



INFERTILIDADE EQUINA: MÚLTIPLAS FRAGILIDADES OU UM “FADO” DO ESPERMATOZÓIDE

Sandra Cristina de Oliveira Pinto Gamboa

FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Coimbra, 2011

Sandra Cristina de Oliveira Pinto Gamboa

INFERTILIDADE EQUINA: MÚLTIPLAS FRAGILIDADES OU UM “FADO” DO ESPERMATOZÓIDE

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Biologia, na especialidade de Biologia Celular.
Coimbra, 2011

Trabalho desenvolvido sob orientação científica do Professor Doutor João Ramalho de Sousa Santos, do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

RESUMO

As raças autóctones portuguesas de equinos estão representadas pelos Puro Sangue Lusitano (PSL), Garrano e Sorraia, sendo o PSL a que assume maior expressão. O Sorraia corresponde a um tipo equino com elevados níveis de consanguinidade que se encontra classificado como mantido de forma crítica. Para PSL e Sorraia, falta definir o padrão espermático e a capacidade dos seus espermatozóides (SPZ) suportarem as tecnologias de conservação *ex situ*. Além disto, os equinos são uma espécie de reprodução sazonal de dias longos não se sabendo, à nossa latitude, como varia a qualidade espermática ao longo do ano. Em produção animal, a predição do potencial de fertilidade do macho é importante contudo, em equinos, os exames tradicionais de avaliação da qualidade do esperma falham em detetar casos de subfertilidade e/ou infertilidade. Assim, constituíram objectivos deste trabalho avaliar: parâmetros do esperma, a sua capacidade para refrigeração e a fertilidade, em PSL e Sorraia; variações na qualidade devidas à sazão; e a aplicabilidade de outros exames como complemento ao espermograma sumário em garanhões. Para os PSL, utilizaram-se duas estratégias: colheita única/múltiplos garanhões (n=152) e múltiplas colheitas (n=371)/ganhão (n=9). Estas últimas foram comparadas com 113 ejaculados obtidos de 4 Sorraias. A sazonalidade foi avaliada sobre 589 ejaculados obtidos nos diferentes meses do ano, de 12 garanhões com diferentes índices reprodutivos, e analisados de acordo com 4 períodos: Setembro-Dezembro, Janeiro-Março, Março-Maio e Maio-Julho. Espermas obtidos de garanhões férteis e in(sub)férteis (n=53) permitiram estudar a presença, nos SPZ, de proteínas relacionadas com a hipótese SNARE de fusão de membranas, a ubiquitinação (n=29) à superfície dos SPZ, a funcionalidade das mitocôndrias (JC-1, n=210), a qualidade do ADN nuclear (TUNEL, n=165), a estabilidade (M540, n=77), a funcionalidade (HOS, n=94) e a integridade (eosina-nigrosina, n=309 e IP/SYBR 14, n=207) da membrana celular e do acrossoma (PSA-FITC, n=239) e a oxidação (C₁₁BODIPY e TBARS, n=232) dos fosfolípidos de membrana. A oxidação lipídica foi também avaliada no plasma seminal (TBARS_{PS}) e relacionada com os parâmetros referidos assim como com a actividade antioxidante total não-enzimática (TEAC) no PS e nos SPZ e com a integridade do ADN, avaliada, neste caso, pelo teste de dispersão da cromatina (SCDT), em PSL e Sorraia. No PSL, a mobilidade, morfologia e pH após colheita diferiram significativamente ($P<0,05$) entre “colheita única/múltiplos garanhões” e “múltiplas colheitas/ganhão” sem que se tenham observado efeitos da idade sobre os parâmetros avaliados. Contrariamente ao cavalo do Sorraia, que apresenta valores marginais e baixos índices reprodutivos, no PSL, os parâmetros do esperma são similares aos descritos para a generalidade das outras raças equinas. Para as duas raças autóctones foi notório o efeito do ganhão ($P<0,05$), enquanto fator individual de variação, sobre os parâmetros do esperma. Para a nossa latitude, observou-se a influência da sazão na modulação dos parâmetros seminais ($P<0,05$) observando-se, entre Março-Maio, superior qualidade espermática e entre Setembro-Dezembro, os valores de qualidade seminal mais baixos. A análise imunocitoquímica revelou a presença das proteínas syntaxina, VAMP, sinaptotagmina,

Rab3a e NSF na região acrossômica dos SPZ assim como a presença de caveolina-1, proteína envolvida na organização de *lipid rafts*. Os ganhões in(sub)férteis apresentaram, nos seus ejaculados, uma percentagem de SPZ marcados para SNARES e caveolina-1 significativamente inferior ($P < 0,001$) ao observado nos animais de fertilidade comprovada. Um problema associado ao macho foi confirmado quando as éguas que tinham ficado vazias após inseminações com sêmen de um macho com espermograma normal, foram beneficiadas com sucesso por um macho de fertilidade comprovada. A marcação da NSF, syntaxina e caveolina-1 parece útil na predição do potencial de fertilidade do gação. A utilização de vários marcadores da qualidade dos SPZ evidenciou também diferenças significativas nos ejaculados de animais férteis e in(sub)férteis, confirmando-se a melhor qualidade seminal durante a estação de reprodução, apesar da diversidade de populações espermáticas presentes em cada ejaculado. No conjunto das observações, os parâmetros PMS, vitalidade, morfologia, AI e integridade/estabilidade do ADN são modulados pelos parâmetros funcionais avaliados, excepto o teste HOST, contudo este revelou medir propriedades diferentes das dos métodos de exclusão de corantes. Os TBARS parecem situar-se dentro de níveis fisiológicos excepto no PS da raça Sorraia, uma vez que se observou um elevado nível de peroxidação lipídica coexistente com uma elevada atividade antioxidante não enzimática assim como com uma elevada percentagem de células com danos no ADN, conforme revelado pelo teste SCD. Os resultados sugerem alguma disfunção nos SPZ (ou na espermatogénese) desta raça, para além da observável ao nível morfológico e sugerem que a produção de ATP, nos SPZ, assente sobre a via glicolítica. A introdução dos testes HOS e SCDT na rotina laboratorial parece-nos útil na medida em que não necessitam de equipamento sofisticado e podem ser aplicados em condições de campo. Além disto, a marcação dos acrossomas e da superfície celular com marcadores moleculares pode constituir uma ferramenta útil na avaliação de casos de infertilidade idiopática em ganhões. Os resultados realçam, ainda, a importância do conhecimento do padrão espermático não só da raça mas do indivíduo em si mesmo de forma a maximizarem-se os índices reprodutivos. A interpretação de espermogramas efectuados na contra-estação deverá ser feita à luz dos valores próprios dos parâmetros espermáticos nesta altura do ano.

