do diagnóstico da degeneração testicular e durante o período crítico da degeneração e regeneração do epitélio seminífero.

Foram realizadas avaliações dos touros semanalmente durante duas semanas pré-insulação (S-2; S-1), no dia da retirada da bolsa (imediatamente após, D0) e durante 11 semanas pós-insulação (S+1 a S+11), sempre com 7 dias de intervalo entre as avaliações, de acordo com o esquema da Figura 3.

Figura 3: Esquema experimental indicando os períodos das colheitas de sangue e sêmen, indução da degeneração testicular por insulação escrotal e aplicação de melatonina exógena (18 mg/50 kg de peso vivo)

As avaliações foram baseadas nas características testiculares (termodinâmica, perímetro escrotal, consistência testicular, homogeneidade e hemodinâmica) e seminais (análises subjetivas, CASA, integridade de membranas e potencial mitocondrial,

peroxidação lipídica e fragmentação de DNA). Foram colhidas também amostras de sangue e plasma seminal para análise bioquímica.

Foram também aferidas temperatura e umidade ambiente local em cada análise por meio do aparelho Data Logger Lufft (modelo OPUS 20THI).

5.2.2. Avaliações clínicas

Nas avaliações clínicas dos touros foram aferidos parâmetros fisiológicos sistêmicos: temperatura retal, frequência cardíaca, respiratória e movimentos ruminais, somente com intuito de acompanhar a saúde geral do animal.

A temperatura retal foi aferida com auxílio de termômetro de mercúrio, sendo esse mantido em contato com a mucosa retal por 3 minutos. As frequências cardíaca e respiratória foram aferidas utilizando-se estetoscópio e os movimentos ruminais por inspeção direta.

No exame clínico reprodutivo, foram consideradas as características testiculares e do plexo pampiniforme.

Os testículos foram avaliados de acordo com a termodinâmica, perímetro escrotal, consistência testicular, homogeneidade e hemodinâmica.

A temperatura escrotal foi aferida por meio do aparelho de termografia T640 (FLIR Systems, EUA), e as imagens analisadas pelo programa Quick Report. Para tal aferição, os animais foram mantidos em sombra, por pelo menos uma hora antes do exame, e posicionados a uma distância de 0,9 m do termógrafo sendo que os testículos não foram manipulados por no mínimo 30 minutos antes da aferição.

A consistência testicular foi avaliada por palpação e classificada em escore de 1 a 5, sendo 1 referente ao testículo menos consistente e 5 ao testículo mais consistente. O perímetro escrotal foi medido pelo uso de uma fita métrica (cm).

Os exames ultrassonográficos dos testículos foram realizados utilizando os modos B, Color e Espectral do Ultrassom Doppler modelo M5Vet® (Mindray, China).

A homogeneidade do parênquima testicular foi avaliada pela ultrassonografia em modo B, de acordo com Alves (2014), considerando a homogeneidade do parênquima testicular, utilizando-se escore de 0 a 2, sendo 0 mais homogêneo e 2 mais heterogêneo; e a presença de pontos hiperecogênicos no parênquima testicular, utilizando-se de escore de 0 a 3, sendo 0 ausência de pontos hiperecogênicos e 3 presença de diversos pontos hiperecogênicos ao longo de todo parênquima.

A vascularização foi avaliada por ultrassonografia modo color de acordo com Batissaco et al. (2013) em escores de 0 a 4, sendo 0 ausência de vascularização visível e 4 presença de diversos vasos de diferentes calibres ao longo do escaneamento todo. Foram avaliados também os plexos pampiniformes por ultrassonografia quanto à hemodinâmica (modo color) utilizando-se escore de 1 a 5, sendo 1 plexo com 0 a 20% de vascularização em sua delimitação total e 5 plexo com 80 a 100% de vascularização em sua delimitação total; e resistência vascular (índice de resistência – RI, 0 a 1), de acordo com Batissaco et al. (2013).

5.2.3. Colheita de sêmen

As colheitas de sêmen foram realizadas por eletroejaculação (Autojac V2, Neovet), em tronco de contenção. Antes de cada colheita foi realizada a higienização do prepúcio externamente com água e sabão de coco e internamente com solução fisiológica. Em seguida foi realizada a remoção de fezes do reto do touro e introdução total da probe com os eletrodos na posição ventral, seguida da administração de estímulos elétricos de maneira progressiva, lenta e pulsátil. Os primeiros gotejamentos foram desprezados e quando o mesmo começou a se tornar mais opaco e turvo o sêmen foi colhido. A colheita foi realizada em tubos para centrifugação de 15 mL, na quantidade suficiente para realizar todas as análises.

5.2.4. Avaliação do sêmen

Os ejaculados foram encaminhados ao Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) para as análises, sendo mantidos em banho-Maria a 37°C. Foram avaliados turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermática em microscópio de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon). O turbilhonamento foi avaliado em escores de 0 a 5, a motilidade estimada visualmente em porcentagem e o vigor em escores de 1 a 5. Para determinação da concentração, as amostras foram diluídas (1:100) em solução tamponada de formol salino. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

Foi realizada a análise da morfologia espermática por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, Eclipse 80i, Nikon, em aumento de 1.000x), pela técnica da câmara úmida, contando-se 200 células e classificando os defeitos em maiores, menores e totais, de acordo com Blom (1973).

A motilidade espermática também foi avaliada por sistema computadorizado de análise espermática (CASA, Computer-Assisted Sperm Analyses). Para esta análise, o sêmen foi diluído em meio TALP sperm (BAVISTER et al., 1983) na concentração de 25×10^6 spz/mL. Dez microlitros da amostra foram colocados na câmara de leitura (Makler® counting chamber, Sefi-Medical Instruments Ltda.) previamente aquecida (37°C), e inserida no aparelho modelo HTM-IVOS (Versão 12.3) da Hamilton-Thorn Biosciences (Beverly, MA, USA). O setup foi previamente ajustado para sêmen bovino (ANEXO B). Foram considerados: Motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), porcentagem de células rápidas (RAP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %), segundo metodologia descrita por Arruda (2000).

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial, uma amostra de 150 μL de sêmen foi diluída em TALP sperm (meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato) a 25×10^6 espermatozoides/mL, sendo adicionadas as sondas fluorescentes: 2 μL de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL, Molecular probes), 3 μL de iodeto de propídio (0,5 mg/mL, Sigma-Andrich), 50 μL de aglutinina obtida de *Pisium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Andrich) e 2 μL de iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 μM , Sigma-Andrich). Após a adição das sondas fluorescente, a amostra foi incubada por 8 minutos a 37°C, no escuro. A leitura foi realizada pela contagem de 200 células por microscopia de epifluorescência em aumento de 1000x, utilizando filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm) conforme descrito por Celeghini et al. (2007).

Para a análise do estresse oxidativo foi utilizada a sonda CellROX Deep Red Reagent®. Para o preparo da técnica foram utilizados 200 μL do sêmen diluído em TALP (25×10^6 espermatozoides/mL) e adicionados 0,5 μL de CellROX Deep Red Reagent® (1mM, Invitrogen) e 2 μL de Hoescht 33342 (2,5 mg/mL, Molecular Probes), e a amostra incubada a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 2.000xg, o sobrenadante retirado e o sedimento ressuspensionado em 200 μL de TALP. Uma amostra de 5 μL foi colocada entre lâmina e lamínula e a leitura realizada

sob microscopia de epifluorescência em aumento de 1.000x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420), de acordo com Alves et al. (2015).

Foram avaliados 300 espermatozoides por amostra, sendo classificados em: sem estresse oxidativo - SEO (peça intermediária não corada) e espermatozoides com estresse oxidativo - CEO (peça intermediária corada em vermelho) (ALVES et al., 2015).

A análise de peroxidação lipídica foi feita pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzido e espontâneo, tanto do sêmen, quanto do sangue de acordo com Nichi (2007).

Para análise do TBARS induzido do sêmen foram colocados 200 µL da amostra de sêmen em microtubos de 2 mL, posteriormente foram adicionados 50 µL de Ferro e 50 µL de Vitamina C (previamente aquecidos a 37°C), e incubado em banho-Maria seco por 90 minutos a 37°C com a tampa do microtubo aberta. Em seguida foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado na proporção 1:2 (300 µL de amostra com ferro e vitamina C + 600 µL de TCA) e se procedeu a centrifugação desses tubos a 14.500xg durante 10 minutos. Finalmente, 600 µL do sobrenadante foram recuperados em criotubos previamente identificados e congelados para posterior avaliação. Para a leitura no espectrofotômetro, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, São Paulo. Para tal, foi adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% nos criotubos na proporção 1:1 e incubados bem fechados a 100°C durante 15 minutos em banho-Maria. Em seguida, foram colocados no gelo para parar a reação, e as amostras foram transferidas para as cubetas de leitura, nas quais foram lidas no espectrofotômetro a 532 nm.

Para análise do TBARS espontâneo do sêmen foi utilizada a técnica descrita por Ohkawa et al. (1979), e para a análise do TBARS espontâneo do sangue foi baseada na técnica descrita por Alves et al. (2016). Em ambos os casos a técnica consistiu em colocar 800 µL da amostra em criotubos previamente identificados, congelá-los a -80°C, para posterior avaliação. Durante as análises foram recuperados 500 µL da amostra em microtubo e adicionados 1000 µL de TCA 10% gelado na proporção 1:2 de amostra:TCA. Após colocar o TCA, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos na maior potência da centrífuga (19.700xg) a 5°C. Ao fim da centrifugação, foi recolhido 1 mL de sobrenadante em criotubos. Na sequência, foi adicionado TBA 1% nos criotubos na proporção 1:1, e incubados bem fechados a 100°C durante 15 minutos em banho Maria. Em seguida, esses tubos foram colocados no gelo para parar a reação, e as amostras foram transferidas para microtubos e centrifugadas durante 15 minutos na maior potência da

centrífuga (19.700xg) a 5°C. Assim finalmente o sobrenadante foi transferido para as cubetas para leitura em espectrofotômetro a 532nm.

A fragmentação do DNA foi analisada pela técnica descrita inicialmente por Tejada et al. (1984), com modificações propostas por Acevedo (2001). Para esta análise, 500 µL da amostra de sêmen foram recuperadas em microtubos de 1,5 mL, e centrifugadas de duas a três vezes a 755xg durante 10 minutos, realizando lavados da amostra com 500 µL de água destilada entre cada centrifugação. Após a última centrifugação o sedimento foi re-suspendido para uma concentração de 25×10^6 spz/mL. Posteriormente foi preparado um esfregaço com uma gota de 7 µL da concentração anterior e mantido na temperatura ambiente por 60 minutos para secar. Logo depois se procedeu a imersão da lâmina na solução de DTT (2,9% (11.6 g) de citrato de sódio tribásico dihidratado (S4641, 1 kg, SIGMA-ALDRICH) + 9 mM (1.344 g) de ácido etilenodiamino tetra-acético (E6758, 500G, SIGMA) + 1 Mm (0.00616 g) de Dihidrotreitol (D063-SIGMA), diluídos em 400 mL de água MiliQ), por 30 minutos, depois na solução tampão (2,9% de citrato de sódio + 9 Mm de ácido etilenodiamino tetra-acético) por 30 minutos e finalmente na solução de Carnoy (300 mL de metanol 99,9% (34860 SIGMA-ALDRICH) + 100 mL de ácido acético glacial (A1019.01.BJ, 100 mL, SYNTH)) para fixar por no mínimo 12 horas. Após a fixação do esfregaço na solução de Carnoy, a lâmina ficou secando a temperatura ambiente durante 10 minutos e posteriormente foi coberta com 3 mL da solução de Acridina Laranja (10 mL de solução estoque de laranja de acridina: 1g de acridina laranja (cloreto de zinco) (A6014-10G SIGMA), diluído em 1000 mL de água destilada; + 40 mL de solução estoque de ácido cítrico: Ácido cítrico monohidratado (1,00244,0500, 500G, MERCK), a 0,1 Molar (5,25 g de ácido cítrico para 1000 mL de água destilada) + 2,5 mL de anidro de hidrogenofosfato di-sódico, (1,06559,0500, 500G, MERCK), a 0,3 Molar (20,10 g de fosfato dissódico a 250 mL de água destilada)) por 5 minutos. Na sequência, o esfregaço foi lavado cuidadosamente com solução de citrato de sódio (2,9% de citrato de sódio (S4641, 1kg, SIGMA-ALDRICH) diluído em 400 mL de água MiliQ), e antes de secar foi colocada uma lamínula (24x60 mm) e se deixou secando por 10 minutos.

Para a avaliação foram contadas 500 células por lâmina por microscopia de epifluorescência em aumento de 1000x, utilizando filtro triplo (D/F/R, C58420) e os espermatozoides classificados como cromatina íntegra, aquelas células que emitam fluorescência verde, e com desnaturação total ou parcial da cromatina, as células que emitiram fluorescência vermelha, laranja, amarela ou seus subtons.

5.2.5. Análises da bioquímica do plasma seminal e sanguínea

Após todas as análises, avaliou-se o pH do sêmen utilizando um medidor de pH (pH 21, Hanna Instruments®), em temperatura ambiente, e procedeu-se o processamento do sêmen para a obtenção do plasma seminal livre de espermatozoides. Para isso, foram realizadas duas centrifugações. A primeira centrifugação foi realizada à 450xg, por 15 minutos em temperatura ambiente (Centrífuga clínica Centerbio®, modelo 80-2B), o sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente em centrífuga refrigerada (Centrífuga Hettich® Rotina 380R, 3044g, por 20 minutos, 4°C). Após as duas centrifugações o sobrenadante foi armazenado a -80°C em triplicata. Para a escolha deste protocolo de centrifugação foram realizados testes prévios para se chegar a um protocolo que após as centrifugações o plasma seminal estivesse livre de espermatozoides.

No momento das análises, os tubos contendo o plasma seminal foram descongelados em temperatura ambiente durante 15 minutos e os componentes metabólicos do plasma seminal foram quantificados no Laboratório Multiusuário de Análises Clínicas Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus Fernando Costa, utilizando um analisador bioquímico automático (RX Daytona). Os metabólitos avaliados estão descritos a seguir com os respectivos kits utilizados: proteína total (TP4001, Randox®); albumina (AB3800, Randox®); gama-glutamil transferase (GGT - GT3817, Randox®); aspartato aminotransferase (AST - AS3804, Randox®); alanina aminotransferase (ALT - AL3801, Randox®) e fosfatase alcalina (FA - AP3802, Randox®).

Já para as análises da bioquímica sanguínea, as amostras de sangue foram colhidas da veia coccígea utilizando o sistema de punção a vácuo. De cada animal foi colhido sangue para obtenção de soro e plasma utilizando-se tubos sem e com adição de anticoagulantes, respectivamente. Os tubos foram centrifugados (Centrífuga Hettich® Rotina 380R, 2686g por 15 minutos a 4°C), sendo o soro e o plasma separados com o auxílio de pipetas em triplicatas em microtubos de 2,0 mL, devidamente identificados e armazenados à temperatura de -80°C.

No momento das análises, os tubos contendo o soro sanguíneo foram descongelados em temperatura ambiente durante 15 minutos e os componentes metabólitos do soro foram quantificados no Laboratório Multiusuário de Análises

Clínicas Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus Fernando Costa, utilizando um analisador bioquímico automático (RX Daytona). Os metabólitos avaliados estão descritos a seguir com os respectivos kits utilizados: proteína total (TP4001, Randox[®]); albumina (AB3800, Randox[®]); GGT (GT3817, Randox[®]); AST (AS3804, Randox[®]); ALT (AL3801, Randox[®]); creatina quinase (CK, CK110; Randox[®]); triglicérides (TR3823; Randox[®]); colesterol (CH3810; Randox[®]); HDL (CH3811; Randox[®]); BHB (RB1007; Randox[®]); e NEFA (FA115; Randox[®]).

5.2.6. Análise estatística

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System 9.4 (SAS Institute Inc., 2004), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação e/ou feita a retirada dos outliers. As variáveis que mesmo após as transformações e/ou retirada de outliers não atenderam as premissas foram analisadas pela estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância, pelo procedimento GLIMMIX (PROC GLIMMIX do SAS), sendo testada a melhor matriz (menor AICC) para cada variável e adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem, por meio do comando RANDOM. Foram analisadas as probabilidades entre os grupos com degeneração testicular e melatonina ao longo do tempo. As análises por tempo somente foram realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos foram significativas. As diferenças entre os tratamentos dentro dos tempos foram analisadas pelo teste de média de Tukey. Quando não houve interação foi observado o efeito isolado. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$. Quando o valor de p se encontrava entre 0,05 e 0,1 foi considerado como tendência estatística.

6. RESULTADOS

6.1. EXPERIMENTO 1

O tratamento com melatonina exógena em veículo oleoso foi eficiente em causar aumento na concentração sérica de melatonina, sendo observada interação entre tratamento e tempo ($p=0,05$), conforme apresentado no gráfico 1. Foi evidente o aumento da concentração sérica de melatonina a partir de 4 dias após os tratamentos tanto para o grupo que recebeu 18 quanto 27 mg/50 kg de peso vivo de melatonina. Este aumento se manteve até 8 dias após o tratamento no grupo que recebeu 18 mg/50 kg de peso vivo de melatonina. Contudo, o grupo que recebeu 27 mg/50 kg de peso vivo de melatonina apresentou uma queda mais rápida da concentração sérica de melatonina, sendo estatisticamente similar ao controle no 8º dia após a aplicação do tratamento.

A partir de 16 dias após aplicação do tratamento os dois grupos de animais que receberam a melatonina exógena apresentaram concentrações séricas de melatonina, semelhantes à fisiológica, verificada nos animais do grupo controle.

Gráfico 1: Médias $\pm$ E.P.M. da concentração de melatonina sérica para os grupos controle (animais receberam uma aplicação de solução placebo), 18 mg e 27 mg de melatonina/50 kg de peso vivo, durante o período antes da aplicação (D-0) até 24 dias após a aplicação do tratamento (D-24).

^{a,b}: Letras sobrescritas minúsculas diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^{A,B,C}: Letras sobrescritas maiúsculas diferentes entre os tempos no mesmo tratamento representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

6.2. EXPERIMENTO 2

Foi notada queda na consistência testicular no momento da retirada da bolsa (semana 0) ($p < 0.0001$) conforme ilustrado no gráfico 2; entretanto; o tratamento com melatonina não alterou a consistência testicular ($p = 0.93$). Por outro lado, não houve alteração no perímetro escrotal após a insulação testicular, e também o mesmo não se alterou após o tratamento com melatonina.