ABSTRACT

Portuguese horse breeds are represented by Puro Sanguê Lusitano (PSL), Garrano and Sorraia. The PSL is the major national breed of horses and Sorraia horse is a closed and endangered breed. The seminal characteristics and the possibility of conserving their semen for future use are not well known. Furthermore, equines are long-day seasonal breeders and no data exist on seasonal variation in semen quality in horses for our latitude. In animal husbandry, prediction of fertility potential is important but, in stallions traditional semen evaluation fails to detect cases of sub-fertility or even infertility. The aim of this study was to evaluate: semen parameters, fertility and the aptness to sperm preservation in PSL and Sorraia stallions; seasonal variations in sperm quality; and the usefulness of other methods to assess sperm traits in order to complement the traditional spermiogram. For PSL, two strategies were used: a single collection by multiple stallions (n=152) and multiple collections (n=371) obtained from a limited number of stallions (n=9). These latter samples were compared with 113 ejaculates obtained from 4 Sorraia horses. The percentage of motile spermatozoa (PMS) was assessed after collection (AC), after semen dilution and after 24h of cool-storage. Seasonal variations in sperm quality were monitored in semen samples (n=589) collected from late September to July, from 12 stallions, and analyzed according to four seasonal periods: September-December, January-March, March-May, and May-July. Semen samples (n=53) obtained from stallions with varying fertility were also used to study the presence of proteins implicated in the "SNARE hypothesis" for membrane fusion as well as sperm ubiquitination (n=29), mitochondrial function (JC-1, n=210), nDNA (TUNEL, n=165) and acrosomal integrity (PSA-FITC, n=239) and plasmalemma stability (M540, n=77), integrity (eosin-nigrosin, n=309 and IP/SYBR14 stain, n=207) and functionality (HOS test, n=94). Lipid peroxidation was also analyzed using the TBARS assay, in both seminal plasma and SPZ fractions (n=232), and related with the other seminal parameters as well as with total non-enzymatic antioxidant activity (TEAC, n=89) and nDNA integrity evaluated, in this case, by the SCD test (n=30), in PSL and Sorraia stallions. In PSL, mean values obtained for PMS, morphology and semen pH observed after semen collection differ significantly ($P<0.05$) between single collection/multiple stallions and multiple collections/limited stallions, and no age related effects were detected. Semen quality in PSL is similar to that of related breeds, while Sorraia stallions had very poor semen quality. Additionally, significant differences ($P<0.05$) were observed between individual stallions and between ejaculates within stallions. Clear seasonal-based differences ($P<0.05$) were observed, with poor semen quality in winter and a noticeable improvement in sperm quality with increasing photoperiod. Better semen quality was observed between late March and May. Immunocytochemical analysis revealed that members of different SNARE families can be detected on the acrosome of equine sperm, notably in the acrosomal cap and equatorial segment. These proteins include the R-SNARE syntaxin, the Q-SNARE synaptobrevin/VAMP, the calcium sensor synaptotagmin, the GTPase Rab3a and the

ATPase NSF. Also present is caveolin-1, a component of lipid rafts. Stallions with fertility problems presented the worst quality of sperm and acrosomal membrane, and had less sperm cells stained positively for SNARES and caveolin-1, than sperm from fertile donors ($P < 0.001$). A male-related problem was confirmed when mares that had failed to impregnate with samples from a stallion with a normal spermogram were successfully inseminated with sperm from a fertile donor. Furthermore NSF, syntaxin and caveolin-1 staining seemed to be useful in predicting stallion fertility. The other methods used to analyze sperm quality showed significant differences in semen quality between fertile and in(sub)fertile stallions and confirmed better semen quality during the breeding season despite an heterogeneous sperm population characterize each ejaculate, as revealed by the probes used. PMS, viability, morphology, AI and DNA integrity/stability are modulated by the functional parameters evaluated except HOST. However, HOST showed to measure different properties in sperm when compared with stain exclusion methods. In fertile stallions, TBARS in both sperm fractions never seemed to result in compromised sperm DNA integrity, indicating that measurements were within physiological levels. In Sorraia stallions, despite an apparent efficient antioxidant activity in sperm, TBARS in seminal plasma were higher and coexist with DNA damage, as revealed by SCDT. Our results suggest some dysfunction in spermatozoa (or spermatogenesis) of this breed, beyond the observable at morphological level and suggest that the production of ATP, in these cells, rely on glycolysis. The introduction of HOST and SCDT in routine sperm evaluation seems to be important since these methods do not need sophisticate equipment and can be used in field conditions. Moreover, acrosomal and surface staining of equine sperm with molecular markers may constitute useful tools in predicting stallion fertility. Our results also highlight the importance of knowledge of the standard sperm characteristics not only of the breed in use but also of individual stallion, for adjustment of the breeding program in order to maximize reproductive rates. Semen analysis made in the non-breeding season should be interpreted according with values defined to this year period.

“Para ti, Carlota, que saibas um dia ler nestas folhas, a tradução de uma luta pela e para a vida! Minha filha, quando compreenderes estas palavras, lembra-te que muito do teu legado foi lavrado com sacrifício pelos teus. Respeita-o e respeita o teu semelhante. Essa será a minha recompensa.”

ESSE NEGÓCIO DE ENTENDER DE UMA COISA,
TEM QUE AMAR.
QUANDO VOCÊ AMA,
ISSO CRIA UMA CAPACIDADE.
VOCÊ SE INTERESSA PELA COISA,
VOCÊ COMEÇA A OLHAR.

TOM JOBIM

Na falta do sol queimando a pele, do cheiro da terra húmida, do capim roçando as pernas, da selva de pedra pulsando vida, me quedo por esta paragem buscando, não novas paisagens, mas uma forma de ver com novos olhos.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
AGRADECIMENTOS	xvii
CAPÍTULO 1	
1. ENQUADRAMENTO, OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA TESE	1
1.1. ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO	3
1.2. OBJECTIVOS	5
1.3. ORGANIZAÇÃO DA TESE	5
CAPÍTULO 2	
2. INTRODUÇÃO GERAL	7
2.1. A REPRODUÇÃO NA ESPÉCIE EQUINA	9
2.1.1. SAZONALIDADE REPRODUTIVA	9
2.1.2. O ESPERMA EQUINO	11
2.1.2.1. ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE EQUINO	12
2.1.2.2. A CONDENSAÇÃO DA CROMATINA	15
2.1.2.3. A MEMBRANA PLASMÁTICA	17
2.2. PRODUÇÃO ESPERMÁTICA	19
2.2.1. ESPERMATOGÉNESE E BIOGÉNESE DO ACROSSOMA	21
2.2.2. FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO ESPERMÁTICA	24
2.2.3. MATURAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES	26
2.2.4. O PLASMA SEMINAL: CONTRIBUIÇÃO DAS GLÂNDULAS ANEXAS AO APARELHO REPRODUTOR	32
2.3. O APARELHO COPULADOR E A EJACULAÇÃO	34
2.4. EFICIÊNCIA DA ESPERMATOGÉNESE	35
2.4.1. APOPTOSE	36
2.4.2. UBIQUITINAÇÃO DIFERENCIAL	42
2.5. FERTILIZAÇÃO	45
2.5.1. CAPACITAÇÃO	45
2.5.2. REAÇÃO ACROSSÓMICA E INTERAÇÃO COM O OOLEMA	49
2.6. PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ENERGIA	53
2.6.1. ATIVIDADE MITOCONDRIAL E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	55
2.6.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	58
CAPÍTULO 3	
3. OBTENÇÃO, EXAME, VALORIZAÇÃO, CONSERVAÇÃO E APLICAÇÃO DO ESPERMA	61
3.1. OBTENÇÃO	63
3.2. EXAME	65
3.2.1. ESPERMOGRAMA SUMÁRIO	66
i. CONCENTRAÇÃO	66
ii. MOBILIDADE	67
iii. VITALIDADE	68
iv. MORFOLOGIA	71
3.2.2. OUTROS EXAMES	75
i. TESTE HIPO-OSMÓTICO	75
ii. ESTADO DO ACROSSOMA	76

3.3. VALORIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO ESPERMA	78
3.4. APLICAÇÃO DO ESPERMA	80
3.5. ÍNDICES REPRODUTIVOS	82
CAPÍTULO 4	
4. CARATERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE GARANHÕES LUSITANOS E DE SORRAIAS	85
4.1. INTRODUÇÃO	87
4.1.1. AS RAÇAS LUSITANA E SORRAIA: UM POUCO DE HISTÓRIA	87
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	94
4.3. ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL	94
4.4. ANÁLISE DOS DADOS	96
4.5. RESULTADOS	97
4.6. DISCUSSÃO	109
CAPÍTULO 5	
5. SAZONALIDADE REPRODUTIVA: IMPLICAÇÕES NA QUALIDADE ESPERMÁTICA	119
5.1. INTRODUÇÃO	121
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	122
5.2.1. DESENHO EXPERIMENTAL	122
5.2.2. CONDIÇÕES CLIMÁTICAS	123
5.2.3. ANÁLISE DOS DADOS	124
5.3. RESULTADOS.	124
5.3.1. EFEITO DA ÉPOCA DO ANO NAS CARATERÍSTICAS ESPERMÁTICAS	124
5.3.2. CARATERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE GARANHÕES FÉRTEIS (GRUPO A) E SUB-FÉRTEIS (GRUPO B) AO LONGO DO ANO	130
5.4. DISCUSSÃO	139
CAPÍTULO 6	
6. MICRODOMÍNIOS LIPÍDICOS, PROTEÍNAS SNARE E UBIQUITINAÇÃO DIFERENCIAL EM ESPERMATOZÓIDES EQUINOS: POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA FERTILIDADE	143
6.1. INTRODUÇÃO	145
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	146
6.2.1. ANTICORPOS E FLUOROCROMOS	146
6.2.2. COLHEITAS, AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO DO ESPERMA	147
6.2.3. IMUNOCITOQUÍMICA	148
6.2.3.1. MICRODOMÍNIOS LIPÍDICOS (LIPID RAFTS) E CAVEOLINA-1	148
6.2.3.2. PROTEÍNAS SNARE	149
6.2.3.3. UBIQUITINAÇÃO DIFERENCIAL DOS ESPERMATOZÓIDES	149
6.2.4. ANÁLISE DOS DADOS	149
6.3. RESULTADOS	150
6.3.1. MICRODOMÍNIOS LIPÍDICOS (LIPID RAFTS) E CAVEOLINA 1	150
6.3.2. PROTEÍNAS SNARE	152
6.3.3. INTEGRIDADE DO ACROSSOMA	158
6.3.4. UBIQUITINAÇÃO DIFERENCIAL DOS ESPERMATOZÓIDES	159
6.3.5. RELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS	163
6.4. DISCUSSÃO	166

CAPÍTULO 7

7. INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE ESPERMÁTICA	173
7.1. INTRODUÇÃO	175
7.2. MATERIAL E MÉTODOS	177
7.2.1. AVALIAÇÃO DO TEOR EM AÇÚCARES REDUTORES (EM TERMOS DE D-GLICOSE) NO PLASMA SEMINAL	178
7.2.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS MITOCÔNDRIAS	178
7.2.2.1. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	178
7.2.3. STRESSE OXIDATIVO.	179
7.2.3.1. OXIDAÇÃO DE LÍPIDOS DE MEMBRANA E DO PLASMA SEMINAL	179
i. O MÉTODO DOS TBARS (ou do MDA)	179
ii. O MÉTODO DO BODIPY	180
7.2.3.2. ESTABILIDADE DOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA	181
7.2.3.3. DANOS NO ADN	181
i. ENSAIO DO TUNEL	181
ii. O TESTE DE DISPERSÃO DA CROMATINA (SCDT)	182
7.2.4. MARCAÇÃO TRIPLA IP/PSA-FITC/JC-1	183
7.2.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	184
7.2.6. ANÁLISE DOS DADOS	186
7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	187
7.3.1. ATIVIDADE MITOCONDRIAL	187
7.3.1.1. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	187
7.3.2. STRESSE OXIDATIVO	190
7.3.2.1. OXIDAÇÃO DE LÍPIDOS DE MEMBRANA E DO PLASMA SEMINAL	190
7.3.2.2. DANOS CELULARES	191
7.3.2.2.1. INTEGRIDADE E ESTABILIDADE DE MEMBRANA	191
i. INTEGRIDADE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO PLASMALEMA	191
ii. INTEGRIDADE DO ACROSSOMA	192
iii. ESTABILIDADE DOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA	193
7.3.2.2.1. INTEGRIDADE DO ADN	194
7.3.3. RELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS	196
7.3.3.1. INTEGRIDADE ESTRUTURAL vs. INTEGRIDADE FUNCIONAL	196
7.3.3.2. MODULAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS	198
7.3.3.3. MARCAÇÃO TRIPLA IP/PSA-FITC/JC-1	204
7.3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICA	206
7.4. CONCLUSÃO	211

CAPÍTULO 8

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	213
LISTA DE REFERÊNCIAS	220

LISTA DE ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACRÓNIMOS

ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	HOS	Hipo-osmótico
ABTS^{•+}	Radical catiónico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	IC	Intervalo de Confiança
ACERG	Associação de Criadores de Equinos de Raça Garrana	IgM	Imunoglobulina M
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	INE	Instituto Nacional de Estatística
AICS	Associação Internacional de Criadores do Cavalo Ibérico de Tipo Primitivo – Sorraia	INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
ANOVA	ANalysis Of VAriance	IP	Iodeto de Propídio
APSL	Associação Portuguesa de Criadores do Cavalo Puro Sangue Lusitano	IPVC	Instituto Politécnico de Viana do Castelo
ATP	Adenosina Trifosfato	JC-1	iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina
BODIPY®581/591C₁₁	4,4-difluor-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-boro-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ácido undecanóico	LC	Limites de Concordância
BrdUTP	5-bromo 2'-desoxiuridina 5' trifosfato	LSD	Least Significant Difference
BSA	Albumina do Soro Bovino	M540	Merocianina 540
BWP	Belgisch Warmbloedpaard	MAE	Membrana Acrossómica Externa
CBB	Comassie Brilliant Blue	MAI	Membrana Acrossómica Interna
CT-B	Cólera toxina, subunidade B	MANOVA	Multivariate ANalysis Of Variance
CV	Coefficiente de Variação	MANCOVA	Multivariate ANalysis Of COVariance
DMSO	Dimetilsulfóxido	MDA	Aldeído Malónico
DNS	ácido 3,5-Dinitrosalicílico	MMQ	Média dos Mínimos Quadrados
DTT	Di-tiotreitól	NSF	N-ethylmaleimide-Sensitive Factor
dUTP	2'-desoxiuridina 5' trifosfato	P	Probabilidade
EDTA	Ácido Etileno Diamina Tetra-Acético	PBS	Phosphate Buffer Solution
FAO	The Food and Agriculture Organization of the United Nations	PSA/FITC	Aglutinina de <i>Pisum Sativum</i> / Isotiocianato de Fluoresceína
FAR	Fundação Alter Real	PSL	Puro Sangue Lusitano
gl	graus de liberdade	PUFA	Poli-Unsaturode Fatty Acids
GLM	General Linear Model	QM	Quadrados Médios
HH	sais de Hank com Heppes	Rab3A	GTPase Ras-relacionada

ROS	Reactive Oxygen Species	TCA	Ácido Tricloro Acético
SCDT	Teste de Dispersão da Cromatina dos eSpermatozoides	TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
SF	Selle-Francais	Trap	<i>Total Reactive Antioxidant Potential</i>
SNARE	Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) Attachment protein Receptor	TTH	Solução de TBA, TCA e HCL
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences	TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling
TALP	Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate	UHT	Ultra Heat Treated
TBA	Ácido TioBarbitúrico	UI	Unidades Internacionais
TBARS	Substâncias Reactivas ao Ácido TioBarbitúrico	VAMP	Vesicle Associated Membrane Protein

ABREVIATURAS

AA	Anglo-Árabe	n	Número de observações
AB	AntiBióticos	nm	Nanómetro
AI	Acrossoma Íntegro	NS	Não Significativo
Conc	Concentração espermática	PI	Peça Intermédia
DAD-IS	Domestic Animal Diversity – Information System	PMS	ESpermatozoides com Mobilidade Progressiva
dp	Desvio padrão	PMS AC	ESpermatozoides com Mobilidade Progressiva após Colheita
E	Este	PMS AD	ESpermatozoides com Mobilidade Progressiva após Diluição
ESAC	Escola Superior Agrária de Coimbra	PMS 24H	ESpermatozoides com Mobilidade Progressiva após 24 H de conservação a 4°C
F	Fertilidade	PP	Peça Principal
FC	Fertilidade por Ciclo	r	Coefficiente de correlação
FER	Fertilidade no Final da Época de Reprodução	R²	Coefficiente de determinação
G	Força centrífuga	Sorr	Sorraia
MP	Membrana Plasmática	SPZ	ESpermatoZoide
m	mili	TDT	Deoxinucleotidil Transferase Terminal de nucleótidos
M	Molar	TRIS	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
min	minuto	TROLOX	6-hidroxi 2,5,7-tetrameticromano-2-ácido carboxílico
mL	miliLitro	Vit	Vitalidade espermática
Morf	Morfologia	VOL	VOLUME de sémen filtrado

SÍMBOLOS

- $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ Elevado potencial membrana
mitocondrial
- $\downarrow\Delta\Psi_{mit}$ Baixo potencial membrana mitocondrial
- % Percentagem
- μ Micra
- λ Comprimento de onda

AGRADECIMENTOS

O resultado do que somos e do que fazemos ao longo da nossa existência não é, de forma alguma, um trajecto solitário nem produto exclusivo de nós próprios. Os nossos feitos contam sempre com a ajuda de interpostas pessoas, muitas vezes nem sabendo elas que o fazem, quanto mais não seja porque das suas funções advém a actuação que proporciona a efectivação do nosso propósito. Para Vós, que neste grupo se enquadram um grande “Bem Hajam”.