Gráfico 2: Médias $\pm$ E.P.M. da consistência testicular (1 a 5) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

^{a,b}: Colunas com letras sobrescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

A insulação testicular não causou alterações de temperatura testicular, homogeneidade do parênquima testicular, presença de pontos hiperecóticos, vascularização do parênquima testicular, vascularização do plexo pampiniforme e índice de resistência (RI). Assim como, o tratamento com melatonina não alterou essas características, como observado no apêndice A.

Contudo, quanto às características espermáticas, a insulação levou a diminuição da motilidade subjetiva ($p=0.01$), observando-se queda da segunda a quinta semana, tendo retomada a normalidade na sexta semana, conforme observado no gráfico 3. No entanto, o tratamento com melatonina não teve efeito sobre a recuperação da motilidade subjetiva ($p=0.2$).

Gráfico 3: Médias $\pm$ E.P.M. de motilidade subjetiva (%) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

^{a,b}: Colunas com letras sobrescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

A melatonina foi eficaz em melhorar o vigor espermático de animais insulados ($p=0.05$) 15 dias após a aplicação (semana 6), sendo que esses animais apresentaram vigor maior em relação aos animais insulados não tratados e semelhante aos animais não submetidos à insulação, conforme expresso na tabela 1. Não foram observadas ações tanto da insulação quanto da melatonina sobre a concentração espermática, como mostrado no apêndice B.

Tabela 1: Média $\pm$ E.P.M. da característica vigor (1-5) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina		p
	Controle	Insulado	Controle	Insulado	
-2	3.25 $\pm$ 0.17	3.67 $\pm$ 0.17	2.90 $\pm$ 0.10	3.63 $\pm$ 0.24	0.14
-1	3.25 $\pm$ 0.17	3.17 $\pm$ 0.17	2.50 $\pm$ 0.22	3.25 $\pm$ 0.32	0.09
0	3.25 $\pm$ 0.21	3.00 $\pm$ 0	3.10 $\pm$ 0.37	2.88 $\pm$ 0.31	0.74
1	3.26 $\pm$ 0.15	3.00 $\pm$ 0.29	3.10 $\pm$ 0.29	3.21 $\pm$ 0.67	0.67
2	3.33 $\pm$ 0.21	2.63 $\pm$ 0.25	2.90 $\pm$ 0.33	2.88 $\pm$ 0.13	0.35
3	3.33 $\pm$ 0.17	2.87 $\pm$ 0	3.10 $\pm$ 0.33	2.75 $\pm$ 0.43	0.41
4 ^M	3.30 $\pm$ 0.12	2.33 $\pm$ 0.33	2.70 $\pm$ 0.25	2.82 $\pm$ 0.44	0.08
5	3.20 $\pm$ 0.20	3.17 $\pm$ 0.33	2.80 $\pm$ 0.25	2.63 $\pm$ 0.31	0.34
6	3.17 $\pm$ 0.17 ^{a,b}	3.50 $\pm$ 0.29 ^a	3.80 $\pm$ 0.20 ^a	2.50 $\pm$ 0.65 ^b	0.0043
7	3.33 $\pm$ 0.17	3.17 $\pm$ 0.17	3.00 $\pm$ 0.35	3.00 $\pm$ 0.41	0.71
8	3.20 $\pm$ 0.12	3.03 $\pm$ 0.50	2.80 $\pm$ 0.25	3.42 $\pm$ 0.29	0.38
9	3.25 $\pm$ 0.17	3.66 $\pm$ 0.25	2.80 $\pm$ 0.34	3.13 $\pm$ 0.24	0.26
10	3.00 $\pm$ 0.13	3.50 $\pm$ 0.29	3.20 $\pm$ 0.30	3.25 $\pm$ 0.32	0.62
11	3.00 $\pm$ 0.22	3.15 $\pm$ 0.25	3.20 $\pm$ 0.25	3.00 $\pm$ 0.35	0.90

^{a,b}: Linhas com letras sobresscritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Outro efeito interessante do tratamento com melatonina ($p=0,05$) foi observado sobre a motilidade total expressa pelo sistema CASA, sendo que previamente a aplicação do tratamento com melatonina nas semanas 3 e 4 os animais insulados apresentavam menor motilidade total, contudo 15 dias após o tratamento (semana 6) os animais insulados e tratados com melatonina apresentaram motilidade semelhante aos não insulados, e maior que os animais insulados não tratados, conforme observado na tabela 2. Para as outras características do CASA (MP, RAP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR e LIN) não foi observado efeito tanto da insulação quanto do tratamento com melatonina, mostrado no apêndice C.

Tabela 2: Média $\pm$ E.P.M. da motilidade total observada pelo sistema CASA (%) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina		p
	Controle	Insulado	Controle	Insulado	
-2	71.33 $\pm$ 2.63	77.00 $\pm$ 6.56	71.40 $\pm$ 2.01	81.75 $\pm$ 6.42	0.67
-1	66.17 $\pm$ 4.94	67.00 $\pm$ 10.41	61.20 $\pm$ 5.13	74.50 $\pm$ 5.72	0.61
0	69.67 $\pm$ 4.22	67.67 $\pm$ 5.36	70.80 $\pm$ 9.31	69.50 $\pm$ 6.74	0.99
1	64.33 $\pm$ 4.28	63.67 $\pm$ 2.60	77.20 $\pm$ 5.29	53.09 $\pm$ 15.51	0.14
2	65.50 $\pm$ 6.57	51.67 $\pm$ 7.00	80.71 $\pm$ 4.87	60.50 $\pm$ 8.06	0.08
3	67.33 $\pm$ 5.86 ^{a,b}	43.09 $\pm$ 18.5 ^{a,b}	70.60 $\pm$ 6.62 ^a	44.75 $\pm$ 17.44 ^b	0.01
4 ^M	70.32 $\pm$ 7.68 ^a	40.33 $\pm$ 9.96 ^b	68.40 $\pm$ 5.66 ^a	51.34 $\pm$ 18.58 ^{a,b}	0.02
5	71.99 $\pm$ 2.64	65.33 $\pm$ 3.18	71.00 $\pm$ 6.33	72.65 $\pm$ 1.33	0.92
6	71.50 $\pm$ 4.29 ^a	80.67 $\pm$ 5.90 ^a	76.20 $\pm$ 5.76 ^a	42.25 $\pm$ 21.09 ^b	0.0017
7	73.50 $\pm$ 4.31	67.00 $\pm$ 8.33	74.60 $\pm$ 4.06	72.62 $\pm$ 6.00	0.91
8	70.50 $\pm$ 4.20	62.21 $\pm$ 3.00	76.40 $\pm$ 5.78	76.58 $\pm$ 2.33	0.62
9	70.83 $\pm$ 5.40	81.60 $\pm$ 6.50	80.92 $\pm$ 1.00	75.75 $\pm$ 6.75	0.68
10	67.83 $\pm$ 5.63	75.67 $\pm$ 3.76	80.40 $\pm$ 3.78	81.75 $\pm$ 1.11	0.41
11	68.00 $\pm$ 6.69	75.35 $\pm$ 2.50	67.20 $\pm$ 9.72	63.25 $\pm$ 13.65	0.81

^{a,b}: Linhas com letras sobresscritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

A porcentagem de células PIAIA dos animais insulados apresentou queda ($p=0.007$) 7 dias após a retirada da bolsa (semana 1), se mantendo menor até a semana 5 pós-insulação, conforme observado no gráfico 4. Um efeito semelhante da insulação foi observado sobre a integridade de membrana plasmática ($p=0.001$) observando-se queda 15 dias após a retirada das bolsas, se mantendo menor até a semana 5 pós-insulação, conforme mostra o gráfico 5. Já o efeito da insulação sobre a integridade da membrana acrossomal ($p=0.03$) levou a uma queda somente 7 dias após a retirada da bolsa (semana 1), se igualando aos animais não insulados nas demais semanas, conforme observado no gráfico 6.

O tratamento com melatonina não apresentou efeito sobre a porcentagem de células apresentando concomitantemente membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial (PIAIA - $p=0.28$), porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (PI - $p=0.63$) e porcentagem de células apresentando membrana acrossomal íntegra (AI - $p=0,56$).

Gráfico 4: Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de células apresentando concomitantemente membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial (%) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

^{a,b}: Colunas com letras sobreescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Gráfico 5: Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de células apresentando membrana plasmática íntegra (%) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

^{a,b}: Colunas com letras sobreescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Gráfico 6: Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de células apresentando membrana acrossomal íntegra (%) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

^{a,b}: Colunas com letras sobrescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Foi possível observar que nas semanas 2, 3, 4 e 5 pós-insulação os animais insulados apresentavam queda no potencial mitocondrial; entretanto, o tratamento com melatonina foi eficaz em aumentar a porcentagem de células apresentando alto potencial mitocondrial ($p=0.003$), notou-se que 15 dias após a aplicação de melatonina (semana 6) os animais insulados tratados com melatonina apresentaram aumento no potencial mitocondrial, se equiparando com os animais não insulados, enquanto que os animais insulados sem tratamento apresentaram menor potencial mitocondrial nessa mesma semana, somente se elevando 21 dias após o tratamento (semana 7), conforme mostra a tabela 3.

Tabela 3: Médias $\pm$ E.P.M. de células possuindo alto potencial mitocondrial (%) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina		p
	Controle	Insulado	Controle	Insulado	
-2	82.91 $\pm$ 4.50	79.28 $\pm$ 5.49	80.40 $\pm$ 3.92	85.75 $\pm$ 4.58	0.95
-1	79.17 $\pm$ 5.93	67.83 $\pm$ 24.92	76.30 $\pm$ 4.83	85.25 $\pm$ 5.10	0.6
0	69.33 $\pm$ 3.66	84.83 $\pm$ 2.24	92.22 $\pm$ 1.55	75.25 $\pm$ 7.85	0.18
1	80.37 $\pm$ 3.03	65.67 $\pm$ 4.97	90.81 $\pm$ 2.07	66.52 $\pm$ 1.25	0.18
2	89.18 $\pm$ 2.65 ^a	67.78 $\pm$ 17.00 ^{a,b}	83.90 $\pm$ 3.67 ^a	50.50 $\pm$ 13.68 ^b	0.0036
3	86.67 $\pm$ 3.52 ^a	42.30 $\pm$ 29.00 ^c	76.17 $\pm$ 7.37 ^{a,b}	57.50 $\pm$ 7.74 ^{b,c}	0.0027
4 ^M	81.87 $\pm$ 5.00 ^a	41.17 $\pm$ 17.88 ^b	82.10 $\pm$ 3.42 ^a	56.76 $\pm$ 20.20 ^b	0.0019
5	89.76 $\pm$ 3.06 ^a	57.50 $\pm$ 17.93 ^b	87.00 $\pm$ 2.83 ^a	58.38 $\pm$ 8.55 ^b	0.0051
6	82.17 $\pm$ 5.02 ^a	85.00 $\pm$ 3.18 ^a	82.00 $\pm$ 4.20 ^a	51.88 $\pm$ 19.33 ^b	0.0191
7	85.08 $\pm$ 3.67	65.83 $\pm$ 21.99	84.90 $\pm$ 7.29	71.38 $\pm$ 13.22	0.27
8	91.42 $\pm$ 1.35	64.26 $\pm$ 9.00	83.80 $\pm$ 5.76	79.89 $\pm$ 10.26	0.28
9	82.11 $\pm$ 3.71	67.11 $\pm$ 17.19	71.82 $\pm$ 7.78	76.66 $\pm$ 3.72	0.6
10	80.92 $\pm$ 5.21	85.17 $\pm$ 2.03	76.80 $\pm$ 9.89	79.53 $\pm$ 5.22	0.92
11	82.20 $\pm$ 5.11	52.67 $\pm$ 17.03	71.76 $\pm$ 8.13	70.63 $\pm$ 9.18	0.11

^{a,b,c}: Linhas com letras sobrescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Para a morfologia espermática o tratamento com melatonina não alterou a porcentagem de defeitos maiores ($p=0.85$) e defeitos totais ($p=0.32$); contudo, defeitos menores apresentaram diferença ($p=0.02$). Por mais que defeitos menores tenham apresentado efeito do tratamento, as diferenças entre os grupos se apresentam previamente ao tratamento com melatonina (semana 4), observando-se maior número de defeitos nos grupos insulados com apenas diferenças entre as semanas como na semana 1, na qual o grupo insulado tratado com melatonina apresentou maior número de defeitos que os demais, nas semanas 2 e 3, o grupo insulado sem melatonina apresentou-se maior que os demais e na semana 4 onde novamente o grupo insulado com melatonina apresentou-se maior, conforme ilustrado na tabela 4.

Tabela 4: Médias $\pm$ E.P.M. de defeitos menores (%) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina		p
	Controle	Insulado	Controle	Insulado	
-2	1.00 $\pm$ 0.34	0.50 $\pm$ 0.29	2.60 $\pm$ 1.12	0.38 $\pm$ 0.13	0.24
-1	2.00 $\pm$ 0.41	1.67 $\pm$ 1.20	1.50 $\pm$ 0.84	2.50 $\pm$ 0.65	0.59
0	4.10 $\pm$ 2.12	8.83 $\pm$ 2.40	6.93 $\pm$ 2.82	3.00 $\pm$ 0.46	0.14
1	1.42 $\pm$ 0.45 ^b	15.50 $\pm$ 10.28 ^a	2.40 $\pm$ 0.90 ^b	7.88 $\pm$ 5.83 ^{a,b}	0.0014
2	1.50 $\pm$ 0.50 ^b	5.50 $\pm$ 3.28 ^b	1.10 $\pm$ 0.29 ^b	25.00 $\pm$ 9.90 ^a	<.0001
3	1.17 $\pm$ 0.42 ^b	3.45 $\pm$ 0.50 ^{a,b}	1.20 $\pm$ 0.25 ^b	10.88 $\pm$ 4.52 ^a	0.0003
4 ^M	0.80 $\pm$ 0.34 ^c	9.67 $\pm$ 5.67 ^a	1.80 $\pm$ 0.60 ^{b,c}	4.48 $\pm$ 0.76 ^{a,b}	0.0021
5	1.75 $\pm$ 0.54 ^b	8.17 $\pm$ 4.60 ^a	2.51 $\pm$ 1.70 ^b	7.25 $\pm$ 3.14 ^a	0.0173
6	2.17 $\pm$ 0.75	2.50 $\pm$ 1.04	1.62 $\pm$ 0.59	9.25 $\pm$ 6.26	0.10
7	1.33 $\pm$ 0.82	2.67 $\pm$ 0.73	2.00 $\pm$ 0.57	1.89 $\pm$ 0.17	0.63
8	1.50 $\pm$ 0.41	1.70 $\pm$ 0.25	1.50 $\pm$ 0.32	5.38 $\pm$ 2.39	0.26
9	2.08 $\pm$ 0.61	2.50 $\pm$ 1.26	1.80 $\pm$ 0.58	3.00 $\pm$ 2.07	0.97
10	1.33 $\pm$ 0.49	2.17 $\pm$ 0.93	1.50 $\pm$ 0.55	1.63 $\pm$ 0.83	0.88
11	1.00 $\pm$ 0.47	2.67 $\pm$ 0.44	2.80 $\pm$ 0.97	2.80 $\pm$ 2.75	0.26

^{a,b,c}: Linhas com letras sobreescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

A insulação testicular elevou a porcentagem de defeitos maiores ($p < .0001$) observando-se aumento na porcentagem de defeitos maiores, 7 dias após a retirada da bolsa (semana 1), e manteve-se aumentado até a semana 7 (49 dias), conforme mostrado no gráfico 7. Os defeitos totais também foram aumentados pela insulação ($p < .0001$), com comportamento bem similar aos defeitos maiores, mostrando aumento dos defeitos a partir de 7 dias após a insulação (semana 1), se estendendo até a semana 7, como mostra o gráfico 8.

Gráfico 7: Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de defeitos maiores (%) observados na morfologia espermática quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

^{a,b}: Colunas com letras sobrescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Gráfico 8: Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de defeitos totais (%) observados na morfologia espermática quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

^{a,b}: Colunas com letras sobrescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

A melatonina levou a um aumento na peroxidação lipídica sanguínea ($p<.0001$), observada pela técnica de TBARS. Os animais insulados que receberam o tratamento com melatonina apresentaram maior grau de peroxidação 15 dias após o tratamento (semana 6) quando comparados aos demais, conforme observado na tabela 5.

Tabela 5: Médias $\pm$ E.P.M. de TBARS espontâneo do sangue (ng de TBARS/mL) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina		p
	Controle	Insulado	Controle	Insulado	
-2	231.62 $\pm$ 36.04	285.97 $\pm$ 106.57	305.24 $\pm$ 85.05	144.81 $\pm$ 54.73	0.45
-1	251.91 $\pm$ 30.48	227.73 $\pm$ 29.66	237.60 $\pm$ 27.09	192.12 $\pm$ 29.34	0.56
1	225.20 $\pm$ 30.28	233.97 $\pm$ 48.31	252.68 $\pm$ 35.57	166.60 $\pm$ 31.97	0.36
2	322.23 $\pm$ 87.60	216.39 $\pm$ 49.92	235.64 $\pm$ 18.12	167.02 $\pm$ 40.57	0.21
3	213.62 $\pm$ 18.42	181.57 $\pm$ 30.75	255.34 $\pm$ 30.94	160.47 $\pm$ 24.50	0.51
4 ^M	207.08 $\pm$ 35.92	199.45 $\pm$ 52.42	266.34 $\pm$ 51.76	260.20 $\pm$ 80.60	0.77
5	203.35 $\pm$ 20.76	278.27 $\pm$ 36.46	285.66 $\pm$ 45.67	168.42 $\pm$ 14.80	0.06
6	261.27 $\pm$ 42.68 ^b	1044.71 $\pm$ 109.55 ^a	259.12 $\pm$ 21.76 ^b	208.17 $\pm$ 21.87 ^b	<.0001
7	219.87 $\pm$ 31.90	259.67 $\pm$ 57.30	256.28 $\pm$ 28.46	183.22 $\pm$ 17.55	0.35
8	193.95 $\pm$ 19.85	270.42 $\pm$ 68.16	205.72 $\pm$ 32.54	259.65 $\pm$ 52.89	0.56
9	213.68 $\pm$ 30.88	205.47 $\pm$ 43.30	275.33 $\pm$ 27.14	178.52 $\pm$ 33.04	0.21
10	289.75 $\pm$ 19.17	299.70 $\pm$ 31.27	286.96 $\pm$ 22.65	235.72 $\pm$ 30.48	0.33
11	216.52 $\pm$ 24.90	204.90 $\pm$ 28.41	243.72 $\pm$ 26.71	167.15 $\pm$ 30.39	0.33

^{a,b}: Linhas com letras sobresscritas minúsculas representam diferença estatística ($p\leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

A insulação causou maior peroxidação lipídica no sêmen 15 e 21 dias após o insulto, e o mesmo se observou novamente na semana 9, conforme mostra o gráfico 9. Contudo, o TBARS espontâneo do sêmen apresentou apenas tendência ($p=0.06$) em mostrar diferença do tratamento em relação a insulação ao longo do tempo, e foi apresentado no apêndice D. O TBARS induzido do sêmen apresentou tendência da interação do tratamento com a insulação ao longo do tempo ($p=0.06$), e foi apresentado no apêndice E.