Ao Sr. António Nobre de Oliveira, grande entusiasta da criação cavalariça e da defesa do património equino da ESAC, pelo apoio constante, encorajamento e compreensão e por todos os ensinamentos que me transmitiu.

Ao Prof. Dr. Manuel Machado Faria, por ter acreditado em mim e pela confiança, quase sempre assustadora, que em mim depositou.

À Sr^a. Conceição Cravo, o meu braço direito e esquerdo, dirijo umas palavras em particular. Admiro-a por tudo aquilo que é!

À Prof. Dr^a. Maria José Vila-Viçosa, que me ajudou nos meus primeiros passos no Laboratório de Reprodução Animal Dr. França Martins, da ESAC.

Ao Yvo Decavelle, por me ter aberto as portas nos “Haras Nationaux Francaise” e pela fantástica estadia em França que me proporcionou; ao Jean-Marie Baradeau e à Mariane Vidament, que me acolheram no seio das suas famílias e do seu trabalho, proporcionando-me um crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Gomes da Costa, por ter permitido levar para as aulas de Bioquímica, espermatozoides equinos para o estudo da bioenergética mitocondrial.

Ao Prof Dr. Fernando Delgado, por me ter inculcido, mesmo sem saber, o gosto pela estatística e pela preocupação e empenho em procurar corrigir uma injustiça.

A todos os colegas de trabalho do sector de equinos da ESAC, Pedro Pinto Bravo, Rosa Rebordão, Manuel Vaz de Castro, Miguel Moura, Fernanda Serrador, Pedro Rodrigues, Jorge Rama, e a todos os estudantes que passaram pelo Laboratório de

Reprodução Animal Dr. França Martins, uns mais marcantes do que outros e cuja lembrança guardo com muito carinho.

Aos investigadores dos trabalhos consultados, especialmente àqueles que tiveram a gentileza de me ceder bibliografia destacando-se o Dr. Bayard Storey, a Prof. Dr^a. Maria do Mar Oom e o Dr. Diego Bucci.

À Alexandra Amaral pelo apoio técnico na captação das imagens das SNAREs e à Dr^a. Teresa Almeida Santos pela cedência do microscópio de fluorescência da unidade de Genética dos Hospitais da Universidade de Coimbra, para captação das referidas imagens.

Ao Prof. Dr. João Ramalho Santos por, no seu regresso dos EUA em 2000, ter tido a coragem de aceitar como estagiária esta desconhecida que lhe propôs o estudo da actividade mitocondrial dos espermatozoides equinos, orientando-me no meu estágio curricular da Licenciatura em Bioquímica e por, mais tarde, ter aceite responsabilizar-se cientificamente pela realização desta tese e pela revisão crítica do manuscrito; por ter tido a enorme paciência de rever e corrigir os textos ingleses dos artigos entretanto publicados.

À FCT pelo apoio financeiro concedido (SFRH/BD/37612/2007) no âmbito do QREN-POPH-Tipologia 4.1-Formação Avançada, comparticipada pelo Fundo Social Europeu e por fundos nacionais do MCTES.

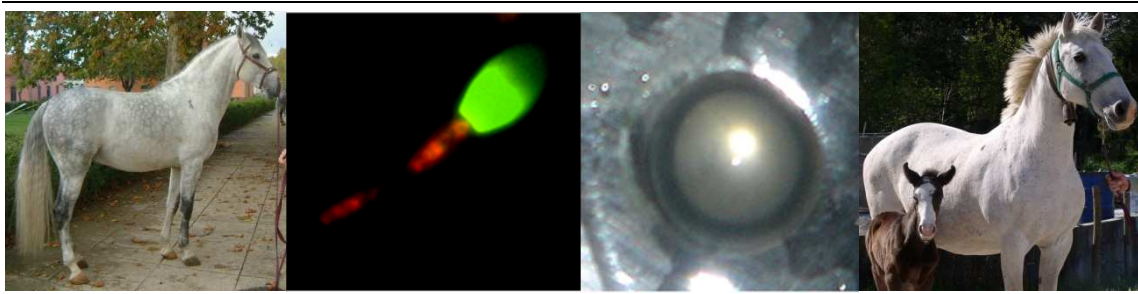
E o que dizer aos amigos? A amizade não se agradece! Conquista-se, alimenta-se, respeita-se e retribui-se. Cris e Pedro, Cristina e Diogo, Aida, Filipe, primas Mariazinha, Belém e Ana, Ângela, Armandinha, Lena, Nuno, Frederico, Karen, Jaime, espero ter sido, e manter-me, merecedora da amizade que me dedicam. Isabel Marques, expresso ainda a minha gratidão por tantas vezes saberes mostrar-me o que realmente importa. Paula Mota, deixo-te também o meu reconhecimento pela disponibilidade manifestada, pelo auxílio prestado e por teres marcado pela diferença. Isabel, lamento tanto teres partido tão cedo.

Ao Pedro, pela cumplicidade, compreensão, carinho e apoio.

À minha família, da qual colhi e colho, os meus mais valiosos ensinamentos e de quem recebi o maior apoio.

CAPÍTULO 1

ENQUADRAMENTO, OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA TESE



SUMÁRIO

O enquadramento da tese, a motivação da sua realização, assim como os objetivos do trabalho e a organização do seu conteúdo são tratados no presente capítulo.

1. ENQUADRAMENTO, OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA TESE

1.1. ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO

Do ponto de vista do Homem, os animais servem propósitos múltiplos e o seu uso pode ter diferentes objetivos que vão desde os económicos aos ecológicos, passando pelos sociais. De fato, para além de serem importantes no suprimento da demanda de alimentos representam também uma forma de bem-estar, recreio e riqueza, atuando ainda como fortes determinantes da paisagem. Considerando os animais de produção, qualquer que seja a sua assunção, a produção animal constantemente influencia e interage com outros componentes da economia (KING, 1993).

Os fenómenos reprodutivos nas espécies pecuárias assumem particular interesse porquanto uma reprodução eficiente é a base de qualquer sistema de produção animal. Na espécie equina, a importância da eficiência reprodutiva é majorada não só pela fisiologia da reprodução e pelos objetivos de criação. Com efeito, vários autores são de opinião de que a fertilidade nos equinos foi influenciada negativamente pela domesticação. Esta espécie é, de entre as dos animais de produção, a que apresenta índices de fertilidade mais baixos, fato decorrente da seleção zootécnica que nunca levou em consideração critérios de fertilidade. Ainda hoje, os critérios de seleção aplicados assentam nas características morfo-funcionais. Assim, a reprodução equina é, de entre a dos animais de produção, a mais dispendiosa e a que justifica uma melhoria no seu rendimento por aumento da fertilidade da espécie. O macho equino assume, aqui, um papel de relevo porquanto a possibilidade de disseminar o seu património genético ser largamente superior à da fêmea.