Gráfico 9: Médias $\pm$ E.P.M. de TBARS induzido do sêmen (ng de TBARS/ 10^8 de espermatozoides) quando comparados os animais insulados com os animais controle no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

^{a,b}: Colunas com letras sobreescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

A fragmentação de DNA foi analisada por estatística não paramétrica. Contudo, não foram observados efeitos da insulação, nem do tratamento com melatonina.

Não foram observadas alterações da aplicação de melatonina ou da insulação sobre pH, AST, GGT, ALT, albumina, fosfatase alcalina, proteína total no sêmen (apêndice F). No sangue também não se observou alterações para as características de AST, GGT, ALT, CK, triglicérides, NEFA, BHB, albumina e proteína total (Apêndice G); no entanto, foi observado efeito de melatonina sobre HDL e colesterol, sendo que em ambos os animais tratados com melatonina apresentaram menores valores, como mostrado na tabela 6.

Tabela 6: Média $\pm$ E.P.M. das análises bioquímicas de HDL (nmol/L) e colesterol (mg/dL) do sangue quando comparados os animais que receberam melatonina aos que não receberam melatonina.

	Melatonina	Sem Melatonina	p
HDL Sanguíneo	67.84 $\pm$ 1.97 ^b	74.42 $\pm$ 1.97 ^a	0.03
Colesterol Sanguíneo	127.47 $\pm$ 4.23 ^b	142.09 $\pm$ 4.23 ^a	0.02

^{a,b}: Linhas com letras sobreescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Após observar o efeito de melatonina sobre o HDL e colesterol do sangue, foram avaliadas somente nas semanas após o tratamento (semanas 5 a 11) para as características bioquímicas do sêmen e do sangue. Não foi observado efeito de tratamento ou insulação para as variáveis analisadas do sêmen (Apêndice H). Também não houve efeito sobre as características de AST, GGT, ALT, CK, triglicérides, NEFA e proteína total (Apêndice H). Contudo, na análise do sangue observou-se diferenças no uso da melatonina em ambos os grupos insulado e controle para HDL, Albumina (ALB), BHB e colesterol, conforme ilustrado na tabela 7.

Os animais insulados e tratados com melatonina apresentaram menor quantidade de HDL sanguíneo. Já a albumina se apresentou menor no grupo controle sem melatonina, e maior no grupo controle com melatonina. O BHB teve menor concentração nos animais insulados com melatonina. Por fim, animais insulados tratados com melatonina apresentaram menor concentração de colesterol circulante.

Tabela 7: Média $\pm$ E.P.M. das análises bioquímicas de HDL (nmol/L), Albumina (g/dL), BHB (mg/dL) e colesterol (mg/dL) do sangue comparando-se o tratamento com melatonina aos grupos insulados ou controle no período pós tratamento com melatonina (semanas 5 a 11).

	Melatonina		Sem Melatonina		p
	Controle	Insulado	Controle	Insulado	
HDL	66.43 $\pm$ 2.25 ^{a,b}	59.14 $\pm$ 2.47 ^b	66.36 $\pm$ 2.49 ^{a,b}	69.57 $\pm$ 2.25 ^a	0.02
Albumina	2.70 $\pm$ 0.05 ^a	2.57 $\pm$ 0.06 ^{a,b}	2.44 $\pm$ 0.06 ^b	2.56 $\pm$ 0.05 ^{a,b}	0.02
BHB	3.64 $\pm$ 0.16 ^a	2.87 $\pm$ 0.17 ^b	3.49 $\pm$ 0.17 ^a	3.37 $\pm$ 0.16 ^{a,b}	0.05
Colesterol	122.25 $\pm$ 4.67 ^a	103.90 $\pm$ 5.12 ^b	121.48 $\pm$ 5.12 ^{a,b}	122.01 $\pm$ 4.69 ^a	0.05

^{a,b}: Linhas com letras sobrescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

7. DISCUSSÃO

A melatonina tem papel fundamental na regulação de diversos hormônios, incluindo os hormônios ligados à reprodução, contudo seu uso no macho se restringe a aplicação direta no sêmen para melhorar a criopreservação do mesmo, ou é feito o uso de implantes auriculares principalmente em ovinos para indução da qualidade espermática na contra estação reprodutiva. Ao conhecimento desses autores esse é o primeiro estudo que visa buscar uma alternativa não só para o uso do implante de melatonina, que não é permitido no Brasil pela ANVISA, mas também para a resolução do quadro de degeneração testicular em bovinos utilizando-se da melatonina e sua aplicação sistêmica.

7.1. EXPERIMENTO 1

A aplicação de melatonina exógena tem potencial crescente na reprodução, principalmente na sincronização de animais fotoperíodo dependentes como ovinos (MURA et al., 2017), caprinos (ZARAZAGA et al., 2009) e equinos (MCMANUS e FITZGERALD, 2003), por meio da utilização de implantes de liberação lenta e contínua de melatonina. Contudo, seu uso não se restringe somente a fêmea, tendo papel importante na regulação da espermatogênese (BOWEN NIU et al., 2016; DENG et al., 2018).

Nossos achados demonstram efetividade na via de administração da melatonina e no tipo de veículo utilizado, e corroboram os achados de Kumar et al. (2016), que encontraram pico da concentração sérica 8 dias pós-aplicação, semelhante ao observado no gráfico 1. Contudo, foi observado retorno à concentração normal por volta do 16º dia, enquanto Kumar et al. (2016) observaram a mesma somente por volta do 36º dia. Perumal et al. (2018) também utilizaram melatonina diluída em veículo oleoso em *Bos frontalis* e observaram um pico de melatonina 8 dias após a aplicação, mantendo-se essa também elevada até 36 dias após a aplicação. Essa diferença pode ter se dado ao fato de os búfalos serem animais sazonais, além da diferença na concentração entre espécies. Também pode-se remeter a via de aplicação, devido as diferenças de absorção entre a via intramuscular e via subcutânea e seus mecanismos por vias linfáticas e sanguíneas (BALLARD, 1968) utilizada pelos autores.

Observamos que o tratamento com 18 mg mostrou uma manutenção da concentração de melatonina por 8 dias de maneira mais estável que 27 mg, a qual teve menor concentração 8 dias após a aplicação. Devido a esse fato, foi selecionada a concentração de 18 mg/ 50kg de peso vivo para o segundo experimento. Tendo em vista esse fato foi necessário averiguar se o período de aumento da melatonina causado pelo tratamento com 18 mg foi suficiente para causar efeitos benéficos na recuperação testicular.

7.2. EXPERIMENTO 2

O tratamento com melatonina exógena foi efetivo em adiantar a recuperação espermática em algumas características de motilidade e preservação de membranas. Porém, outras características somente seguiram o esperado para animais que sofreram degeneração testicular.

Neste estudo observou-se queda na consistência testicular nos animais somente no momento de retirada da bolsa testicular, ou seja, no momento do insulto testicular. Contudo, o perímetro escrotal não foi afetado. É sabido que logo após a degeneração ocorre perda de peso testicular, principalmente pela perda de células germinativas por apoptose (DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015). Balão da Silva et al. (2011) mostraram que a incubação com diferentes concentrações de melatonina no sêmen equino diminuiu a taxa de apoptose significativamente. Apesar de ser descrito em ratos que o testículo recupera seu peso semanas após a retirada do estresse, os testículos permanecem mais leves que anterior ao insulto (SETCHELL et al., 2002). Os animais não apresentaram alterações de tamanho e consistência do testículo ao longo do tempo pós-insulação, podendo o tempo do insulto não ter sido suficiente para causar significativa perda de células, e consequentemente alterações de tamanho testicular. Como esse efeito não ocorreu nos animais insulados é esperado o tratamento com melatonina não ter apresentado efeito, pois sua aplicação foi curativa e não preventiva.

A melatonina tem potencial para causar alterações na vascularização. Conforme o modelo proposto por Lemley e Vonnahme (2017), a melatonina por meio de sua ligação a receptores específicos (MT1 e MT2) pode diminuir a vasodilatação, via queda de AMPc, e aumentar a vasoconstrição, via aumento de cálcio intracelular. Também a atividade antioxidante da melatonina sobre os receptores MT2 estão ligados a

relaxamento vascular por vias de aumento da disponibilidade de óxido nítrico em trechos vasculares específicos (LEMLEY E VONNAHME, 2017). Entretanto, no presente estudo não foram observadas alterações vasculares testiculares com o tratamento com melatonina ou como causa da insulação, podendo ser proposto que ambos não foram suficientes para levar a alterações na vascularização testicular.

Foi possível observar pelos resultados da motilidade subjetiva (gráfico 3), que o insulto térmico gerado nos animais foi eficiente em levar a queda do número de espermatozoides vivos. Ao se observar o vigor espermático não foi possível observar efeito da insulação até a semana 6 pós-insulação, na qual não somente a insulação reduziu o mesmo como o tratamento com melatonina evitou essa queda. Perumal et al. (2018) observaram em *Bos frontalis* aumento da motilidade progressiva após o tratamento com melatonina exógena.

Apesar da motilidade subjetiva não ter apresentado efeito do tratamento com melatonina a motilidade total analisada pelo sistema CASA mostrou uma redução 21 e 28 dias após a insulação (antes da aplicação da melatonina), mostrando efeito da insulação levando a degeneração testicular e 15 dias após a aplicação da melatonina os animais insulados que não receberam tratamento apresentavam motilidade reduzida em relação aos controles, enquanto os insulados tratados mantiveram a motilidade similar aos controles (tabela 2).

Em bodes, o tratamento com melatonina por implante auricular foi comparado aos animais em dias longos e curtos, não sendo observada diferença na motilidade subjetiva e total pelo sistema CASA, sendo apenas maiores as características de VAP, VSL, VCL, STR e LIN para os animais tratados com melatonina ou em dias curtos (GALEGO-CALVO et al., 2015). Em outro estudo, o uso de implantes auriculares de melatonina em carneiros mostrou aumento na motilidade progressiva 30 dias após a colocação do implante, chegando ao pico por volta de 46 dias (CASAO et al., 2010a).

A aplicação de melatonina diretamente no sêmen para congelação em carneiros mostrou maior preservação da motilidade total observada pelo sistema CASA pós-descongelação na dose de 0.1 e 1 mM (SUCCU et al., 2011). Em bovinos, resultados semelhantes foram encontrados nas concentrações de 1 e 2 mM de melatonina, sendo efetiva em preservar a motilidade total e a progressiva (ASHRAFI et al., 2013).

O insulto da insulação testicular teve grande impacto sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal como pode ser observado nos gráficos 4, 5 e 6. Alves et al. (2016) mostraram que em carneiros houve queda da integridade das membranas 21

dias após a insulação, enquanto que neste estudo esse efeito se apresentou 15 dias após. Contudo, o tratamento com melatonina não afetou a recuperação da integridade, visto que foi um tratamento curativo e não preventivo aplicado 4 semanas após a retirada do insulto, o que pode se propor que o tratamento durante ou previamente ao insulto possa levar a maior preservação das membranas.

Ashrafi et al. (2013) observaram maior preservação das membranas espermáticas pós-congelação, observado pelo teste hiposmótico quando administrado 1, 2 e 3 mM de melatonina diretamente ao sêmen bovino. Foi observado também em *Bos frontalis*, uma subespécie bovina, que o tratamento com implantes de melatonina aumentou a preservação das membranas plasmática e mitocondrial (PERUMAL et al., 2018)

Contudo, as observações sobre o efeito do tratamento com melatonina sobre o potencial mitocondrial mostram aumento do mesmo 15 dias após o tratamento em animais que sofreram a insulação (tabela 3), o que explica a maior motilidade observada na tabela 2, visto que o potencial de membrana mitocondrial pode ser considerado um regulador e indicador da motilidade espermática (AGNIHOTRI et al., 2016), e o mecanismo antioxidante da melatonina pode regular o potencial mitocondrial. Os achados deste estudo vão de encontro com o observado por Balão da Silva et al. (2011) que observaram, em espermatozoides equinos, que a incubação em concentrações acima de 1 μ M de melatonina por 3 horas diminuiu o potencial mitocondrial.

Os achados de morfologia espermática deste estudo evidenciam o efeito da degeneração testicular, observando-se aumento de defeitos menores, maiores e totais nos animais insulados desde 7 dias pós-insulação. Estes dados corroboram os achados de Alves et al. (2016) em carneiros, no qual houve aumento principalmente de defeitos maiores e totais 21 dias após a insulação até 63 dias. O tratamento com melatonina em *Bos frontalis* apresentou menor quantidade de anormalidades espermáticas (PERUMAL et al., 2018); entretanto, o mesmo não foi observado no presente estudo com modelo de degeneração testicular em bovinos.

O tratamento 1 e 2 mM de melatonina sobre o sêmen congelado de bovinos mostrou menor porcentagem de anormalidades espermáticas (ASHRAFI et al., 2013). Em ratos induzidos a isquemia testicular, o tratamento com melatonina sérica preveniu tanto as anormalidades de cabeça quanto as anormalidades totais dos espermatozoides, as quais se mostraram menores do que em animais não tratados (KURCER et al., 2010). Contudo, o mesmo não foi evidenciado neste estudo, apesar de diferença significativa com o

tratamento em defeitos menores (tabela 4), os efeitos se apresentaram antes da aplicação da melatonina, ou seja, não podendo essa diferença ser atribuída ao tratamento.

Em carneiros submetidos à degeneração testicular observou-se aumento no TBARS 49 dias após a insulação (ALVES et al., 2016), enquanto no presente estudo apenas TBARS espontâneo apresentou aumento 63 dias após a insulação. O TBARS espontâneo do sangue apresentou apenas aumento no grupo insulado e tratado com melatonina 15 dias após a aplicação da melatonina, aumento contraditório ao esperado, visto que a melatonina tende a reduzir as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

O uso da melatonina na congelação do sêmen bovino mostrou maior capacidade antioxidante total e maior atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e malonaldeído (ASHRAFI et al., 2013), mostrando o papel estimulador da melatonina sobre a atividade antioxidante. O mesmo foi observado por Casao et al. (2010b) que notaram maior quantidade de melatonina em carneiros durante a estação reprodutiva do que na contra-estação, assim como maior concentração de glutathione redutase. Em espermatozoides de garanhões incubados com melatonina houve queda significativa na peroxidação lipídica dos mesmos (BALAO DA SILVA et al., 2011)

Apesar de ser consolidado que o estresse térmico leva a aumento significativo do dano a integridade do DNA (PÉREZ-CRESPO et al., 2008), não foi observado, no presente estudo, dano detectável ao DNA em nenhum dos momentos pós-insulação, e consequentemente não foram observados efeitos da melatonina sobre a integridade do mesmo visto que os grupos foram iguais. O uso da melatonina na congelação de sêmen ovino mostrou maior preservação da integridade do DNA de maneira dose dependente (SUCCU et al., 2011), sendo as concentrações menores que 0.1 mM efetivas na preservação do DNA, porém concentrações acima de 1mM não tiveram o mesmo efeito.

Quanto as características bioquímicas, Nogueira (2018) não encontrou relação em bovinos da raça Nelore submetidos à insulação escrotal para as características séricas de HDL, Albumina, BHB e Colesterol. O mesmo foi observado neste estudo, no qual somente efeito isolado da melatonina foi observado para HDL e colesterol sérico (tabela 6), porém foi realizada uma segunda análise com os animais somente após o tratamento com melatonina (tabela 7). Foi observada menor concentração de HDL, BHB e colesterol séricos em animais insulados que receberam o tratamento com melatonina, isso pode se dever ao fato de a melatonina ter ação direta na regulação do metabolismo lipídico no fígado (SUN et al., 2015), além de regular o metabolismo da glicose (ESPINO et al.,

2011). Perumal et al. (2018) observaram queda em AST, ALT e colesterol quando feito tratamento com melatonina de liberação prolongada. No presente estudo se observou que a melatonina tem poder modulatório sobre HDL, albumina, BHB e colesterol de animais que sofreram insulto testicular.

8. CONCLUSÃO

A aplicação de melatonina diluída em veículo oleoso por via intramuscular foi efetiva em causar elevação da concentração sérica da mesma em bovinos com normalização 16 dias após. O uso da melatonina como tratamento para degeneração testicular 28 dias após o insulto é efetivo na retomada da qualidade seminal, sendo que promove o aumento da motilidade, vigor espermáticos e potencial mitocondrial dos espermatozoides bovinos. Contudo, mais estudos acerca de seus mecanismos e tratamento precoce ou preventivo devem ser realizados.

9. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, N. **Effects of scrotal insulation on spermatozoal morphology and chromatin stability to acid denaturation in the bovine** . 2001. Dissertação (Master of Science in Dairy Science) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 2001.

AGNIHOTRI, S.K.; AGRAWAL, A.K.; HAKIM, B.A.; VISHWAKARMA, A.L.; NARENDER, T.; SACHAN, R.; SACHDEV, M. Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 52, n. 9, p. 953-960, 2016.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garranhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal Suplemento**, Belo Horizonte, n.6, p.204-209, dez. 2009.

ALVES, M.B.R. Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade. 2014. **Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

ALVES, M.B.R.; DE ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A.; LANÇONI, R.; OLIVEIRA, B.M.M.; TORRES, M.A.; RAVAGNANI, G.M.; ALMEIDA, T.G.; VELLONE, V.S.; CELEGHINI, E.C.C. An Efficient Technique to Detect Sperm Reactive Oxygen Species: The CellRox Deep Red® Fluorescent Probe. **Biochemistry & Physiology: Open Access**, v. 4, n.2, p. 1-5, 2015.

ALVES, M.B.R.; DE ANDRADE, A.F.C.; DE ARRUDA, R.P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A.; DE OLIVEIRA, B.M.M.; TORRES M.A.; LANÇONI R.; RAVAGNANI G.M.; PRADO FILHO R.R.; VELLONE V.S.; LOSANO J.D.; FRANCI C.R.; NICHI M.; CELEGHINI E.C. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 795-805. e2, 2016.

AQUINO-CORTEZ, A.I.; SILVA, L.D.M.; ARAÚJO, A.A.; MENEZES, E.S.B.; MOURA, A.A.A. Proteins of the canine seminal plasma Proteínas do plasma seminal canino. **Ciência Rural**, 4646, p.901–908, 2016.

ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121 f. **Tese (Livro Docência)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145–151, abr./jun. 2011.

ARTEAGA, A.A.; BARTH, A.D.; BRITO, L.F.C. Relationship between semen quality and pixel–intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 64, p.408-415, 2005.

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.

BALAO DA SILVA, C. M.; MACÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORILLO-RODRIGUEZ, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLAÑOS J.M.; STILWELL G.; TAPIA J.A.; PEÑA, F.J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 2, p. 172-179, 2011.

BALLARD, B.E. Biopharmaceutical considerations in subcutaneous and intramuscular drug administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 3, p. 357-378, 1968.

BATISSACO, L.; CELEGHINI, E.C.C.; PINAFFI, F.L.V.; OLIVEIRA, B.M.M.; ANDRADE, A.F.C.; SERRANO-RECALDE, E. C.; FERNANDES, C.B. Correlations between testicular hemodynamic and sperm characteristics in rams. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, p. 384-395, 2013.

BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of pre-implantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 235–247, 1983.

BEHNE, D.; WEILER, H.; KYRIAKOPOULOS, A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 291–297, 1996.

BIAGIOTTI, G.; CAVALLINI, G.; MODENINI, F.; VITALI, G.; GIANAROLI, L. Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery. **British Journal of Urology International**, v. 90, p. 903–908, 2002.

BICUDO, S.D.; SIQUEIRA, J.B.; MEIRA, C. Palestra Patologias do Sistema Reprodutor de Touros. **Biológico**, v.69, n.2, p.43-48, 2007.

BLAZQUEZ, N.B.; MALLARD, G.J.; WEDD, S.R. Sweet glands of the scrotum of the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 673-677, 1988.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin.**, v. 25, p. 383-391, 1973.

BLOWEY, R.W.; WOOD, D.W.; DAVIS, J.R. A nutritional monitoring system for dairy herds based on blood glucose, urea and albumin levels. **Veterinary Record**, v. 82, p. 691-696, 1973.

BOWEN NIU, B.L.; WU, C.; WU, J.; YAN, Y.; SHANG, R.; BAI, C.; LI, G.; HUA, J. Melatonin promotes goat spermatogonia stem cells (SSCs) proliferation by stimulating glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) production in sertoli cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 47, p. 77532, 2016.

CAPRARO, G.A.; COUGHLIN, B.F.; MADER, T.J.; SMITHLINE, H.A.. Testicular cooling associated with testicular torsion and its detection by infrared thermography: an experimental study in sheep. **The Journal of Urology**, v. 180, n. 6, p. 2688-2693, 2008.

CASAO, A.; VEGA, S.; PALACÍN, I.; PÉREZ-PE, R.; LAVIÑA, A.; QUINTÍN, F. J.; SEVILLA E.; ABECIA J.A.; CEBRIÁN-PÉREZ J.A.; FORCADA F.; MUIÑO-BLANCO, T. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 3, p. 425-432, 2010a.

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

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E.C.C.; ALVES, M.B.R.; OLIVEIRA, B.M.M.; BATISSACO, L.; PINTO, S.C.C.; GONZAGA, V.H.G.; NOGUEIRA, V.J.M.; GARCIA-OLIVEROS, L.N.; ALMEIDA, F.S. Degeneração testicular: visão científica. **Documentos EMBRAPA**, v. 146, p. 30-36, 2017.

CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, No. 2, pp. 85-99, 2005.

COULTER, G.H.; SERENGER, P.L.; BAILEY, D.R.C. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 417-423, 1988.

DAHL, G.E.; BUCHANAN, B.A.; TUCKER, H.A. Photoperiodic effects on dairy cattle: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 885–893, 2000.

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

DENG, S.L.; WANG, Z.P.; JIN, C.; KANG, X.L.; BATOOL, A.; ZHANG, Y.; LI X.Y.; WANG X.X.; CHEN S.R.; CHANG C.S.; CHENG C.Y.; LIAN Z.X.; LIU Y.X. Melatonin promotes sheep Leydig cell testosterone secretion in a co-culture with Sertoli cells. **Theriogenology**, v. 106, p. 170-177, 2018.

DUDEA, S.M.; CIUREA, A.; CHIOREAN, A.; BOTAR-JID, C. Doppler applications in testicular and scrotal disease. **Medical Ultrasonography**, v. 12, n.1, p. 43-51, 2010.

DURAIRAJANAYAGAM, D.; AGARWAL, A.; ONG, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. **Reproductive biomedicine online**, v. 30, n. 1, p. 14-27, 2015.

ESPINO, J.; PARIENTE, J.A.; RODRÍGUEZ, A.B. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders. **World journal of diabetes**, v. 2, n. 6, p. 82, 2011.

GABALDI, S.H.; DEFINE, R.M.; BARROS, C.M.Q.; MASCARO, K.; KASTELIC, J.P.; ROSA, G.J.M. Efeitos da elevação da temperatura testicular nas características espermáticas em touros Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 23(3): 222-224, 1999.

GALLEGO-CALVO, L.; GATICA, M.C.; SANTIAGO-MORENO, J.; GUZMÁN, J.L.; ZARAZAGA, L.A. Exogenous melatonin does not improve the freezability of Blanca Andaluza goat semen over exposure to two months of short days. **Animal Reproduction Science**, v. 157, p. 24-32, 2015.

GARCÍA, A.; LANDETE-CASTILLEJOS, T.; ZARAZAGA, L.; GARDE, J.; GALLEGU, L. Seasonal changes in melatonin concentrations in female Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 161–166, 2003.

GARCIA, A.R. Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touro Simental (*Bos taurus taurus*). 2004. 258f. **Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

GARCIA, A.R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.33-39, 2017.

GAZVANI, M.R.; WOOD, S.J.; THOMSON, A.J.; KINGSLAND, C.R.; LEWIS-JONES, D.I. Assessment of testicular core temperature using microwave thermography. **Human Reproduction** (Oxford, England), v. 15, n. 8, p. 1723-1726, 2000.

GODOY, M.M.D.; ALVES, J.B.; MONTEIRO, A.L.G.; VALÉRIO FILHO, W.V. Parâmetros reprodutivo e metabólico de vacas da raça Guzerá suplementadas no pré e pós-parto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 103-111, 2004.

GOFF, J.P. Vitaminas. In: REECE, W. O. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 520.

GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L.A.O. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso na nutrição e doenças nutricionais. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, p. 89, 2000.

GOOVAERTS, I.G.F.; CORTADA, C.N.M.; BARNABE, V.H.; DE CLERCQ, J.B.P.; BOLS, P.E.J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

GRUYS, E.; OBWOLO, M.J.; TOUSSAINT, M.J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Vet Bull.** v. 64, p. 1009–1018. 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, Oxford: Clarendon Press; 1989. p. 543.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine** 1991;91: 14–22.

HANSEN, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3341–3350, 27 nov. 2009.

HSU, P.C.; LIUM, M.Y.; HSU, C.C.; CHEN, L.Y.; GUO, Y.L. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v. 128, n. 3, p. 169-179, 1998.

INTASQUI, P.; CAMARGO, M.; ANTONIASSI, M.P.; CEDENHO, A.P.; CARVALHO, V.M.; CARDOZO, K.H.M.; CARVALHO V.M.; CARDOZO K.H.M.; ZYLBERSZTEJN D.S.; BERTOLLA, R.P. Association between the seminal plasma proteome and sperm functional traits. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 3, p. 617-628, 2016.

JANKOVIC, V.L.; STEFANOVIC, V. Hypoxia and spermatogenesis. **International Urology and Nephrology**, v. 46(5), p. 887-94, 2014.

JOHNSTON, J.D.; KLOSEN, P.; BARRETT, P.; HAZLERIGG, D.G. Regulation of MT melatonin receptor expression in the foetal rat pituitary. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, p. 50–56, 2006.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic press, 2008. 916p.

KANTER, M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia–reperfusion injury in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, p. 314–320, 2010.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 81-85, set. 1996a.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H.; SAACKE, R.G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the Bull. **Theriogenology**, v.45, p.935-942, 1996b.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; PIERSON, R.A.; COULTER, G.H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, p.111-115, 2001.

KUMAR, A.; MEHROTRA, S.; SINGH, G.; MAURYA, V.P.; NARAYANAN, K.; MAHLA, A.S.; CHAUDHARI, K.; SINGH, M.; SONI, Y.K.; KUMAWAT, B.L.; DABAS, S.K.; SRIVASTAVA, N. Supplementation of slow-release melatonin improves recovery of ovarian cyclicity and conception in summer anoestrous Buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 1, p. 10-17, 2016.

KURCER, Z.; HEKIMOGLU, A.; ARAL, F.; BABA, F.; SAHNA, E. Effect of melatonin on epididymal sperm quality after testicular ischemia/reperfusion in rats. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 5, p. 1545-1549, 2010.

LAGERLOF, N. Infertility in male domestic animals. **Veterinary Medicine**, v. 33, p. 550-561, 1938.

LAM, W.W.; YAP, T.; JACOBSEN, A.S.; TEO, H. J. E. Colour Doppler ultrasonography replacing surgical exploration for acute scrotum: myth or reality? **Pediatric Radiology**, v. 35, p. 597-600, 2005.

LANG, U.; AUBERT, M.L.; RIVEST, R.W.; VINAS-BRADTKE, J.C.; SIZONENKO, P.C. Daily afternoon administration of melatonin does not irreversibly inhibit sexual maturation in the male rat. **Endocrinology**, v. 115, p. 2303–2310, 1984.

LEMLEY, C.O.; VONNAHME, K.A. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Alterations in uteroplacental hemodynamics during melatonin supplementation in sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 5, p. 2211-2221, 2017.

LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Front Bioscience**, v. 5, p. 1–15, 2000.

LU, J.C.; JING, J.; YAO, Q.; FAN, K.; WANG, G.H.; FENG, R.X.; LIANG Y.J.; CHEN L.; GE Y.F.; YAO, B. Relationship between lipids levels of serum and seminal plasma and semen parameters in 631 Chinese subfertile men. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0146304, 2016.

MARTINO, P.M.; GALOSI, A.B.; BITELLI, M.; CONSONNI, P.; FIORINI, F.; GRANATA, A.; GUNELLI, R.; LINGUORI, G.; PALAZZO, S.; PAVAN, N.; SCATTONI, V.; VIRGILI, G. Practical recommendations for performing ultrasound scanning in the urological and andrological fields. **Archivio Italiano di Urologia e Andrologia**, p.56-78, 2014.

MCMANUS, C J.; FITZGERALD, B.P. Effect of daily clenbuterol and exogenous melatonin treatment on body fat, serum leptin and the expression of seasonal anestrus in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 76, n. 3-4, p. 217-230, 2003.

MOULE, G.R.; WAITES, G.M. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 433-446, jun. 1963.

MRUK, D.D.; CHEG, C.Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004.

MURA, M.C.; LURIDIANA, S.; FARCI, F.; DI STEFANO, M.V.; DAGA, C.; PULINAS, L.; STARIČ J.; CARCANGIU, V. Melatonin treatment in winter and spring and reproductive recovery in Sarda breed sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 185, p. 104-108, 2017.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**. v. 168, p. 28–40, 2004.

NETO, C.R.; RODELLO, L.; BICUDO, S.D. Termografia escrotal em ovinos pré-púbers submetidos a estresse térmico. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, p. 1271, 2011.

NOGUEIRA, V.J.M. **Relações entre a bioquímica sérica e do plasma seminal com as alterações espermáticas de touros Nelore com degeneração testicular**. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

OGINO, M.; MATSUURA, A.; YAMAZAKI, A.; IRIMAJIRI, M.; KUSHIBIKI, S.; SHINGU, H.; KASUYA, E.; HASEGAWA, Y.; HODATE, K. Plasma melatonin secretion rhythms in cattle under varying seasonal conditions. **Animal Science Journal**, v. 84, p. 253–257, 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

PARLAKTAS, B.S.; ATILGAN, D.; OZYURT, H.; GENCTEN, Y.; AKBAS, A.; ERDEMIR, F.; ULUOCAK, N. The biochemical effects of ischemia–reperfusion injury in the ipsilateral and contralateral testes of rats and the protective role of melatonin. **Asian Journal of Andrology**, v.16, p. 314–318, 2014.

PAUL, C.; MURRAY, A.A.; SPEARS, N.; SAUNDERS, P.T.K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. **Reproduction**, v. 136, p. 73–84, jul. 2008.

PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P.T.K. A Single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. **Biology of Reproduction**, v. 80, n.5, p. 913-919, jan. 2009.

PAYNE, J.M.; DEW, S.M.; MANSTON, R.; FAULKS, M. The use of a metabolic profile test in dairy herds. **Veterinary Record**, v.87, p.150-157, 1970.

PEIXOTO, L.A.O.; BRONDANI, I.L.; NÖRNBERG, J.L.; RESTLE, J.; ALVES FILHO, D.C.; PAZINI, M.; CORADINI, M.T.; SANTOS, C.V.M. Perfil metabólico protéico e taxas de concepção de vacas de corte mantidas em pastagem natural ou suplementadas com farelo de trigo com ou sem uréia. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, 2006.

PEIXOTO, L.A.O.; OSÓRIO, M.T.M. Perfil metabólico protéico e energético na avaliação do desempenho reprodutivo em ruminantes. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.3, p.299-304, 2007.

PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability , sperm DNA integrity , and the offspring sex ratio in mice. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 40–47, jan. 2008.

PERUMAL, P.; CHANG, S.; BARUAH, K. K.; SRIVASTAVA, N. Administration of slow release exogenous melatonin modulates oxidative stress profiles and in vitro fertilizing ability of the cryopreserved mithun (*Bos frontalis*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 120, p. 79-90, 2018.

PETERS, R.R.; CHAPIN, L.T.; LEINING, K.B.; TUCKER, H.A. Supplemental lighting stimulates growth and lactation in cattle. **Science**, v. 199, p. 911–912, 1978.

PIERI, C.; MARRA, M.; MORONI, F.; RECCHIONI, R.; MARCHESELLI, F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sciences**, v. 55, p. 271–276, 1994.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; OSUNA, C.; GITTO, E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, n. 6, p. 444-458, 2000.

ROBINSON, J.J. Nutrition and reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 25–34, 1996.

ROCHA, C.S.; MARTINS, A.D.; RATO, L.; SILVA, B.M.; OLIVEIRA, P.F.; ALVES, M.G. Melatonin alters the glycolytic profile of Sertoli cells: implications for male fertility. **Molecular Human Reproduction**, v. 20 (11), p. 1067-1076, 2014.

ROCHA, D.R.; MARTINS, J.A.M.; TILBURG, M.F.V.; OLIVEIRA, R.V.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R.A.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A. Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. **Theriogenology**, v. 84, I. 8, p. 1291–1305, 2015.

ROSSI, S.P.; WINDSCHUETTL, S.; MATZKIN, M.E.; TERRADAS, C.; PONZIO, R.; PUIGDOMENECH, E.; LEVALLE, O.; CALANDRA, R.S.; MAYERHOFER, A.; FRUNGIERI, M.B. Melatonin in testes of infertile men: evidence for anti-proliferative and anti-oxidant effects on local macrophage and mast cell populations. **Andrology**, v. 2 (3), p.436-449, 2014.

ROWLANDS, G.J.; MANSTON, R.; POCOCK, M.; DEW, M.S. Relationships between stage of lactation and pregnancy and blood composition in a herd of dairy cows and the influence of seasonal changes in management on these relationships. **Journal of Dairy Research**, v. 42, p. 718, 1975.

ROWLANDS, G.J. Metabolites in the blood of beef and dairy cattle. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 35, p. 172-235, 1980.

SAKR, S.A.R.; MAHRAN, H.A.; NOFAL, A.E. Effect of selenium on carbimazole-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, p. 59-66, jan. 2011.

SETCHELL, B.P. The Parkes Lecture. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 179–194, nov. 1998.

SETCHELL, B.P.; PLOEN, L.; RITZEN, E.M. Effect of local heating of rat testes after suppression of spermatogenesis by pretreatment with a GnRH agonist and an anti-androgen. **Reproduction**, v. 124, n. 1, p. 133-140, 2002.

SOKOLOVIC, D.; DJORDJEVIC, B.; KOCIC, G.; STOIMENOV, T.J.; STANOJKOVIC, Z.; SOKOLOVIC, D.M.; VELJKOVIC, A.; RISTIC, G.; DESPOTOVIC, M.; MILISAVLJEVIC, D.; JANKOVIC, R.; BINIC, I. The Effects of Melatonin on Oxidative Stress Parameters and DNA Fragmentation in Testicular Tissue of Rats Exposed to Microwave Radiation. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 24 (3), p. 429-436, 2015.

SOUZA, L.W.O. Efeitos da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentrações de testosterona e IGF1 no plasma seminal de touros (*Bos taurus taurus*) submetidos à degeneração testicular. 2004. 183F. **Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; PASCIU, V.; SATTA, V.; LEONI, G.G.; NAITANA, S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 3, p. 310-318, 2011.

SUN, H.; HUANG, F.F.; QU, S. Melatonin: a potential intervention for hepatic steatosis. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 1, p. 75, 2015.

TUCKER, H.A.; RINGER, R.K. Controlled photoperiodic environments for food animals. **Science**, v. 216, p. 1381–1386, 1982.

VERNET, P.; AITKEN, R.J.; DREVET, J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular Cell Endocrinology** 2004; 216:31–9.

VIGUERAS-VILLASEÑOR, R.M.; OJEDA, I.; GUTIERREZ-PÉREZ, O.; CHAVEZ-SALDAÑA, M.; CUEVAS, O.; MARIA, D.S.; ROJAS-CASTAÑEDA, J.C. Protective effect of α -tocopherol on damage to rat testes by experimental cryptorchidism. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 92, p. 131-139, abr. 2011.

WEAVER, D.R.; STEHLE, J.H.; STOPA, E.G.; REPPERT, S.M. Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 76, p. 295–301, 1993.

YANG, W.C.; TANG, K.Q.; FU, C.Z.; RIAZ, H.; ZHANG, Q.; ZAN, L.S. Melatonin regulates the development and function of bovine Sertoli cells via its receptors MT1 and MT2. **Animal Reproduction Science**, v. 147, p. 10-16, 2014.

YUE, D.; YAN, L.; LUO, H.; XU, Z.; JIN, X. Effect of vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 217-222, 2010.

ZARAZAGA, L.A.; GATICA, M.C.; CELI, I.; GUZMÁN, J.L.; MALPAUX, B. Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 910-918, 2009.

ZHANG, H.M.; ZHANG, Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, v. 57, p. 131–146, 2014.