As modernas técnicas de reprodução aplicadas aos equinos possibilitam a execução de programas de manejo reprodutivo nos quais um número suficiente de células espermáticas aparentemente funcionais e competentes é depositado no aparelho reprodutor da fêmea, no local e no tempo mais apropriado para que a fecundação tenha lugar, possibilitando aumentar os índices reprodutivos. Contudo, o desenvolvimento das modernas tecnologias de reprodução aplicado a esta espécie tem sido lento, não só em virtude dos constrangimentos impostos pelas associações de criadores e respectivos

Livros Genealógicos, mas também devido ao fato de o conhecimento adquirido até à data apresentar algumas dissemelhanças da generalidade dos mamíferos estudados. Por outro lado, a magnitude do porte e o temperamento dos animais desta espécie conferem à sua manipulação para fins científicos características muito particulares materializadas na exigência de instalações e manejo apropriado, fatores determinantes da existência de infra-estruturas dispendiosas e de pessoal qualificado.

A reprodução é um processo complexo que apresenta contrastes notáveis mesmo entre espécies relacionadas (KING, 1993). No macho, o processo reprodutivo envolve, *à priori*, a produção, pelas gónodas, de espermatozóides. A avaliação de parâmetros quantitativos (volume de sémen e concentração espermática) e qualitativos (mobilidade, vitalidade e morfologia dos espermatozóides), consignados pela “Society for Theriogenology”, tem sido considerada como via de acesso à fertilidade potencial de um macho. Não obstante a concentração espermática funcionar como um indicador da capacidade testicular para produzir espermatozóides, a mobilidade espermática dar indicação da integridade do axonema e estruturas associadas, assim como do metabolismo celular, e a morfologia da célula ser um reflexo da qualidade da espermatogénese, verifica-se uma dissociação entre o avaliado *à priori* e a fecundidade *à posteriori*. Com efeito, a aptidão funcional da célula espermática é determinada por uma diversidade de fatores que, todavia, não são tidos em consideração nos sistemas tradicionais de avaliação da qualidade do esperma, tais como a integridade funcional e estabilidade das membranas espermáticas, a integridade do ADN nuclear, a funcionalidade das mitocôndrias, entre outros. Já a eficiência do espermatozóide assenta numa intrincada, e pouco compreendida, rede de relações organizacionais entre os diversos componentes dos seus macro e micro-domínios estruturais.

As implicações que estes aspectos assumem na fertilidade dos equinos encontram-se frugalmente elucidadas tanto mais quando tomadas em consideração as raças autóctones portuguesas nomeadamente o Puro Sangue Lusitano e o cavalo do Sorraia. Estudos conducentes ao conhecimento do padrão espermático do cavalo Lusitano são escassos e inexistentes quanto ao cavalo do Sorraia.

1.2. OBJETIVOS

Com o presente trabalho de investigação pretendeu-se:

- i. Caracterizar o padrão espermático nas Raças Puro Sangue Lusitana e Sorraia
- ii. Modular os parâmetros espermáticos dos equinos em função da sazonalidade reprodutiva
- iii. Estender à espécie equina o modelo atual da reação do acrossoma, avaliando a presença de microdomínios lipídicos e de proteínas relacionadas com a hipótese SNARE de fusão de membranas, assim como a ubiquitinação diferencial dos espermatozoides, em machos com e sem problemas de fertilidade
- iv. Confrontar integridade e funcionalidade espermática, por aplicação de diferentes metodologias, de forma a possibilitar o incremento do valor preditivo do espermograma tradicional.

1.3. ORGANIZAÇÃO DA TESE

A tese, resultado da articulação de vários trabalhos desenvolvidos, é organizada em 8 capítulos onde se descrevem as diferentes abordagens explicativas do tema escolhido e as perspectivas futuras sendo que o contexto e âmbito da tese se encontram introduzidos no presente capítulo.

No Capítulo 2 compõe-se uma resenha tanto da anatomia e fisiologia/endocrinologia do aparelho reprodutor do macho, bem como da espermatogénese, com o propósito de melhor compreender a composição e funcionalidade do esperma. Concentra-se também aqui uma síntese da teoria da biologia da célula espermática encarada importante para sustentar os trabalhos desenvolvidos.

No capítulo 3 é feita uma contextualização relativa aos parâmetros espermáticos que têm sido utilizados para avaliar a qualidade do esperma nos equinos, tanto em processos de selecção de futuros reprodutores como em programas de manejo

reprodutivo, sendo descritas as técnicas de obtenção, de análise, de conservação e de aplicação do esperma.

No capítulo 4 descreve-se o estudo dos parâmetros espermáticos das raças Lusitana e Sorraia, não sem antes se fazer uma breve descrição histórica destas raças autóctones de Portugal.

Os efeitos da sazão sobre a qualidade espermática e suas implicações, tanto na utilização temporã dos machos como na avaliação do potencial de fertilidade de futuros reprodutores, estão descritas no capítulo 5.

O capítulo 6 é dedicado ao estudo das proteínas relacionadas com a hipótese SNARE de fusão de membranas nos espermatozóides equinos, à avaliação da ubiquitinação diferencial dos espermatozóides e à presença de microdomínios lipídicos e suas relações com a fertilidade dos machos.

No capítulo 7 descreve-se o trabalho realizado no estudo da integridade e funcionalidade de espermatozóides obtidos de garanhões com diversos índices reprodutivos e suas implicações na definição de um espermograma normal.

Por fim, as conclusões gerais, assim como sugestões para trabalhos futuros, são apresentadas no capítulo 8.

CAPÍTULO 2

INTRODUÇÃO GERAL



SUMÁRIO

A produção e ejaculação de espermatozóides competentes em número adequado à fertilização são fatores imperativos para a reprodução. Considerando que a formação do espermatozóide compreende uma sequência de eventos citológicos que se iniciam no epitélio seminífero púbere e que para a formação do plasma seminal contribuem as vias genitais e glândulas anexas ao aparelho reprodutor faz-se, neste capítulo, uma breve abordagem à anatomia e fisiologia do macho equino enquadrando-a nos aspetos fundamentais da biologia do espermatozóide e da avaliação do esperma. É também feita uma abordagem dos atributos que a célula espermática deve desenvolver e reter para poder fertilizar um oócito contextualizando-os nas metodologias disponíveis para a sua avaliação e na capacidade que as mesmas têm de fornecer informação acerca da fertilidade potencial de um dado macho.

CAPÍTULO 2

INTRODUÇÃO GERAL

2.1. A REPRODUÇÃO NA ESPÉCIE EQUINA

Os requisitos para uma reprodução eficiente não parecem excessivos se atendermos a que somente é necessário que uma fêmea fértil seja beneficiada por um macho fértil no momento próprio do ciclo éstrico para que resulte um conceito que se desenvolva com sucesso durante a gestação e após o parto (KING, 1993). No entanto, o grau de produtividade inerente a cada animal envolve uma interação complexa entre o genótipo, o ambiente e o manejo. A componente genética dita o potencial para produzir e reproduzir, o ambiente governa quanto do potencial pode ser alcançado enquanto o manejo influencia grandemente ambos (KING, 1993). Nas espécies de reprodução sazonal, como a equina, os fatores ambientais como a temperatura, a humidade e a disponibilidade de alimentos em integração com o fotoperíodo, que se mantém constante de ano para ano, regulam os períodos de atividade reprodutiva.

2.1.1. SAZONALIDADE REPRODUTIVA

A produção de gâmetas competentes para a fertilização assenta na funcionalidade dos órgãos reprodutivos, dependentes do funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e conseqüentemente, da produção de fatores endócrinos assim como de fatores testiculares parácrinos e autócrinos. A natureza específica e a contribuição relativa dos vários fatores envolvidos no controlo endócrino-paracrino-autócrino da função testicular do garanhão não se encontram suficientemente estudadas mas é sabido que o controlo endócrino do sistema reprodutivo assenta num mecanismo clássico de *feedback* e se inicia ao nível da glândula pineal (epífise) cujo funcionamento é controlado por estímulos luminosos recebidos pela retina e enviados à epífise via o nervo ótico e o núcleo supraquiasmático, região do hipotálamo anterior.