ZHANG, H.Y.; LU, J.C.; FENG, R.X. Correlations of 24 biochemical markers in seminal plasma with routine semen parameters. **Zhonghua nan ke xue= National Journal of Andrology**, v. 21, n. 12, p. 1087-1092, 2015a.

ZHANG, M.H.; ZHANG, A.D.; SHI, Z.D.; WANG, L.G.; QIU, Y. Changes in Levels of Seminal Nitric Oxide Synthase, Macrophage Migration Inhibitory Factor, Sperm DNA Integrity and Caspase-3 in Fertile Men after Scrotal Heat Stress. **PLoS ONE**, 10(10), e0141320, 2015b.

APÊNDICE A – TERMODINÂMICA E HEMODINÂMICA

Médias $\pm$ E.P.M. da temperatura média testicular ($^{\circ}\text{C}$) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	33.08 $\pm$ 0.41	33.37 $\pm$ 0.42	32.93 $\pm$ 0.18	32.98 $\pm$ 0.1
-1	33.05 $\pm$ 0.36	32.93 $\pm$ 0.2	32.85 $\pm$ 0.3	33.14 $\pm$ 0.26
1	34.37 $\pm$ 0.24	34.33 $\pm$ 0.34	33.52 $\pm$ 0.37	34.25 $\pm$ 0.25
2	34.54 $\pm$ 0.55	34.63 $\pm$ 0.05	34.14 $\pm$ 0.12	34.19 $\pm$ 0.54
3	33.94 $\pm$ 0.5	34.09 $\pm$ 0.2	33.22 $\pm$ 0.36	33.74 $\pm$ 0.4
4 ^M	32.85 $\pm$ 0.3	33.19 $\pm$ 0.78	32.73 $\pm$ 0.28	33.46 $\pm$ 0.26
5	33.45 $\pm$ 0.27	33.19 $\pm$ 0.36	32.84 $\pm$ 0.2	33.11 $\pm$ 0.41
6	32.38 $\pm$ 0.45	32.36 $\pm$ 0.72	32.22 $\pm$ 0.49	32.78 $\pm$ 0.53
7	33.21 $\pm$ 0.4	33.59 $\pm$ 0.18	33.21 $\pm$ 0.27	33.67 $\pm$ 0.38
8	33.02 $\pm$ 0.19	34.51 $\pm$ 0.22	33.86 $\pm$ 0.21	34.09 $\pm$ 0.71
9	33.59 $\pm$ 0.36	33.64 $\pm$ 0.17	33.32 $\pm$ 0.27	33.56 $\pm$ 0.21
10	33.15 $\pm$ 0.32	32.77 $\pm$ 0.51	32.62 $\pm$ 0.22	32.85 $\pm$ 0.24
11	32.83 $\pm$ 0.43	33.35 $\pm$ 0.12	32.93 $\pm$ 0.37	33.14 $\pm$ 0.44

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da vascularização do parênquima testicular (0-4) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	2.83 $\pm$ 0.33	2.9 $\pm$ 0.33	2.58 $\pm$ 0.42	3.1 $\pm$ 0.29
-1	2.92 $\pm$ 0.33	2.8 $\pm$ 0.46	2.5 $\pm$ 0.41	3.2 $\pm$ 0.49
0	2.58 $\pm$ 0.35	3.1 $\pm$ 0.4	2.25 $\pm$ 0.36	2.6 $\pm$ 0.43
1	2.83 $\pm$ 0.21	3.4 $\pm$ 0.37	2.75 $\pm$ 0.5	3.3 $\pm$ 0.25
2	2.83 $\pm$ 0.21	3.5 $\pm$ 0.32	2.5 $\pm$ 0.39	2.9 $\pm$ 0.51
3	2.75 $\pm$ 0.17	3.2 $\pm$ 0.41	2.67 $\pm$ 0.28	3.2 $\pm$ 0.2
4 ^M	2.75 $\pm$ 0.17	3.4 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.39	2.8 $\pm$ 0.3
5	2.92 $\pm$ 0.3	3.25 $\pm$ 0.32	3 $\pm$ 0.22	3.8 $\pm$ 0.12
6	2.42 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.29	2.67 $\pm$ 0.28	3.2 $\pm$ 0.41
7	2.83 $\pm$ 0.21	2.9 $\pm$ 0.19	2.58 $\pm$ 0.2	3.75 $\pm$ 0.25
8	2.92 $\pm$ 0.15	3.2 $\pm$ 0.2	2.67 $\pm$ 0.33	3.2 $\pm$ 0.34
9	2.58 $\pm$ 0.35	2.8 $\pm$ 0.2	3.08 $\pm$ 0.27	3.2 $\pm$ 0.37
10	2.5 $\pm$ 0.18	3.3 $\pm$ 0.12	2.08 $\pm$ 0.24	2.6 $\pm$ 0.37
11	2.75 $\pm$ 0.17	2.9 $\pm$ 0.33	3.08 $\pm$ 0.37	2.9 $\pm$ 0.4

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da vascularização do plexo pampiniforme (1-5) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	3.50 $\pm$ 0.22	4.40 $\pm$ 0.19	3.92 $\pm$ 0.24	3.70 $\pm$ 0.34
-1	3.58 $\pm$ 0.33	4.00 $\pm$ 0.35	3.25 $\pm$ 0.11	3.70 $\pm$ 0.34
0	3.92 $\pm$ 0.27	4.00 $\pm$ 0.32	3.83 $\pm$ 0.33	3.80 $\pm$ 0.25
1	3.67 $\pm$ 0.25	3.80 $\pm$ 0.20	4.08 $\pm$ 0.27	3.80 $\pm$ 0.49
2	3.92 $\pm$ 0.33	3.90 $\pm$ 0.19	4.00 $\pm$ 0.29	4.00 $\pm$ 0.45
3	3.83 $\pm$ 0.28	3.90 $\pm$ 0.40	3.83 $\pm$ 0.25	3.80 $\pm$ 0.41
4 ^M	3.67 $\pm$ 0.21	3.90 $\pm$ 0.43	3.75 $\pm$ 0.28	3.30 $\pm$ 0.12
5	3.58 $\pm$ 0.15	4.13 $\pm$ 0.52	3.83 $\pm$ 0.17	3.80 $\pm$ 0.34
6	3.58 $\pm$ 0.20	3.50 $\pm$ 0.32	3.42 $\pm$ 0.15	3.60 $\pm$ 0.43
7	3.25 $\pm$ 0.11	4.10 $\pm$ 0.10	3.67 $\pm$ 0.21	3.90 $\pm$ 0.19
8	3.58 $\pm$ 0.20	4.10 $\pm$ 0.33	3.33 $\pm$ 0.11	3.70 $\pm$ 0.20
9	3.67 $\pm$ 0.31	3.90 $\pm$ 0.24	4.00 $\pm$ 0.22	3.60 $\pm$ 0.43
10	3.33 $\pm$ 0.21	4.40 $\pm$ 0.19	3.50 $\pm$ 0.26	3.80 $\pm$ 0.37
11	3.50 $\pm$ 0.22	3.60 $\pm$ 0.24	3.67 $\pm$ 0.21	3.60 $\pm$ 0.51

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. do índice de resistência – RI (0-1) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	0.67 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.04
-1	0.65 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.06	0.60 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.05
0	0.66 $\pm$ 0.04	0.61 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.06	0.59 $\pm$ 0.05
1	0.58 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.05	0.61 $\pm$ 0.04
2	0.63 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.07	0.61 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.05
3	0.61 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.04
4 ^M	0.67 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.07	0.60 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.04
5	0.68 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.06	0.50 $\pm$ 0.07	0.57 $\pm$ 0.05
6	0.67 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.04
7	0.65 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.04	0.53 $\pm$ 0.04
8	0.68 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.02
9	0.68 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.05
10	0.68 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.04
11	0.67 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.05

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

APÊNDICE B – CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

Médias $\pm$ E.P.M.de concentração espermática (espermatozoides/mL) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	336.25 $\pm$ 70.20	499.17 $\pm$ 66.65	412.00 $\pm$ 105.85	371.88 $\pm$ 110.58
-1	230.42 $\pm$ 44.22	393.33 $\pm$ 201.12	260.00 $\pm$ 115.93	321.88 $\pm$ 105.18
0	352.00 $\pm$ 128.73	171.67 $\pm$ 46.69	341.00 $\pm$ 119.63	289.38 $\pm$ 95.40
1	250.83 $\pm$ 82.68	279.17 $\pm$ 62.82	277.00 $\pm$ 92.22	349.17 $\pm$ 175.42
2	335.00 $\pm$ 91.24	107.50 $\pm$ 41.76	262.00 $\pm$ 96.36	178.75 $\pm$ 61.66
3	226.25 $\pm$ 58.71	127.50 $\pm$ 80.00	215.50 $\pm$ 23.43	93.13 $\pm$ 21.05
4 ^M	262.50 $\pm$ 69.79	118.33 $\pm$ 73.84	154.10 $\pm$ 36.06	215.00 $\pm$ 50.74
5	202.90 $\pm$ 48.78	123.33 $\pm$ 26.82	175.63 $\pm$ 21.61	90.00 $\pm$ 41.17
6	141.25 $\pm$ 38.46	115.83 $\pm$ 34.44	162.50 $\pm$ 41.07	120.75 $\pm$ 83.95
7	268.33 $\pm$ 75.24	164.17 $\pm$ 112.97	380.00 $\pm$ 158.64	144.00 $\pm$ 120.60
8	217.00 $\pm$ 46.54	362.50 $\pm$ 297.50	284.00 $\pm$ 68.70	232.50 $\pm$ 77.31
9	256.67 $\pm$ 39.19	150.00 $\pm$ 83.68	200.50 $\pm$ 57.49	200.00 $\pm$ 85.22
10	240.83 $\pm$ 24.09	146.67 $\pm$ 41.49	278.50 $\pm$ 67.95	235.00 $\pm$ 69.12
11	240.50 $\pm$ 68.54	155.83 $\pm$ 51.57	309.38 $\pm$ 70.37	312.50 $\pm$ 198.37

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

APÊNDICE C – ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN

Médias $\pm$ E.P.M. da motilidade progressiva – MP (%) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	51.33 $\pm$ 6.85	61.00 $\pm$ 10.82	56.40 $\pm$ 4.19	67.75 $\pm$ 8.82
-1	46.50 $\pm$ 5.94	56.00 $\pm$ 12.50	50.20 $\pm$ 8.07	59.25 $\pm$ 10.57
0	47.33 $\pm$ 5.38	52.33 $\pm$ 8.41	55.00 $\pm$ 9.52	53.25 $\pm$ 9.39
1	47.83 $\pm$ 8.24	51.67 $\pm$ 4.63	62.60 $\pm$ 6.64	44.00 $\pm$ 11.06
2	44.83 $\pm$ 7.26	42.00 $\pm$ 7.00	67.00 $\pm$ 5.58	49.75 $\pm$ 6.63
3	45.17 $\pm$ 6.45	32.00 $\pm$ 13.00	56.00 $\pm$ 6.89	35.25 $\pm$ 15.32
4 ^M	53.20 $\pm$ 7.48	26.33 $\pm$ 8.11	54.60 $\pm$ 5.80	42.33 $\pm$ 15.94
5	54.40 $\pm$ 3.98	46.33 $\pm$ 4.98	55.20 $\pm$ 6.48	62.67 $\pm$ 1.86
6	52.33 $\pm$ 6.24	68.00 $\pm$ 7.00	61.60 $\pm$ 6.86	46.25 $\pm$ 23.63
7	54.50 $\pm$ 4.41	52.33 $\pm$ 4.06	57.60 $\pm$ 5.66	46.25 $\pm$ 14.97
8	50.00 $\pm$ 6.30	44.00 $\pm$ 2.00	61.80 $\pm$ 6.81	63.33 $\pm$ 3.76
9	46.00 $\pm$ 7.42	69.00 $\pm$ 3.00	55.20 $\pm$ 9.90	62.25 $\pm$ 8.53
10	48.50 $\pm$ 6.38	57.00 $\pm$ 9.29	64.80 $\pm$ 5.64	66.50 $\pm$ 2.40
11	48.17 $\pm$ 7.99	61.50 $\pm$ 5.50	53.80 $\pm$ 9.55	52.25 $\pm$ 14.74

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da porcentagem de células rápidas – RAP (%) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	54.67 $\pm$ 6.70	65.67 $\pm$ 11.57	61.40 $\pm$ 4.18	72.00 $\pm$ 10.26
-1	50.50 $\pm$ 5.54	59.33 $\pm$ 12.72	54.00 $\pm$ 8.20	63.50 $\pm$ 10.71
0	52.50 $\pm$ 5.35	56.67 $\pm$ 9.06	62.80 $\pm$ 10.74	60.00 $\pm$ 11.31
1	51.67 $\pm$ 8.36	56.67 $\pm$ 4.91	69.00 $\pm$ 6.96	48.00 $\pm$ 12.66
2	51.33 $\pm$ 8.69	45.00 $\pm$ 8.00	76.50 $\pm$ 7.09	54.25 $\pm$ 7.32
3	49.00 $\pm$ 6.77	34.00 $\pm$ 13.00	61.00 $\pm$ 7.64	38.00 $\pm$ 16.31
4 ^M	59.00 $\pm$ 8.47	29.33 $\pm$ 9.26	59.40 $\pm$ 6.61	46.67 $\pm$ 16.76
5	57.80 $\pm$ 3.60	50.00 $\pm$ 5.86	61.20 $\pm$ 7.50	53.00 $\pm$ 13.36
6	58.83 $\pm$ 5.46	74.67 $\pm$ 8.09	68.80 $\pm$ 6.20	37.00 $\pm$ 19.35
7	58.00 $\pm$ 5.61	55.67 $\pm$ 5.49	63.20 $\pm$ 5.99	50.75 $\pm$ 16.84
8	57.00 $\pm$ 6.04	47.50 $\pm$ 2.50	69.00 $\pm$ 7.68	71.33 $\pm$ 6.01
9	50.83 $\pm$ 8.24	76.00 $\pm$ 3.00	62.00 $\pm$ 11.22	66.00 $\pm$ 8.89
10	52.00 $\pm$ 6.63	62.33 $\pm$ 10.17	69.80 $\pm$ 5.54	71.50 $\pm$ 3.97
11	54.33 $\pm$ 8.34	66.00 $\pm$ 6.00	58.20 $\pm$ 10.34	55.75 $\pm$ 16.14

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da velocidade média do trajeto VAP ($\mu\text{m/s}$) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	67.97 $\pm$ 5.99	72.40 $\pm$ 9.46	70.94 $\pm$ 6.15	82.78 $\pm$ 7.37
-1	65.13 $\pm$ 4.75	67.13 $\pm$ 7.72	70.20 $\pm$ 7.18	72.10 $\pm$ 7.75
0	61.72 $\pm$ 1.81	67.53 $\pm$ 5.53	72.12 $\pm$ 6.64	77.80 $\pm$ 8.48
1	68.65 $\pm$ 8.13	67.90 $\pm$ 2.98	71.10 $\pm$ 3.62	71.63 $\pm$ 1.28
2	66.07 $\pm$ 5.00	58.85 $\pm$ 0.45	76.80 $\pm$ 6.76	66.45 $\pm$ 1.47
3	60.42 $\pm$ 2.63	58.55 $\pm$ 1.85	67.26 $\pm$ 3.16	62.75 $\pm$ 7.57
4 ^M	65.90 $\pm$ 5.08	54.60 $\pm$ 3.54	66.48 $\pm$ 3.25	66.87 $\pm$ 2.09
5	64.24 $\pm$ 3.38	59.70 $\pm$ 2.48	65.96 $\pm$ 3.54	72.10 $\pm$ 5.44
6	68.00 $\pm$ 2.41	72.30 $\pm$ 2.92	71.94 $\pm$ 3.88	66.85 $\pm$ 4.47
7	67.18 $\pm$ 3.71	64.13 $\pm$ 2.02	61.80 $\pm$ 4.07	65.58 $\pm$ 7.55
8	64.92 $\pm$ 4.84	57.75 $\pm$ 0.55	70.66 $\pm$ 4.42	75.40 $\pm$ 4.94
9	61.65 $\pm$ 4.52	68.60 $\pm$ 1.40	66.38 $\pm$ 5.38	75.93 $\pm$ 4.65
10	66.65 $\pm$ 4.06	69.55 $\pm$ 15.15	70.94 $\pm$ 3.30	80.43 $\pm$ 4.20
11	64.07 $\pm$ 5.45	68.65 $\pm$ 7.85	68.16 $\pm$ 5.80	68.60 $\pm$ 11.09

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da velocidade progressiva VSL ($\mu\text{m/s}$) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	61.50 $\pm$ 5.90	64.40 $\pm$ 8.29	61.70 $\pm$ 5.97	74.53 $\pm$ 6.38
-1	56.70 $\pm$ 4.41	60.17 $\pm$ 6.94	61.18 $\pm$ 6.57	63.93 $\pm$ 7.53
0	53.37 $\pm$ 1.92	60.00 $\pm$ 4.65	60.56 $\pm$ 5.31	66.13 $\pm$ 6.32
1	60.53 $\pm$ 7.53	57.97 $\pm$ 1.84	61.54 $\pm$ 3.49	62.80 $\pm$ 1.59
2	56.15 $\pm$ 3.93	52.00 $\pm$ 0.40	65.13 $\pm$ 5.38	58.13 $\pm$ 1.46
3	52.42 $\pm$ 2.78	51.35 $\pm$ 1.25	58.76 $\pm$ 3.19	54.03 $\pm$ 7.60
4 ^M	57.00 $\pm$ 4.40	47.03 $\pm$ 2.62	58.02 $\pm$ 2.98	56.90 $\pm$ 3.54
5	56.94 $\pm$ 4.06	52.37 $\pm$ 1.69	56.62 $\pm$ 3.04	65.43 $\pm$ 5.25
6	59.35 $\pm$ 3.52	63.33 $\pm$ 1.90	62.08 $\pm$ 4.86	58.48 $\pm$ 4.03
7	58.97 $\pm$ 3.40	57.37 $\pm$ 1.74	53.20 $\pm$ 4.10	58.13 $\pm$ 6.01
8	50.04 $\pm$ 0.80	50.90 $\pm$ 0.60	60.58 $\pm$ 3.54	64.93 $\pm$ 2.98
9	62.58 $\pm$ 8.33	62.20 $\pm$ 3.10	56.62 $\pm$ 4.92	68.55 $\pm$ 4.71
10	59.95 $\pm$ 3.79	59.83 $\pm$ 8.09	63.00 $\pm$ 3.54	70.63 $\pm$ 4.27
11	54.77 $\pm$ 5.99	61.05 $\pm$ 6.35	59.78 $\pm$ 4.12	61.90 $\pm$ 9.63