Na generalidade dos mamíferos de reprodução sazonal, os estímulos do fotoperíodo recebidos pela retina, modulam a atividade da glândula pineal (MINNEMAN e WURTMAN, 1975) que libera ou suprime a libertação de melatonina nos períodos de escuridão e luminosidade, respetivamente (GUERIN *et al.*, 1995). A dinâmica da secreção de melatonina está na base da ativação/inativação do eixo reprodutivo sendo o

hipotálamo o local de integração da informação das flutuações na duração dos dias e das noites. Desconhece-se, contudo, como é que a mensagem da melatonina é decodificada a nível celular de forma a regular a função reprodutiva, nomeadamente a secreção de fatores de libertação de gonadotropinas (GnRH) por parte do hipotálamo. Os GnRHs atuam sobre a glândula pituitária, estimulam o seu lobo anterior a produzir e secretar gonadotropinas (hormona folículo estimulante, FSH e hormona luteinizante, LH) que, via circulação sanguínea, são conduzidas às gónadas, regulando a atividade destas.

Locais de ligação a 2[¹²⁵]iodomelatonina foram já identificados por STANKOV, FRASCHINI e REITER (1991) e NONNO *et al.* (1995) na pituitária dos equinos, nomeadamente na *pars tuberalis*. Similarmente a outras espécies de reprodução sazonal, no equino, a informação do fotoperíodo é traduzida num perfil circadiano de secreção de melatonina que lhes confere a capacidade de responder fisiologicamente às variações anuais da duração da luz do dia. Durante o Outono-Inverno, em que a duração da luz do dia é inferior aos períodos de escuridão, os níveis de melatonina são mais elevados do que na Primavera-Verão (*vide* SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003, para revisão), com consequências sobre a atividade das gónadas, mais acentuadamente na fêmea equina do que no macho. De facto, em áreas geográficas de latitudes elevadas, a fêmea entra em anestro durante o Outono-Inverno, retomando a ciclicidade ovárica na Primavera-Verão, não se verificando o mesmo padrão de resposta ao fotoperíodo em fêmeas que tiveram a glândula pineal extirpada (pinalectomizadas) (GRUBAUGH *et al.*, 1982). À latitude do território continental português, o anestro de Inverno não é tão marcado, podendo mesmo algumas éguas com boa condição corporal (FERREIA-DIAS, 2005) e em regime de semi-estabulação (MACHADO-FARIA, 1991) apresentarem ciclos éstricos.

Relativamente ao macho, não ocorre cessação da produção de espermatozóides (espermatogénese) durante a contra-estação. Porém, variações nas características hormonais e seminais (THOMPSON *et al.*, 1977; IRVINE e ALEXANDER, 1982; JOHNSON e THOMPSON, 1983; BERNDTSON, SQUIRES e THOMPSON, 1983; CLAY *et al.*, 1988, 1989; ROSER e HUGHES, 1992; HOFFMANN e LANDECK, 1999), assim como em certos aspetos do comportamento sexual são reportadas por alguns autores (PICKETT, FAULKNER e SUTHERLAND, 1970; THOMPSON *et al.*, 1977; CLAY *et al.*, 1987). Os estudos desenvolvidos sugerem que os garanhões se tornam foto-refratários com o avançar da época de

reprodução. O papel fisiológico dos dias curtos no Outono é o de abolir a condição de refratariedade e restabelecer o mecanismo através do qual o garanhão se torna novamente sensível ao aumento do fotoperíodo (CLAY *et al.*, 1987) – o fim da foto-refratariedade permite a foto-indução subsequente. No entanto, a duração da secreção diária de melatonina depende do momento em que o animal é exposto à luz. Há alguma evidência de que os poldros são condicionados e desenvolvem um padrão de secreção de melatonina numa fase precoce da vida, entre as 7-11 semanas de idade (KILMER *et al.*, 1982).

A resposta ao ritmo de produção de melatonina induzido pelo fotoperíodo depende da duração do tempo de gestação da espécie considerada de forma a assegurar que a cria nasça no período do ano em que as temperaturas e a disponibilidade de alimentos são as mais favoráveis, ou seja na Primavera-Verão (*vide* REITER *et al.*, 2009, para revisão). A espécie equina é pois, uma espécie de reprodução sazonal de dias longos exibindo aumentos da capacidade reprodutiva durante a Primavera-Verão, em resposta ao fotoperíodo. Daqui advêm duas condicionantes importantes quando considerada a principal razão da criação cavalara, ou seja, a vocação desportiva e recreativa dos animais: por um lado, a carreira desportiva de garanhões é incompatível com a sua utilização enquanto reprodutores, por outro, o longo período de gestação da égua (320 a 350 dias) impossibilita a sua utilização simultânea como reprodutora e em competições. A primeira condicionante determina a procura de bancos de congelação de sémen e a segunda, de éguas que funcionem como barrigas de aluguer. Do ponto de vista económico-prático ambas as soluções libertam os animais para o desporto/lazer e do ponto de vista técnico-científico pressupõem a aplicação de tecnologias reprodutivas que passam pela recolha e avaliação da qualidade do esperma.

2.1.2. O ESPERMA EQUINO

O sémen, ou esperma, é o fluido que, em condições normais, é expelido pela uretra durante a ejaculação. É constituído por uma fração figurada, os espermatozóides, produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos e por uma fração líquida, o plasma

seminal (SIMÕES, 1984), resultante da atividade das vias espermáticas e glândulas anexas que, com o pênis formam o aparelho reprodutor do macho equino. De aspeto branco-leitoso, tanto mais acentuado quanto maior a concentração espermática, apresenta pH neutro (6,2 e 7,8) e osmolalidade entre 300 a 334 mOsm/kg. recet

2.1.2.1. ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE EQUINO

Os espermatozoides são células altamente regionalizadas e especializadas, com um número haplóide de cromossomas (32 no garanhão) e com uma capacidade de reparação limitada. Estruturalmente, apresentam duas regiões maiores, a cabeça e o flagelo. A cabeça exhibe forma ligeiramente ovalada (5,33 μm a 6,62 μm de comprimento por 2,75 μm a 3,26 μm de largura; BRITO, 2007), determinada pela forma do seu núcleo, sub-estrutura celular que contém o ácido desoxirribonucleico (ADN) complexado maioritariamente com protaminas, proteínas carregadas positivamente e ricas em resíduos de arginina e cisteína, que substituem as histonas em cerca de 85% do ADN durante a espermiogénese (*vide* OLIVA, 2006 e MILLER, BRINKWORTH e ILES, 2010, para revisão), e que possibilitam a densa compactação do ADN, conferindo ao núcleo uma forma hidrodinâmica, permissiva da mobilidade do espermatozóide. Recobrimo o núcleo encontra-se a membrana nuclear (MN), parca em complexos do poro nuclear (AMANN e GRAHAM, 1993). Ainda na região da cabeça e recobrimo o núcleo na sua porção apical, até cerca de 2/3 da sua

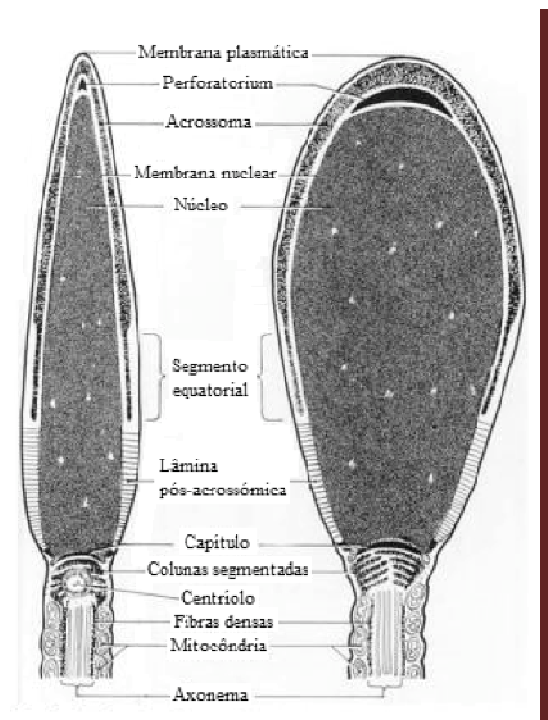


Figura 2.1. Representação esquemática da cabeça de um espermatozóide equino.

Adaptado de AMANN e GRAHAM (1993)

extensão, encontra-se o acrossoma, estrutura vesicular derivada do complexo de Golgi (HERMO *et al.*, 2010a), rica em enzimas hidrolíticas, proteases e recetores celulares necessários para a interação entre o espermatozóide e a zona pelúcida do oócito durante a fertilização. A membrana acrossómica interna (MAI) contacta a teca periuclerlar, uma camada proteica que se sobrepõe à membrana nuclear (MN), ao passo que a membrana acrossómica externa (MAE) se situa subjacente à membrana plasmática (MP), fundindo com esta durante a exocitose do acrossoma (reação acrossómica). No espermatozóide equino, o acrossoma é ligeiramente espesso na sua porção apical mas acentuadamente fino na sua porção caudal (distal). Esta região, denominada de segmento equatorial, não possui enzimas proteolíticas e não participa na reação acrossómica mas interage com o oolema durante a fertilização. No bordo posterior do núcleo, a MN e a MP debruam o local de inserção do flagelo, ou fossa de implantação (SIMÕES, 1984) (Figuras 2.1 e 2.2).

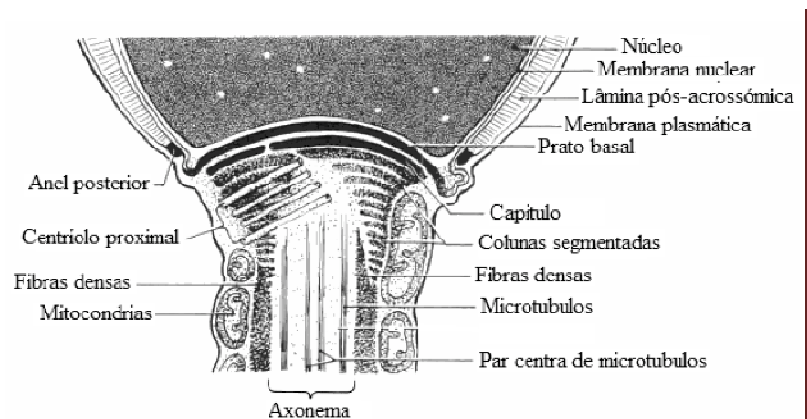


Figura 2.2. Representação esquemática da região de ligação da cabeça à peça intermédia, no espermatozóide equino.

Adaptado de AMANN e GRAHAM (1993)

O flagelo, com um comprimento de 33 a 54 μm no espermatozóide equino, é o elemento propulsor do espermatozóide e apresenta-se adelgado de diante para trás podendo distinguir-se segmentos distintos que partilham em comum o axonema e as fibras densas. O axonema, estrutura formada por α - e β -tubulina disposta num par de microtúbulos centrais rodeado por outros nove pares de microtúbulos periféricos e equidistantes entre si, mas ligados por braços de dineína, proteína com atividade ATPase

dependente de Mg^{2+} , constitui o verdadeiro motor para a mobilidade celular. Adjacente a cada par de microtúbulos periféricos, encontram-se nove fibras densas que conferem flexibilidade ao flagelo. A porção proximal do flagelo constitui a peça de ligação à cabeça do espermatozóide e é composta pelo prato basal, camada espessa de material denso que estabelece a ligação à fossa de implantação, pelo capitulum, formação convexa que se adapta à concavidade posterior do prato basal e aloja o centríolo proximal e por nove colunas segmentadas que atravessam estas duas estruturas e no seu término, se sobrepõem às fibras densas (SIMÕES, 1984).

A peça intermédia (PI; com 8 μm a 10,5 μm de comprimento), região mais espessa do flagelo, estende-se por cerca de 1/3 do seu comprimento (DOTT, 1975; BIELAŃSKI e KACZMARSKI, 1979) e nela se encontra, revestindo perifericamente o axonema (Ax) e as fibras densas (SIMÕES, 1984), uma hélice de mitocôndrias. O número de espiras da hélice é característico de cada espécie sendo referida a existência de cerca de 50-60 mitocôndrias na bainha mitocondrial do espermatozóide equino. A restante fração do flagelo é ainda dividida em peça principal (PP) e peça terminal. A peça principal, que se estende a partir do ânulo, é a fração mais longa do flagelo e no seu início, observa-se o estreitamento das fibras densas 3 e 8 que se continuam por duas

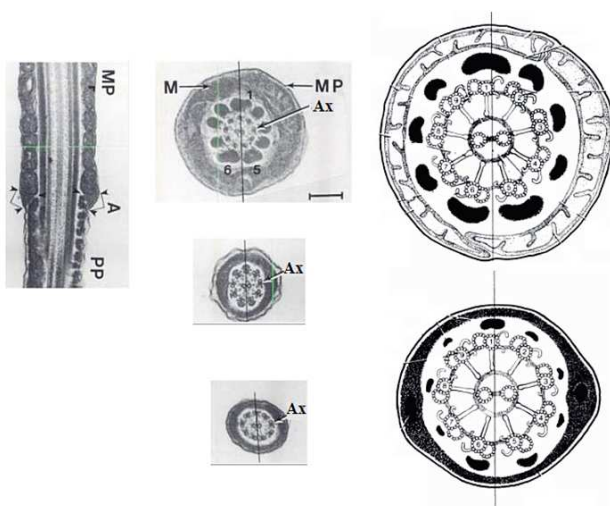


Figura 2.3. Imagem de cortes transversais e representação esquemática das diferentes secções do flagelo (peça intermédia e peça principal) no espermatozóide equino.

Adaptado de AMANN e GRAHAM (1993)

colunas fibrosas unidas por projeções circulares formando uma bainha fibrosa em redor das fibras densas. Ambas as estruturas se detêm antes do término da peça principal. A peça terminal encontra-se reduzida ao axonema e à

MP, que recobre todo o flagelo (*vide* SIMÕES, 1984; FAWCETT, 1981 e BRITO, 2007, para revisão).

Diferentes sistemas foram estabelecidos para classificação da morfologia espermática em equinos, desde os propostos por BLOOM (1950a; 1973), para touros, ao proposto por SAACKE *et al.* (2000). Um dos sistemas proposto por Bloom baseia-se em três categorias morfológicas: defeitos primários, ou seja, aqueles que ocorrem durante a espermatogénese (traduzem falhas na espermatogénese e são de origem testicular); defeitos secundários, aqueles que surgem durante o trajeto das células pelos ductos excurrentes, traduzindo falhas na maturação, como as gotas citoplasmáticas proximais; e defeitos terciários, aqueles que surgem após a ejaculação (BIELÁNSKI *et al.*, 1982; DOWSET, OSBORNE e PATTIE, 1984) como enrolamentos do flagelo. O outro sistema classifica as alterações morfológicas em maiores e menores, de acordo com o impacto que têm sobre a fertilidade: os primeiros incluem cabeças, acrossomas e peças intermédias anormais e gotas citoplasmáticas proximais, por se considerarem terem grande impacto na fertilidade; os defeitos menores, como gotas citoplasmáticas distais e enrolamentos ligeiros do flagelo, têm pouco ou nenhum efeito sobre a fertilidade. O sistema proposto por Saacke (*vide* SAACKE, 2008, para revisão) inclui a definição de defeito compensável ou não compensável, uma vez que um elevado número de SPZ normais na dose inseminante é capaz de compensar, pelo menos parcialmente, uma elevada percentagem de anomalias morfológicas.