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da velocidade curvilinear VCL ($\mu\text{m/s}$) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	98.58 $\pm$ 8.04	105.13 $\pm$ 14.89	111.84 $\pm$ 9.51	119.58 $\pm$ 10.41
-1	98.58 $\pm$ 6.33	95.47 $\pm$ 12.37	113.50 $\pm$ 10.75	110.13 $\pm$ 10.22
0	94.50 $\pm$ 3.39	101.23 $\pm$ 9.72	116.36 $\pm$ 10.93	124.60 $\pm$ 15.76
1	107.00 $\pm$ 12.80	108.50 $\pm$ 7.63	113.74 $\pm$ 6.38	114.77 $\pm$ 1.54
2	103.88 $\pm$ 9.32	90.35 $\pm$ 1.95	120.73 $\pm$ 11.66	102.40 $\pm$ 3.46
3	95.05 $\pm$ 4.28	87.65 $\pm$ 2.35	104.56 $\pm$ 3.51	101.55 $\pm$ 7.82
4 ^M	103.92 $\pm$ 7.45	90.13 $\pm$ 8.46	105.42 $\pm$ 3.68	106.00 $\pm$ 4.37
5	101.58 $\pm$ 5.71	94.87 $\pm$ 6.02	105.28 $\pm$ 6.50	107.70 $\pm$ 7.32
6	108.02 $\pm$ 3.13	107.07 $\pm$ 7.12	107.62 $\pm$ 3.81	104.58 $\pm$ 8.15
7	103.40 $\pm$ 5.54	95.33 $\pm$ 7.02	99.50 $\pm$ 5.01	99.73 $\pm$ 12.74
8	104.52 $\pm$ 6.44	89.95 $\pm$ 0.95	113.12 $\pm$ 7.16	114.93 $\pm$ 10.14
9	91.33 $\pm$ 6.57	117.60 $\pm$ 2.40	95.18 $\pm$ 12.80	110.08 $\pm$ 4.07
10	95.97 $\pm$ 5.39	97.63 $\pm$ 12.86	104.36 $\pm$ 4.85	117.15 $\pm$ 8.07
11	102.62 $\pm$ 5.71	104.60 $\pm$ 10.00	106.82 $\pm$ 11.73	97.78 $\pm$ 15.22

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da amplitude do deslocamento lateral da cabeça - ALH (μm) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	3.34 $\pm$ 0.19	3.47 $\pm$ 0.35	3.92 $\pm$ 0.19	3.85 $\pm$ 0.13
-1	3.73 $\pm$ 0.17	3.03 $\pm$ 0.20	3.92 $\pm$ 0.21	3.78 $\pm$ 0.19
0	3.73 $\pm$ 0.20	3.40 $\pm$ 0.17	4.10 $\pm$ 0.28	4.30 $\pm$ 0.31
1	3.90 $\pm$ 0.27	3.83 $\pm$ 0.32	3.86 $\pm$ 0.22	3.77 $\pm$ 0.03
2	4.00 $\pm$ 0.24	3.30 $\pm$ 0.30	4.05 $\pm$ 0.31	3.43 $\pm$ 0.11
3	3.87 $\pm$ 0.18	3.05 $\pm$ 0.05	3.62 $\pm$ 0.19	3.50 $\pm$ 0.27
4 ^M	3.92 $\pm$ 0.23	3.57 $\pm$ 0.18	3.68 $\pm$ 0.15	3.53 $\pm$ 0.12
5	3.76 $\pm$ 0.28	3.63 $\pm$ 0.22	3.82 $\pm$ 0.24	3.38 $\pm$ 0.25
6	3.82 $\pm$ 0.19	3.50 $\pm$ 0.31	3.62 $\pm$ 0.24	3.80 $\pm$ 0.34
7	3.68 $\pm$ 0.19	3.30 $\pm$ 0.31	3.66 $\pm$ 0.11	3.30 $\pm$ 0.36
8	3.98 $\pm$ 0.10	3.50 $\pm$ 0.10	3.88 $\pm$ 0.16	4.00 $\pm$ 0.26
9	3.52 $\pm$ 0.14	4.10 $\pm$ 0.40	3.82 $\pm$ 0.26	3.60 $\pm$ 0.15
10	3.47 $\pm$ 0.12	3.47 $\pm$ 0.20	3.56 $\pm$ 0.23	4.17 $\pm$ 0.12
11	4.03 $\pm$ 0.31	3.45 $\pm$ 0.05	3.74 $\pm$ 0.38	3.13 $\pm$ 0.33

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da frequência de batimentos - BCF (Hz) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	39.63 $\pm$ 1.96	39.27 $\pm$ 1.31	37.14 $\pm$ 2.38	38.40 $\pm$ 2.40
-1	34.70 $\pm$ 1.39	41.67 $\pm$ 2.99	34.64 $\pm$ 2.00	38.90 $\pm$ 1.35
0	34.92 $\pm$ 1.95	39.63 $\pm$ 1.62	35.10 $\pm$ 1.12	34.83 $\pm$ 0.76
1	39.18 $\pm$ 1.91	37.97 $\pm$ 1.79	37.54 $\pm$ 1.65	38.63 $\pm$ 2.36
2	35.00 $\pm$ 1.19	37.05 $\pm$ 1.05	33.63 $\pm$ 2.11	37.40 $\pm$ 0.89
3	36.77 $\pm$ 1.26	37.10 $\pm$ 2.20	37.28 $\pm$ 0.65	36.50 $\pm$ 1.03
4 ^M	38.64 $\pm$ 2.18	36.27 $\pm$ 0.94	37.26 $\pm$ 1.04	35.30 $\pm$ 3.93
5	38.82 $\pm$ 1.80	37.20 $\pm$ 1.42	36.40 $\pm$ 1.09	40.58 $\pm$ 2.22
6	41.02 $\pm$ 1.33	37.70 $\pm$ 1.01	39.10 $\pm$ 0.86	37.43 $\pm$ 1.17
7	38.13 $\pm$ 1.71	40.93 $\pm$ 1.43	37.75 $\pm$ 0.78	40.10 $\pm$ 1.41
8	36.27 $\pm$ 1.64	37.65 $\pm$ 0.75	36.00 $\pm$ 0.74	34.47 $\pm$ 2.31
9	38.20 $\pm$ 0.97	35.50 $\pm$ 1.90	34.36 $\pm$ 1.90	37.95 $\pm$ 1.47
10	38.03 $\pm$ 1.17	37.53 $\pm$ 2.48	37.08 $\pm$ 0.78	33.13 $\pm$ 1.01
11	34.37 $\pm$ 2.60	41.15 $\pm$ 1.15	38.28 $\pm$ 2.56	39.28 $\pm$ 1.65

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da retilinearidade - STR (%) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	89.83 $\pm$ 1.35	82.33 $\pm$ 6.77	86.60 $\pm$ 1.29	89.75 $\pm$ 1.25
-1	86.50 $\pm$ 1.12	90.67 $\pm$ 1.20	86.80 $\pm$ 0.80	87.75 $\pm$ 1.18
0	86.33 $\pm$ 1.20	88.67 $\pm$ 0.33	83.80 $\pm$ 0.49	85.00 $\pm$ 1.08
1	87.83 $\pm$ 1.08	85.67 $\pm$ 0.88	86.40 $\pm$ 1.63	87.67 $\pm$ 0.88
2	85.17 $\pm$ 1.28	88.50 $\pm$ 0.50	84.50 $\pm$ 1.26	87.50 $\pm$ 0.87
3	87.67 $\pm$ 2.38	88.50 $\pm$ 0.50	86.80 $\pm$ 0.66	85.50 $\pm$ 1.89
4 ^M	86.80 $\pm$ 1.36	87.67 $\pm$ 0.67	87.00 $\pm$ 0.55	85.00 $\pm$ 3.06
5	87.80 $\pm$ 2.11	87.67 $\pm$ 1.20	85.60 $\pm$ 0.81	90.25 $\pm$ 2.32
6	86.83 $\pm$ 2.36	87.33 $\pm$ 1.20	88.00 $\pm$ 1.05	86.75 $\pm$ 2.50
7	87.50 $\pm$ 1.63	89.00 $\pm$ 1.53	85.80 $\pm$ 1.16	88.75 $\pm$ 1.80
8	84.67 $\pm$ 1.67	88.00 $\pm$ 0.00	85.80 $\pm$ 0.66	85.67 $\pm$ 2.03
9	88.00 $\pm$ 0.93	85.00 $\pm$ 1.00	84.60 $\pm$ 1.72	89.25 $\pm$ 0.63
10	84.17 $\pm$ 4.64	88.00 $\pm$ 0.00	88.00 $\pm$ 1.05	86.75 $\pm$ 1.75
11	84.83 $\pm$ 2.48	89.00 $\pm$ 1.00	77.52 $\pm$ 11.09	90.25 $\pm$ 1.49

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da linearidade - LIN (%) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	64.50 $\pm$ 1.88	64.67 $\pm$ 4.67	58.00 $\pm$ 0.84	64.25 $\pm$ 1.55
-1	60.33 $\pm$ 2.33	66.33 $\pm$ 1.20	56.80 $\pm$ 1.50	60.00 $\pm$ 2.48
0	59.50 $\pm$ 2.20	62.33 $\pm$ 2.33	55.20 $\pm$ 1.53	55.75 $\pm$ 1.84
1	59.17 $\pm$ 2.33	57.00 $\pm$ 1.53	57.40 $\pm$ 2.29	58.00 $\pm$ 0.58
2	57.83 $\pm$ 2.21	61.00 $\pm$ 2.00	57.00 $\pm$ 1.83	61.00 $\pm$ 1.63
3	58.33 $\pm$ 1.84	63.50 $\pm$ 0.50	59.00 $\pm$ 2.43	56.00 $\pm$ 2.68
4 ^M	58.60 $\pm$ 1.75	58.00 $\pm$ 2.00	57.80 $\pm$ 1.32	58.33 $\pm$ 2.91
5	58.80 $\pm$ 3.72	58.67 $\pm$ 2.03	56.80 $\pm$ 2.20	63.75 $\pm$ 4.61
6	57.67 $\pm$ 2.54	62.33 $\pm$ 2.91	62.00 $\pm$ 3.11	58.75 $\pm$ 3.75
7	60.17 $\pm$ 2.66	63.67 $\pm$ 3.93	56.00 $\pm$ 2.24	61.25 $\pm$ 3.54
8	54.80 $\pm$ 1.93	60.00 $\pm$ 1.00	56.00 $\pm$ 1.10	59.00 $\pm$ 2.65
9	62.33 $\pm$ 1.63	55.00 $\pm$ 4.00	57.00 $\pm$ 2.98	64.00 $\pm$ 2.92
10	65.00 $\pm$ 1.77	63.67 $\pm$ 2.96	63.00 $\pm$ 2.79	62.50 $\pm$ 4.56
11	56.33 $\pm$ 4.31	61.00 $\pm$ 1.00	64.00 $\pm$ 6.14	65.75 $\pm$ 2.93

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

APÊNDICE D – TBARS ESPONTÂNEO DO SÊMEN

Médias $\pm$ E.P.M. de TBARS espontâneo do sêmen (ng de TBARS/mL) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina		p
	Controle	Insulado	Controle	Insulado	
-2	124.07 $\pm$ 17.26	104.54 $\pm$ 8.08	107.50 $\pm$ 10.31	111.57 $\pm$ 11.36	0.76
-1	107.87 $\pm$ 12.51	104.95 $\pm$ 8.63	123.91 $\pm$ 12.52	120.74 $\pm$ 20.01	0.72
1	117.86 $\pm$ 11.90	187.03 $\pm$ 36.51	198.52 $\pm$ 46.33	98.79 $\pm$ 6.05	0.10
2	104.29 $\pm$ 12.80	117.46 $\pm$ 20.93	96.38 $\pm$ 5.61	146.95 $\pm$ 21.04	0.17
3	95.31 $\pm$ 7.57	99.23 $\pm$ 9.47	105.71 $\pm$ 8.71	106.52 $\pm$ 11.58	0.75
4 ^M	145.83 $\pm$ 26.07	95.74 $\pm$ 10.28	91.27 $\pm$ 8.60	117.12 $\pm$ 23.40	0.30
5	119.15 $\pm$ 21.93	115.00 $\pm$ 8.49	171.59 $\pm$ 31.32	113.44 $\pm$ 13.91	0.30
6	109.71 $\pm$ 14.50	102.17 $\pm$ 5.77	101.20 $\pm$ 4.52	143.93 $\pm$ 42.43	0.39
7	129.29 $\pm$ 20.09	138.93 $\pm$ 27.29	113.07 $\pm$ 4.00	120.94 $\pm$ 20.54	0.87
8	102.34 $\pm$ 17.28	122.26 $\pm$ 28.27	118.54 $\pm$ 11.02	95.61 $\pm$ 9.67	0.69
9	94.45 $\pm$ 7.48 ^b	127.57 $\pm$ 18.09 ^a	95.88 $\pm$ 7.82 ^b	91.27 $\pm$ 5.07 ^b	0.0729
10	157.07 $\pm$ 34.29	130.18 $\pm$ 54.30	167.69 $\pm$ 72.97	86.01 $\pm$ 18.60	0.66
11	112.56 $\pm$ 16.85	112.54 $\pm$ 16.46	131.92 $\pm$ 26.23	117.16 $\pm$ 31.71	0.89

^{a,b}: Linhas com letras sobrescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

APÊNDICE E – TBARS INDUZIDO DO SÊMEN

Médias $\pm$ E.P.M. de TBARS induzido do sêmen (ng de TBARS/ 10^8 de espermatozoides) dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina		p
	Controle	Insulado	Controle	Insulado	
-2	4.10 $\pm$ 1.14	2.35 $\pm$ 0.24	3.30 $\pm$ 1.04	3.75 $\pm$ 1.10	0.82
-1	7.86 $\pm$ 3.80	4.02 $\pm$ 0.81	8.25 $\pm$ 3.86	3.62 $\pm$ 1.42	0.72
1	5.83 $\pm$ 1.52	3.29 $\pm$ 0.79	7.23 $\pm$ 2.30	5.23 $\pm$ 2.48	0.62
2	3.21 $\pm$ 0.50 ^b	6.13 $\pm$ 1.39 ^{a,b}	5.58 $\pm$ 1.64 ^{a,b}	8.39 $\pm$ 1.09 ^a	0.04
3	5.53 $\pm$ 2.53	8.22 $\pm$ 4.98	4.75 $\pm$ 0.80	16.41 $\pm$ 4.57	0.08
4 ^M	4.65 $\pm$ 0.89	15.08 $\pm$ 5.26	9.31 $\pm$ 2.85	6.41 $\pm$ 0.95	0.20
5	5.94 $\pm$ 1.27	5.28 $\pm$ 2.74	5.24 $\pm$ 1.08	7.21 $\pm$ 1.25	0.87
6	12.36 $\pm$ 3.94	8.87 $\pm$ 2.61	9.07 $\pm$ 2.56	19.37 $\pm$ 8.96	0.45
7	11.35 $\pm$ 5.79	17.14 $\pm$ 7.09	3.47 $\pm$ 0.93	21.39 $\pm$ 17.65	0.43
8	4.29 $\pm$ 0.64	1.41 $\pm$ 0.30	5.78 $\pm$ 2.09	8.99 $\pm$ 4.98	0.33
9	4.72 $\pm$ 1.55 ^b	22.60 $\pm$ 6.22 ^a	5.46 $\pm$ 1.21 ^b	8.20 $\pm$ 2.36 ^b	0.0016
10	4.17 $\pm$ 0.24	4.64 $\pm$ 1.16	4.59 $\pm$ 0.97	5.72 $\pm$ 1.87	0.72
11	4.6642 $\pm$ 0.53	5.74 $\pm$ 2.45	3.52 $\pm$ 0.49	7.48 $\pm$ 4.32	0.53

^{a,b}: Linhas com letras sobrescritas minúsculas representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

APÊNDICE F – BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL

Médias $\pm$ E.P.M. do pH do plasma seminal dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	6.77 $\pm$ 0.12	6.70 $\pm$ 0.17	6.51 $\pm$ 0.20	6.71 $\pm$ 0.14
-1	6.77 $\pm$ 0.12	6.65 $\pm$ 0.17	6.91 $\pm$ 0.25	6.72 $\pm$ 0.13
0	6.91 $\pm$ 0.16	6.80 $\pm$ 0.14	7.00 $\pm$ 0.21	6.91 $\pm$ 0.15
1	6.88 $\pm$ 0.13	6.80 $\pm$ 0.06	6.76 $\pm$ 0.21	6.98 $\pm$ 0.07
2	6.85 $\pm$ 0.14	7.08 $\pm$ 0.14	6.99 $\pm$ 0.20	7.10 $\pm$ 0.08
3	6.88 $\pm$ 0.09	7.09 $\pm$ 0.09	6.77 $\pm$ 0.11	7.25 $\pm$ 0.14
4 ^M	7.05 $\pm$ 0.15	7.19 $\pm$ 0.07	7.08 $\pm$ 0.16	7.15 $\pm$ 0.06
5	7.13 $\pm$ 0.17	7.13 $\pm$ 0.05	7.06 $\pm$ 0.16	7.11 $\pm$ 0.13
6	6.95 $\pm$ 0.12	6.96 $\pm$ 0.16	7.02 $\pm$ 0.16	7.08 $\pm$ 0.14
7	6.83 $\pm$ 0.15	6.87 $\pm$ 0.08	6.90 $\pm$ 0.17	7.10 $\pm$ 0.11
8	6.94 $\pm$ 0.09	7.00 $\pm$ 0.23	6.85 $\pm$ 0.19	6.99 $\pm$ 0.18
9	6.69 $\pm$ 0.05	6.56 $\pm$ 0.07	7.02 $\pm$ 0.13	6.81 $\pm$ 0.12
10	6.85 $\pm$ 0.11	6.92 $\pm$ 0.18	6.84 $\pm$ 0.17	7.21 $\pm$ 0.10
11	6.92 $\pm$ 0.16	7.06 $\pm$ 0.13	6.90 $\pm$ 0.22	6.99 $\pm$ 0.20

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da albumina do plasma seminal dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	0.63 $\pm$ 0.12	0.62 $\pm$ 0.13	0.54 $\pm$ 0.13	0.48 $\pm$ 0.16
-1	0.61 $\pm$ 0.13	0.88 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.19	0.43 $\pm$ 0.09
0	0.68 $\pm$ 0.19	0.94 $\pm$ 0.20	0.55 $\pm$ 0.19	0.77 $\pm$ 0.18
1	0.72 $\pm$ 0.17	0.30 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.18	0.54 $\pm$ 0.18
2	0.28 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.07	0.36 $\pm$ 0.11
3	0.36 $\pm$ 0.09	0.31 $\pm$ 0.13	0.31 $\pm$ 0.07	0.20 $\pm$ 0.03
4 ^M	0.25 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.07	0.19 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.06
5	0.28 $\pm$ 0.10	0.40 $\pm$ 0.10	0.27 $\pm$ 0.11	0.24 $\pm$ 0.04
6	0.25 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.07	0.30 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.05
7	0.31 $\pm$ 0.10	0.30 $\pm$ 0.08	0.39 $\pm$ 0.13	0.32 $\pm$ 0.05
8	0.44 $\pm$ 0.10	0.34 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.11	0.29 $\pm$ 0.09
9	0.49 $\pm$ 0.12	0.46 $\pm$ 0.19	0.32 $\pm$ 0.08	0.43 $\pm$ 0.24
10	0.58 $\pm$ 0.12	0.45 $\pm$ 0.14	0.41 $\pm$ 0.15	0.20 $\pm$ 0.02
11	0.45 $\pm$ 0.11	0.28 $\pm$ 0.11	0.29 $\pm$ 0.07	0.30 $\pm$ 0.07

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da gama-glutamil transferase (GGT) do plasma seminal dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	1845.17 $\pm$ 552.26	2162.00 $\pm$ 483.50	1838.00 $\pm$ 620.93	3628.00 $\pm$ 1328.60
-1	1853.50 $\pm$ 409.59	2183.75 $\pm$ 588.53	2059.80 $\pm$ 697.37	3430.50 $\pm$ 1031.33
0	389.67 $\pm$ 150.82	330.40 $\pm$ 119.65	394.00 $\pm$ 101.58	637.33 $\pm$ 150.31
1	1614.17 $\pm$ 369.61	2345.00 $\pm$ 630.12	1627.00 $\pm$ 429.79	1665.00 $\pm$ 490.26
2	2268.33 $\pm$ 728.79	1395.00 $\pm$ 477.80	1742.00 $\pm$ 548.75	1651.67 $\pm$ 398.60
3	2095.83 $\pm$ 613.67	1872.50 $\pm$ 634.08	1658.00 $\pm$ 431.42	823.33 $\pm$ 207.28
4 ^M	1323.00 $\pm$ 490.01	2187.00 $\pm$ 814.64	1954.00 $\pm$ 1037.87	2735.00 $\pm$ 911.27
5	1312.50 $\pm$ 420.46	1836.00 $\pm$ 632.36	1853.00 $\pm$ 426.44	2371.67 $\pm$ 796.46
6	1535.83 $\pm$ 618.68	1165.00 $\pm$ 182.41	1368.00 $\pm$ 371.45	2127.50 $\pm$ 344.59
7	2310.00 $\pm$ 823.84	2518.00 $\pm$ 440.58	1888.75 $\pm$ 590.40	2016.00 $\pm$ 816.63
8	1932.00 $\pm$ 363.02	1348.75 $\pm$ 576.77	2049.00 $\pm$ 531.68	488.75 $\pm$ 201.37
9	1870.00 $\pm$ 555.40	1302.00 $\pm$ 616.10	1542.00 $\pm$ 486.84	2221.67 $\pm$ 745.03
10	1577.50 $\pm$ 240.06	1700.00 $\pm$ 782.96	1895.00 $\pm$ 566.53	1481.33 $\pm$ 578.87
11	1730.00 $\pm$ 721.60	1633.00 $\pm$ 577.76	1857.00 $\pm$ 754.23	2366.67 $\pm$ 628.92

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da aspartato aminotransferase (AST) do plasma seminal dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	237.50 $\pm$ 63.62	228.60 $\pm$ 31.06	204.80 $\pm$ 44.06	285.00 $\pm$ 41.68
-1	276.83 $\pm$ 72.96	189.75 $\pm$ 18.25	235.40 $\pm$ 56.55	248.83 $\pm$ 41.19
0	266.83 $\pm$ 91.61	154.40 $\pm$ 20.51	161.80 $\pm$ 65.81	337.00 $\pm$ 88.31
1	285.17 $\pm$ 81.19	225.80 $\pm$ 38.40	158.00 $\pm$ 38.50	246.50 $\pm$ 85.24
2	177.67 $\pm$ 52.66	195.60 $\pm$ 49.44	154.00 $\pm$ 47.76	249.33 $\pm$ 36.47
3	155.83 $\pm$ 20.65	277.75 $\pm$ 127.44	156.00 $\pm$ 39.50	190.50 $\pm$ 58.56
4 ^M	189.67 $\pm$ 38.93	161.00 $\pm$ 57.82	136.40 $\pm$ 40.44	208.00 $\pm$ 32.40
5	146.67 $\pm$ 53.69	169.40 $\pm$ 42.82	83.80 $\pm$ 26.61	164.17 $\pm$ 52.41
6	249.50 $\pm$ 146.47	172.40 $\pm$ 38.84	213.80 $\pm$ 92.75	193.83 $\pm$ 43.84
7	264.67 $\pm$ 91.13	191.00 $\pm$ 25.17	249.20 $\pm$ 61.88	248.83 $\pm$ 81.62
8	201.00 $\pm$ 46.54	276.00 $\pm$ 116.43	225.20 $\pm$ 75.89	172.80 $\pm$ 70.70
9	254.83 $\pm$ 74.80	271.20 $\pm$ 68.54	131.20 $\pm$ 47.32	298.33 $\pm$ 98.89
10	279.17 $\pm$ 58.47	247.60 $\pm$ 74.23	184.00 $\pm$ 89.39	186.50 $\pm$ 67.15
11	186.33 $\pm$ 49.51	140.00 $\pm$ 74.63	256.80 $\pm$ 91.66	245.67 $\pm$ 79.29

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da alanina aminotransferase (ALT) do plasma seminal dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	6.72 $\pm$ 2.21	11.33 $\pm$ 3.48	4.80 $\pm$ 3.04	9.11 $\pm$ 4.13
-1	7.22 $\pm$ 2.98	6.34 $\pm$ 1.60	9.07 $\pm$ 4.33	12.67 $\pm$ 4.57
0	12.55 $\pm$ 4.53	5.33 $\pm$ 1.91	6.00 $\pm$ 3.05	6.27 $\pm$ 2.99
1	4.66 $\pm$ 2.11	3.33 $\pm$ 1.28	6.00 $\pm$ 1.95	2.33 $\pm$ 2.33
2	3.33 $\pm$ 1.59	7.60 $\pm$ 2.69	4.33 $\pm$ 1.34	11.22 $\pm$ 2.59
3	3.39 $\pm$ 1.59	2.22 $\pm$ 0.45	5.07 $\pm$ 1.94	9.22 $\pm$ 2.91
4 ^M	5.00 $\pm$ 1.51	6.00 $\pm$ 3.15	3.20 $\pm$ 1.39	13.20 $\pm$ 4.89
5	1.87 $\pm$ 1.39	4.27 $\pm$ 1.47	1.47 $\pm$ 0.90	5.67 $\pm$ 2.22
6	5.44 $\pm$ 2.15	2.80 $\pm$ 1.47	4.53 $\pm$ 1.42	6.00 $\pm$ 2.04
7	6.67 $\pm$ 2.72	4.53 $\pm$ 1.62	7.73 $\pm$ 3.58	9.67 $\pm$ 2.38
8	6.40 $\pm$ 2.67	9.67 $\pm$ 2.52	10.53 $\pm$ 5.45	12.27 $\pm$ 4.49
9	5.06 $\pm$ 1.88	2.17 $\pm$ 0.88	2.53 $\pm$ 1.44	1.83 $\pm$ 0.69
10	7.11 $\pm$ 1.57	7.20 $\pm$ 2.32	4.93 $\pm$ 3.17	6.89 $\pm$ 3.28
11	6.00 $\pm$ 3.13	4.13 $\pm$ 2.89	6.00 $\pm$ 3.37	11.89 $\pm$ 4.45

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da proteína total do plasma seminal dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	2.98 $\pm$ 0.65	3.01 $\pm$ 0.61	2.40 $\pm$ 0.59	1.80 $\pm$ 0.48
-1	3.06 $\pm$ 0.76	3.01 $\pm$ 0.57	1.85 $\pm$ 0.55	2.03 $\pm$ 0.56
0	1.54 $\pm$ 0.46	2.27 $\pm$ 0.59	1.71 $\pm$ 0.76	1.32 $\pm$ 0.28
1	1.91 $\pm$ 0.34	1.60 $\pm$ 0.50	1.57 $\pm$ 0.48	1.24 $\pm$ 0.47
2	1.16 $\pm$ 0.25	1.09 $\pm$ 0.44	0.79 $\pm$ 0.31	1.17 $\pm$ 0.25
3	1.73 $\pm$ 0.40	1.47 $\pm$ 0.66	1.37 $\pm$ 0.29	0.80 $\pm$ 0.13
4 ^M	1.28 $\pm$ 0.34	1.32 $\pm$ 0.36	0.78 $\pm$ 0.19	1.47 $\pm$ 0.28
5	0.63 $\pm$ 0.17	1.79 $\pm$ 0.55	1.00 $\pm$ 0.52	1.03 $\pm$ 0.24
6	1.08 $\pm$ 0.41	1.47 $\pm$ 0.38	1.10 $\pm$ 0.35	1.08 $\pm$ 0.26
7	1.69 $\pm$ 0.62	1.34 $\pm$ 0.36	1.51 $\pm$ 0.56	1.37 $\pm$ 0.34
8	1.47 $\pm$ 0.33	1.10 $\pm$ 0.46	0.92 $\pm$ 0.44	0.96 $\pm$ 0.43
9	1.26 $\pm$ 0.38	1.38 $\pm$ 0.41	1.19 $\pm$ 0.33	1.08 $\pm$ 0.20
10	2.32 $\pm$ 0.55	1.85 $\pm$ 0.67	1.57 $\pm$ 0.68	0.85 $\pm$ 0.13
11	1.72 $\pm$ 0.44	1.16 $\pm$ 0.50	1.03 $\pm$ 0.31	1.34 $\pm$ 0.36

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da fosfatase alcalina do plasma seminal dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	3016.17 $\pm$ 604.09	2535.60 $\pm$ 884.20	2912.00 $\pm$ 1053.70	4640.17 $\pm$ 1045.74
-1	2824.83 $\pm$ 534.90	2532.50 $\pm$ 1204.08	3113.40 $\pm$ 919.28	3431.00 $\pm$ 694.33
0	2229.17 $\pm$ 500.34	1653.00 $\pm$ 984.95	1937.50 $\pm$ 616.51	3385.00 $\pm$ 899.75
1	2657.50 $\pm$ 719.62	1822.00 $\pm$ 660.78	2520.00 $\pm$ 695.32	1866.67 $\pm$ 533.12
2	2400.83 $\pm$ 663.79	1250.00 $\pm$ 477.35	1946.00 $\pm$ 763.70	1882.50 $\pm$ 793.55
3	2633.33 $\pm$ 533.84	1551.25 $\pm$ 789.87	2247.00 $\pm$ 847.64	1155.83 $\pm$ 460.12
4 ^M	2475.00 $\pm$ 869.08	1470.00 $\pm$ 578.95	935.00 $\pm$ 433.08	1538.00 $\pm$ 238.52
5	1519.17 $\pm$ 555.39	1139.00 $\pm$ 341.00	1760.00 $\pm$ 694.06	999.00 $\pm$ 254.91
6	2110.83 $\pm$ 780.04	966.25 $\pm$ 424.76	1775.00 $\pm$ 647.85	2500.83 $\pm$ 807.39
7	2681.67 $\pm$ 799.38	1241.00 $\pm$ 354.11	3764.00 $\pm$ 1594.30	2116.67 $\pm$ 785.02
8	2711.00 $\pm$ 397.53	1570.00 $\pm$ 789.72	2854.00 $\pm$ 1199.22	870.00 $\pm$ 261.49
9	2375.00 $\pm$ 524.56	2724.00 $\pm$ 774.37	2458.00 $\pm$ 769.52	2865.00 $\pm$ 777.32
10	2751.67 $\pm$ 443.05	907.50 $\pm$ 413.40	2003.75 $\pm$ 1047.20	1779.17 $\pm$ 380.24
11	2603.33 $\pm$ 957.51	1918.00 $\pm$ 845.74	2709.00 $\pm$ 1078.62	1502.00 $\pm$ 587.04

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

APÊNDICE G – BIOQUÍMICA SÉRICA

Médias $\pm$ E.P.M. da albumina sérica dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	2.95 $\pm$ 0.27	3.20 $\pm$ 0.19	2.88 $\pm$ 0.32	2.52 $\pm$ 0.26
-1	3.15 $\pm$ 0.07	3.00 $\pm$ 0.21	3.06 $\pm$ 0.16	3.08 $\pm$ 0.03
0	3.02 $\pm$ 0.13	3.00 $\pm$ 0.07	2.94 $\pm$ 0.07	2.92 $\pm$ 0.05
1	2.86 $\pm$ 0.05	3.00 $\pm$ 0.11	2.94 $\pm$ 0.04	2.87 $\pm$ 0.06
2	3.13 $\pm$ 0.09	3.10 $\pm$ 0.07	3.08 $\pm$ 0.05	3.03 $\pm$ 0.04
3	3.13 $\pm$ 0.10	2.82 $\pm$ 0.15	3.08 $\pm$ 0.05	2.85 $\pm$ 0.08
4 ^M	3.10 $\pm$ 0.09	3.04 $\pm$ 0.08	3.10 $\pm$ 0.05	2.97 $\pm$ 0.02
5	3.10 $\pm$ 0.08	2.84 $\pm$ 0.08	2.98 $\pm$ 0.06	2.83 $\pm$ 0.03
6	2.75 $\pm$ 0.12	2.58 $\pm$ 0.05	1.90 $\pm$ 0.36	2.55 $\pm$ 0.09
7	2.80 $\pm$ 0.09	2.62 $\pm$ 0.10	2.68 $\pm$ 0.02	2.62 $\pm$ 0.06
8	2.85 $\pm$ 0.08	2.76 $\pm$ 0.07	2.76 $\pm$ 0.05	2.67 $\pm$ 0.02
9	2.85 $\pm$ 0.07	2.76 $\pm$ 0.05	2.68 $\pm$ 0.06	2.65 $\pm$ 0.03
10	2.85 $\pm$ 0.07	2.70 $\pm$ 0.07	2.68 $\pm$ 0.09	2.62 $\pm$ 0.02
11	1.70 $\pm$ 0.35	1.72 $\pm$ 0.33	1.40 $\pm$ 0.28	2.00 $\pm$ 0.29

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da gama-glutamyl transferase (GGT) sérica dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	21.17 $\pm$ 3.18	13.40 $\pm$ 5.15	16.80 $\pm$ 1.88	24.50 $\pm$ 3.72
-1	17.83 $\pm$ 2.75	10.20 $\pm$ 3.60	14.00 $\pm$ 3.33	19.50 $\pm$ 3.69
0	18.67 $\pm$ 3.27	13.40 $\pm$ 3.04	15.60 $\pm$ 3.75	18.33 $\pm$ 4.08
1	17.50 $\pm$ 2.39	14.40 $\pm$ 1.69	15.40 $\pm$ 3.84	16.00 $\pm$ 2.56
2	16.17 $\pm$ 4.07	7.00 $\pm$ 4.65	8.40 $\pm$ 3.97	17.00 $\pm$ 3.21
3	7.83 $\pm$ 3.21	9.60 $\pm$ 3.78	8.60 $\pm$ 4.50	9.17 $\pm$ 3.66
4 ^M	29.50 $\pm$ 1.36	22.20 $\pm$ 4.90	19.00 $\pm$ 5.00	22.50 $\pm$ 4.09
5	19.33 $\pm$ 3.02	24.60 $\pm$ 3.88	25.40 $\pm$ 3.34	22.17 $\pm$ 6.02
6	21.00 $\pm$ 3.74	25.00 $\pm$ 1.14	26.60 $\pm$ 2.96	26.17 $\pm$ 1.92
7	30.50 $\pm$ 1.61	29.20 $\pm$ 0.58	27.20 $\pm$ 2.13	30.50 $\pm$ 2.32
8	30.17 $\pm$ 3.03	31.80 $\pm$ 0.58	28.80 $\pm$ 0.66	33.33 $\pm$ 2.30
9	30.33 $\pm$ 1.41	27.40 $\pm$ 2.77	28.00 $\pm$ 1.10	33.17 $\pm$ 2.77
10	31.33 $\pm$ 2.60	28.20 $\pm$ 0.86	28.00 $\pm$ 1.52	30.00 $\pm$ 1.44
11	22.33 $\pm$ 2.80	21.80 $\pm$ 2.08	17.60 $\pm$ 3.78	29.67 $\pm$ 3.08

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da aspartato aminotransferase (AST) sérica dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	84.83 $\pm$ 5.85	78.20 $\pm$ 2.48	76.60 $\pm$ 3.85	82.00 $\pm$ 2.50
-1	76.17 $\pm$ 9.45	79.20 $\pm$ 7.71	87.00 $\pm$ 8.81	76.83 $\pm$ 3.42
0	67.50 $\pm$ 2.81	80.40 $\pm$ 3.72	79.40 $\pm$ 5.24	70.00 $\pm$ 6.37
1	72.67 $\pm$ 3.91	82.60 $\pm$ 6.34	82.80 $\pm$ 9.43	82.00 $\pm$ 6.12
2	67.00 $\pm$ 6.20	63.40 $\pm$ 7.46	69.40 $\pm$ 5.50	82.00 $\pm$ 6.88
3	61.17 $\pm$ 3.99	62.80 $\pm$ 9.21	63.80 $\pm$ 4.25	61.83 $\pm$ 4.76
4 ^M	59.50 $\pm$ 2.74	66.40 $\pm$ 6.24	61.20 $\pm$ 5.54	72.20 $\pm$ 5.00
5	64.00 $\pm$ 5.05	58.60 $\pm$ 6.88	60.20 $\pm$ 3.68	64.17 $\pm$ 5.72
6	41.50 $\pm$ 10.60	35.00 $\pm$ 7.62	33.40 $\pm$ 10.99	56.50 $\pm$ 3.32
7	54.67 $\pm$ 5.28	37.20 $\pm$ 14.42	34.20 $\pm$ 15.88	34.17 $\pm$ 8.21
8	67.67 $\pm$ 4.26	71.20 $\pm$ 5.89	71.60 $\pm$ 6.06	77.00 $\pm$ 5.40
9	60.17 $\pm$ 6.36	65.60 $\pm$ 7.28	60.80 $\pm$ 5.02	63.67 $\pm$ 8.19
10	67.67 $\pm$ 3.57	60.80 $\pm$ 9.17	73.80 $\pm$ 7.08	60.83 $\pm$ 6.63
11	61.50 $\pm$ 10.51	62.40 $\pm$ 9.26	56.20 $\pm$ 9.57	68.50 $\pm$ 1.84

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da creatinina quinase (CK) sérica dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	112.18 $\pm$ 14.31	91.19 $\pm$ 3.71	88.22 $\pm$ 9.42	95.54 $\pm$ 7.36
-1	103.17 $\pm$ 3.90	104.00 $\pm$ 12.81	145.93 $\pm$ 45.93	136.93 $\pm$ 28.96
0	106.87 $\pm$ 13.87	114.46 $\pm$ 7.53	104.35 $\pm$ 9.91	156.67 $\pm$ 36.64
1	93.60 $\pm$ 7.67	109.81 $\pm$ 10.04	83.71 $\pm$ 3.20	144.02 $\pm$ 20.04
2	87.18 $\pm$ 6.74	96.06 $\pm$ 6.89	68.17 $\pm$ 6.07	116.56 $\pm$ 21.36
3	85.98 $\pm$ 5.53	77.13 $\pm$ 3.79	76.62 $\pm$ 9.87	107.61 $\pm$ 26.53
4 ^M	86.05 $\pm$ 4.94	88.34 $\pm$ 14.64	82.89 $\pm$ 6.81	128.07 $\pm$ 11.26
5	107.39 $\pm$ 21.76	97.84 $\pm$ 5.11	79.37 $\pm$ 5.62	108.64 $\pm$ 24.10
6	94.30 $\pm$ 12.15	91.47 $\pm$ 14.79	99.42 $\pm$ 26.99	115.29 $\pm$ 34.88
7	100.09 $\pm$ 6.34	97.04 $\pm$ 28.48	126.20 $\pm$ 27.77	159.19 $\pm$ 45.90
8	103.11 $\pm$ 6.81	86.16 $\pm$ 7.96	100.21 $\pm$ 17.01	98.67 $\pm$ 6.61
9	93.53 $\pm$ 7.46	86.32 $\pm$ 6.35	86.11 $\pm$ 5.37	100.46 $\pm$ 6.09
10	128.60 $\pm$ 21.97	109.25 $\pm$ 12.73	123.66 $\pm$ 44.24	135.00 $\pm$ 12.06
11	72.05 $\pm$ 15.80	69.55 $\pm$ 11.85	55.37 $\pm$ 8.49	81.19 $\pm$ 19.03

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da beta hidroxibutirato (BHB) sérica dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	3.68 $\pm$ 0.17	3.60 $\pm$ 0.40	4.26 $\pm$ 0.27	3.47 $\pm$ 0.26
-1	4.49 $\pm$ 0.29	4.17 $\pm$ 0.47	4.99 $\pm$ 0.25	4.09 $\pm$ 0.24
0	4.15 $\pm$ 0.23	4.58 $\pm$ 0.47	4.50 $\pm$ 0.60	3.59 $\pm$ 0.32
1	3.78 $\pm$ 0.54	3.46 $\pm$ 0.42	3.95 $\pm$ 0.32	3.59 $\pm$ 0.25
2	4.37 $\pm$ 0.46	3.85 $\pm$ 0.37	4.25 $\pm$ 0.47	3.89 $\pm$ 0.68
3	4.08 $\pm$ 0.31	3.72 $\pm$ 0.27	3.91 $\pm$ 0.47	3.32 $\pm$ 0.20
4 ^M	4.21 $\pm$ 0.27	3.43 $\pm$ 0.34	4.89 $\pm$ 0.77	3.61 $\pm$ 0.47
5	4.17 $\pm$ 0.50	3.50 $\pm$ 0.45	4.54 $\pm$ 0.49	3.48 $\pm$ 0.24
6	2.59 $\pm$ 0.31	1.78 $\pm$ 0.47	2.31 $\pm$ 0.51	2.68 $\pm$ 0.23
7	3.41 $\pm$ 0.44	2.27 $\pm$ 0.41	2.24 $\pm$ 0.78	2.32 $\pm$ 0.54
8	3.64 $\pm$ 0.39	3.87 $\pm$ 0.30	3.59 $\pm$ 0.40	3.75 $\pm$ 0.36
9	4.60 $\pm$ 0.53	3.26 $\pm$ 0.22	4.65 $\pm$ 0.65	4.36 $\pm$ 0.32
10	4.23 $\pm$ 0.32	3.50 $\pm$ 0.21	4.53 $\pm$ 0.54	3.64 $\pm$ 0.30
11	2.84 $\pm$ 0.46	1.93 $\pm$ 0.25	2.59 $\pm$ 0.28	3.38 $\pm$ 0.62

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. da ácidos graxos não-esterificados (NEFA) sérica dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	0.13 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.01
-1	0.18 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.02
0	0.14 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.01
1	0.11 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01
2	0.17 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.01
3	0.12 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01
4 ^M	0.43 $\pm$ 0.12	0.25 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.04
5	0.16 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.04
6	0.15 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.04
7	0.23 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.04
8	0.14 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01
9	0.17 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.02
10	0.13 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02
11	0.11 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.01

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. de proteínas totais sérica dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	6.15 $\pm$ 0.12	5.89 $\pm$ 0.13	5.80 $\pm$ 0.19	5.89 $\pm$ 0.23
-1	5.79 $\pm$ 0.25	5.16 $\pm$ 0.52	5.34 $\pm$ 0.38	5.75 $\pm$ 0.31
0	6.76 $\pm$ 0.10	6.71 $\pm$ 0.10	6.66 $\pm$ 0.35	7.10 $\pm$ 0.43
1	7.10 $\pm$ 0.22	6.74 $\pm$ 0.19	6.91 $\pm$ 0.30	6.86 $\pm$ 0.23
2	6.96 $\pm$ 0.26	6.57 $\pm$ 0.15	6.55 $\pm$ 0.38	7.13 $\pm$ 0.27
3	6.79 $\pm$ 0.20	5.89 $\pm$ 0.57	6.73 $\pm$ 0.25	6.35 $\pm$ 0.22
4 ^M	6.89 $\pm$ 0.35	6.69 $\pm$ 0.39	6.75 $\pm$ 0.29	7.10 $\pm$ 0.24
5	5.91 $\pm$ 0.27	5.61 $\pm$ 0.17	5.69 $\pm$ 0.21	6.15 $\pm$ 0.37
6	5.78 $\pm$ 0.26	5.66 $\pm$ 0.41	6.11 $\pm$ 0.37	5.91 $\pm$ 0.19
7	5.77 $\pm$ 0.07	5.60 $\pm$ 0.21	5.78 $\pm$ 0.46	5.79 $\pm$ 0.34
8	5.73 $\pm$ 0.14	6.27 $\pm$ 0.41	5.60 $\pm$ 0.12	5.97 $\pm$ 0.19
9	5.96 $\pm$ 0.26	5.61 $\pm$ 0.18	5.35 $\pm$ 0.11	5.93 $\pm$ 0.19
10	6.70 $\pm$ 0.23	6.95 $\pm$ 0.29	6.99 $\pm$ 0.14	6.51 $\pm$ 0.12
11	6.37 $\pm$ 0.30	5.37 $\pm$ 0.54	5.86 $\pm$ 0.19	7.05 $\pm$ 0.40

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

Médias $\pm$ E.P.M. de triglicerídeos séricos dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina no período pré-insulação (-2 e -1), na retirada da bolsa (0) e nas semanas pós-insulação (1 a 4) e nas semanas pós tratamento com melatonina (5 a 11).

Semana	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
-2	42.71 $\pm$ 2.49	46.03 $\pm$ 6.53	38.76 $\pm$ 3.33	38.14 $\pm$ 7.13
-1	33.59 $\pm$ 2.49	37.81 $\pm$ 2.42	31.60 $\pm$ 1.29	38.21 $\pm$ 3.07
0	36.38 $\pm$ 4.98	37.77 $\pm$ 2.96	32.42 $\pm$ 4.51	29.09 $\pm$ 5.26
1	32.16 $\pm$ 2.88	35.82 $\pm$ 3.12	27.06 $\pm$ 2.78	28.30 $\pm$ 3.44
2	36.57 $\pm$ 5.73	39.44 $\pm$ 3.94	35.31 $\pm$ 5.18	36.04 $\pm$ 3.80
3	29.08 $\pm$ 3.29	28.70 $\pm$ 3.66	29.27 $\pm$ 3.01	26.04 $\pm$ 4.00
4 ^M	26.56 $\pm$ 3.31	26.24 $\pm$ 4.24	24.27 $\pm$ 3.07	30.18 $\pm$ 4.44
5	30.73 $\pm$ 1.55	31.43 $\pm$ 5.25	24.64 $\pm$ 3.20	26.21 $\pm$ 1.91
6	20.00 $\pm$ 1.25	23.62 $\pm$ 4.95	19.02 $\pm$ 2.51	20.57 $\pm$ 3.01
7	27.90 $\pm$ 5.11	28.25 $\pm$ 5.82	24.74 $\pm$ 3.27	24.87 $\pm$ 3.04
8	26.14 $\pm$ 3.11	33.79 $\pm$ 3.63	22.73 $\pm$ 1.40	25.96 $\pm$ 3.42
9	30.50 $\pm$ 2.10	34.37 $\pm$ 3.29	26.33 $\pm$ 2.70	34.79 $\pm$ 2.96
10	29.21 $\pm$ 2.24	28.33 $\pm$ 4.65	29.42 $\pm$ 3.42	27.45 $\pm$ 2.31
11	18.00 $\pm$ 3.06	23.39 $\pm$ 6.13	15.56 $\pm$ 2.05	27.80 $\pm$ 5.16

^M: Dia em que foi aplicado o tratamento de melatonina exógena.

APÊNDICE H – BIOQUIMICA SEMINAL E SÉRICA PÓS-MELATONINA

Médias $\pm$ E.P.M. de pH, Albumina, gama-glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteínas totais e fosfatase alcalina do plasma seminal dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina.

Variável	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
pH	6.90 $\pm$ 0.05	6.95 $\pm$ 0.06	6.94 $\pm$ 0.06	7.04 $\pm$ 0.05
Albumina	0.40 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.04
GGT	1748.17 $\pm$ 206.78	1666.67 $\pm$ 214.65	1775.74 $\pm$ 189.83	1934.56 $\pm$ 243.12
AST	226.63 $\pm$ 29.75	207.71 $\pm$ 23.93	192.00 $\pm$ 27.09	216.78 $\pm$ 26.40
ALT	5.58 $\pm$ 0.84	4.91 $\pm$ 0.80	5.39 $\pm$ 1.18	7.93 $\pm$ 1.21
Proteínas totais	1.47 $\pm$ 0.18	1.45 $\pm$ 0.18	1.20 $\pm$ 0.17	1.10 $\pm$ 0.10
Fosfatase alcalina	2385.49 $\pm$ 245.18	1527.66 $\pm$ 234.87	2533.75 $\pm$ 392.43	1883.03 $\pm$ 248.36

Médias $\pm$ E.P.M. de pH, Albumina, gama-glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteínas totais e fosfatase alcalina séricos dos grupos quando comparados os animais controle com melatonina, insulado com melatonina, controle sem melatonina e insulado sem melatonina.

Variável	Melatonina		Sem Melatonina	
	Controle	Insulado	Controle	Insulado
GGT	26.43 $\pm$ 1.22	26.86 $\pm$ 0.88	25.94 $\pm$ 1.04	29.29 $\pm$ 1.24
AST	59.60 $\pm$ 2.80	55.83 $\pm$ 3.82	55.74 $\pm$ 4.07	60.69 $\pm$ 2.86
Creatina quinase	99.87 $\pm$ 5.67	91.23 $\pm$ 5.46	95.76 $\pm$ 8.99	114.06 $\pm$ 9.60
NEFA	0.16 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.01
Proteínas totais	6.04 $\pm$ 0.10	5.87 $\pm$ 0.15	5.91 $\pm$ 0.13	6.17 $\pm$ 0.11
Triglicerídeos	26.07 $\pm$ 1.25	29.03 $\pm$ 1.83	23.22 $\pm$ 1.22	26.83 $\pm$ 1.30

Anexo A – Preparação Kit ELISA melatonina

Preparação dos componentes para aferição de melatonina

Solução Buffer de lavagem (Tampão de lavagem) (Whashbuffer):

15 ml de solução buffer (apresentação 100 ml) + 150 ml de água bidestilada

Aquecer a 37°C e misturar energeticamente

Estabilidade 8 semanas

Padrão A-F (CAL A-F) (Curva de calibração):

Diluir o padrão em 2 ml de água bidestilada

Deixar repousar por 15 min

Misturar sem fazer espuma

Controle 1+2 (CONTROL 1+2):

Diluir o padrão em 2 ml de água bidestilada

Deixar repousar por 15 min

Misturar sem fazer espuma

Melatonina Biotina (BIOTIN):

Diluir o padrão em 2 ml de tampão de lavagem

Deixar repousar por 15 min

Misturar sem fazer espuma

Melatonina antissoro (ANTISERUM):

Diluir o padrão em 2 ml de água bidestilada

Deixar repousar por 15 min

Misturar sem fazer espuma

Conjunto enzimático (ENZCONJ);

Diluir 70µl do conjunto enzimático em 5,6ml de tampão de lavagem

Metanol:

Diluir 10 ml em 100 ml de água bidestilada

Extração de Amostras, Padrões e Controlos (Coluna de Extração)

OBS: Cada amostra, Padrão e Controlo tem que sofrer extração. A extração pode ser executada antecipadamente. Os extratos secos (após evaporação do metanol) podem ser armazenados a 2-8 °C ou ≤ -20 °C até 24 h.

Após eluição com metanol a Colunas de Extração podem ser logo usadas para extração das amostras seguintes ou armazenadas a 2-8 °C, protegidas do pó. As Colunas de Extração podem ser reutilizadas até 4 vezes. No caso de reutilização, começar novamente em A.1 (Acondicionamento da Coluna).

1. Colocar as Colunas de Extração em tubos de polistireno ou vidro (12 x 75 mm).
2. Adicionar 1 x 1 mL de metanol (não diluído) às colunas. Deixar o solvente passar através da coluna por centrifugação durante 1 min a 120 x g.
3. Adicionar 1 x 1 mL de água bidest. às colunas. Deixar o solvente passar através da coluna por centrifugação durante 1 min a 120 x g.
4. Prosseguir sem demora à aplicação da amostra de maneira a evitar que as colunas sequem.

Aplicação da Amostra

5. Colocar as Colunas de Extração em tubos de polistireno ou vidro marcados correspondentemente (12 x 75 mm).
6. Adicionar 0.5 mL de Padrões, Controlos e amostras às colunas.
7. Adicionar 0.5 mL de água bidestilada às colunas. Deixar passar através da coluna por centrifugação durante 5 min a 120 x g.

Lavagem

8. Adicionar 2 x 1 mL de metanol a 10 % em água bidest. (v/v) às colunas. Deixar o solvente passar através da coluna por centrifugação durante 5 min a 120 x g.

Eluição do Extrato

9. Colocar as Colunas de Extração em tubos limpos de polistireno ou vidro marcados correspondentemente (12 x 75 mm).

10. Adicionar 1 mL de metanol (não diluído) às colunas. Deixar o solvente passar através da coluna por centrifugação durante 5 min a 120 x g.

11. Remover as colunas dos tubos. Evitar deixar gotas nas colunas. Usar as colunas para extração das amostras seguintes ou armazenar a 2-8 °C, protegidas do pó. As Colunas de Extração podem ser reutilizadas até 4 vezes.

Evaporação e Reconstituição do Extrato

12. Evaporar o metanol até à secura por uso de uma centrífuga evaporadora.

13. Reconstituir as amostras com 0.15 mL de água bidest.

14. Agitar no vortex pelo menos 1 min e testar imediatamente.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. Pipetar 50 μ L de cada Padrão, Controlo extraído e amostra extraída para os respectivos poços da microplaca.
2. Pipetar 50 μ L de Melatonina-Biotina para cada poço.
3. Pipetar 50 μ L de Antisoro para Melatonina para cada poço. Agitar cuidadosamente a placa.
4. Tapar a placa com película adesiva. Agitar cuidadosamente a placa. Incubar 14-20 h a 2-8 °C.
5. Retire a folha. Rejeitar a solução d'incubação. Lavar a placa 3 x com 250 μ L de Tampão de lavagem diluído. Remova o excesso batendo com a placa numa toalha de papel.
6. Pipetar 150 μ L de Conjugado Enzimático acabado de preparar para cada poço.
7. Tapar a placa com nova película adesiva. Incubar 120 min à TA (18-25 °C) num agitador orbital (500 rpm).
8. Retire a folha. Rejeitar a solução d'incubação. Lavar a placa 3 x com 250 μ L de Tampão de lavagem diluído. Remova o excesso batendo com a placa numa toalha de papel.
9. Para a adição das Soluções de Substrato e de Paragem usar uma pipeta de 8 canais. A pipetagem deve ser executada nos mesmos intervalos de tempo para as Soluções de Substrato e de Paragem. Usar a técnica de “positive displacement” e evitar a formação de bolhas de ar.
10. Pipetar 200 μ L de Solução de Substrato PNPP para cada poço.
11. Incubar 40 min à TA (18-25 °C) num agitador orbital (500 rpm).
12. Parar a reacção de substrato adicionando 50 μ L de Solução Stop PNPP para cada poço. Misturar rapidamente os conteúdos agitando cuidadosamente a placa.
13. Medir a densidade óptica com um fotómetro a 405 nm (Comprimento de onda de referência: 600-650 nm) nos 60 min a seguir à pipetagem da Solução Stop.

Anexo B – *SETUP* – SISTEMA CASA PARA BOVINO

Característica	Ajuste
Número de imagens adquiridas.....	30
Taxa de aquisição de imagens.....	60 Hz
Contrate mínimo da célula.....	50
Tamanho mínimo da célula.....	6 pixels
Contraste para células imóveis.....	30
Retilinearidade (STR), Limiar.....	60%
Valor de corte de VAP para células lentas.....	30,0µm/s
VAP mínimo para células progressivas.....	40,0µm/s
Valore de corte de CSL para células lentas.....	20,0 µm/s
Tamanho da célula.....	6 pixels
Tamanho da cabeça estática.....	0,23 a 1,91
Intensidade da cabeça estática.....	0,56 a 1,20
Alongamento estático.....	8 a 92
Aumento.....	1,89
Frequência do vídeo.....	60
Intensidade de iluminação.....	2203
Temperatura.....	37°C