2.1.2.2. A CONDENSAÇÃO DA CROMATINA

Das diferentes regiões da célula espermática nos equinos, a região da cabeça é aquela que mais variação apresenta quanto à forma e dimensão. Esta é fortemente influenciada pelo efeito indivíduo, encontrando-se diferenças não só entre espermatozoides de ganhões de fertilidade normal como entre ganhões férteis e sub-férteis, conforme evidenciam os trabalhos de BIELÁNSKI e KACZMARSKI (1979); VOSS, PICKETT e SQUIRES (1981), BALL e MOHAMMED (1995), GRAVANCE *et al.* (1996), CASEY *et al.* (1997) e HIDALGO *et al.* (2008). Variações na forma da cabeça, em resultado de alterações/ausência de acrossoma e de anomalias cromossómicas, têm sido implicadas em casos de infertilidade em humanos (BACCETTI *et al.*, 2003). A forma do núcleo é determinada pelo grau de compactação da cromatina, graças à substituição das histonas pelas protaminas (WARD e COFFEY, 1991) proteínas de carácter mais básico que as histonas e com

abundância de cisteína. Os resíduos de cisteína são importantes na estabilização do ADN pois ligam-se a este na região do sulco maior, neutralizando as suas cargas negativas. Ao passo que as histonas se ligam ao ADN a cada 100pb, as protaminas fazem-no a cada 600pb organizando as fibras assim formadas em estruturas denominadas toroides, que contém até 50 kb de ADN. Não se conhece ainda como é que estes toroides se organizam para formar a cromatina contudo, sabe-se que esta é estruturada em pregas (“loops”) pela matriz nuclear. As histonas que prevalecem parecem situar-se entre os toroides, nas regiões de ligação do ADN à matriz. Esta estrutura, denominada modelo do “Donnut-loop” (Figura 2.4) contrasta com a dos nucleossomas e solenóides formados pelas histonas. Assim, no núcleo das células espermáticas o ADN assume uma configuração mais empacotada, mas menos enrolada, do que no das células somáticas (*vide* SHAMAN e WARD, 2006, para revisão).

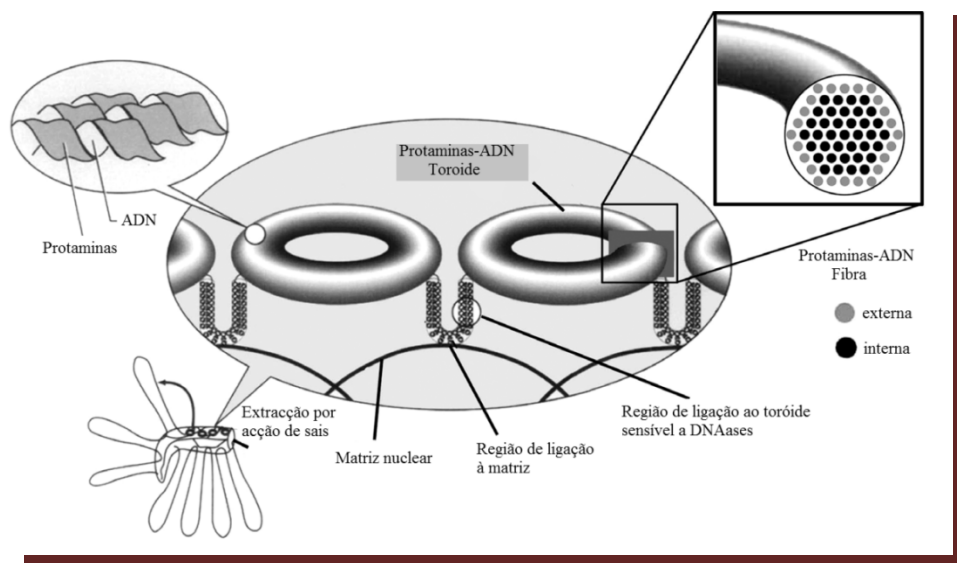


Figura 2.4. Modelo do *Donut-Loop* para a cromatina espermática.

Adaptado de SHAMAN e WARD, 2006

Em bovinos e humanos com problemas de fertilidade EVENSON *et al.* (1980) constatou uma maior suscetibilidade do ADN espermático à desnaturação, quando comparada com indivíduos de fertilidade comprovada. Tal suscetibilidade resulta de falhas na compactação da cromatina que têm sido associadas tanto à presença de ADN

fragmentado (SAILER *et al.*, 1995) como descondensado (PEDERSEN, 1987). Em espermatozoides equinos, MORRELL *et al.* (2008) observaram correlação positiva ($P < 0,05$) entre as cabeças com forma piriforme e o grau de fragmentação do ADN, com implicações na fertilidade dos animais avaliados.

2.1.2.3. A MEMBRANA PLASMÁTICA

Para além das macro-regiões celulares descritas acima, separadas por arranjos estruturais específicos de proteínas transmembranares, como o anel posterior (que separa a MP, ao nível da cabeça, da da PI) e o ânulus (que marca a separação entre a PI e a PP), reconhecem-se ainda, no espermatozóide, domínios regionalizados da membrana plasmática (MP) nomeadamente ao nível da cabeça da célula onde se distinguem quatro regiões caracterizadas por separações laterais de lípidos e proteínas (*vide* FLESCHE e GADELLA, 2000, para revisão) sem que barreiras estruturais à difusão desses componentes tenham sido comprovadas (LÓPEZ, OLEA e RETAMAL, 2007). Estas regiões, ou domínios (apical, pré-equatorial, equatorial e pós-equatorial), representam especializações da MP, tendo cada uma delas um papel único na sequência de eventos que culminam com a fertilização de um oócito, como veremos adiante.

No geral, a membrana plasmática dos espermatozoides equinos contém aproximadamente 58% fosfolípidos (KOMAREK *et al.*, 1965), dos quais 13% correspondem a esfingomielina (SM) e 6 a 10% a glicolípidos (KOMAREK *et al.*, 1965; PARKS e LYNCH, 1992), quase exclusivamente na forma de seminolípidos. Os glicerofosfolípidos estão representados por fosfatidilcolina (PC; 27% a 48%), fosfatidiletanolamida (PE; 13% a 16%), fosfatidilserina/cardiolípidina (PS/cardiolípidina; 15%), fosfatidilglicerol (PG; 5%) e fosfatidilinositol (PI; 3%) (GADELLA *et al.*, 2001). Tal como nas células somáticas, os lípidos apresentam uma distribuição assimétrica através da membrana: a SM e a PC abundam no folheto externo enquanto a PE e a PS se encontram predominantemente no folheto interno. A composição lipídica da MP do SPZ equino difere da de outras espécies de mamíferos, incluindo humanos, no tipo de cadeia alifática ligada na posição sn-2 do glicerol nas frações de PC e PE. Com efeito, o ácido docosapentanoico (DPA; 22:5, um ácido gordo polinsaturado de cadeia longa - PUFA) é o maior componente da MP dos

espermatozóides equinos (17%) contrariamente às outras espécies de mamíferos estudadas, em que o ácido docosahexanóico (DHA; 22:6; 8%) prevalece (GADELLA *et al.*, 2001) e é até apontado, como um marcador de fertilidade em humanos (ZALATA *et al.*, 1998), e *Mus musculus* (ROQUETA-RIVERA *et al.*, 2011). Dos lípidos neutros, o colesterol representa entre 13% a 37 % e é, de entre todos os lípidos da membrana, aquele que maior variação apresenta entre espécies e até entre ejaculados do mesmo indivíduo (KOMAREK *et al.*, 1965; GADELLA *et al.*, 2001). A sua função é a de estabilizar os fosfolípidos mantendo a membrana num estado de fluidez compatível com a sobrevivência da célula. O conteúdo e distribuição do colesterol nas membranas biológicas depende da natureza da porção polar do fosfolípido e do tamanho e grau de in/saturação da cadeia carbonada.

Intercaladas entre os fosfolípidos encontram-se proteínas, integrais ou periféricas, que constituem até cerca de 50% do peso seco da MP. Umas, com origem na biogénese da célula, constituem recetores e transportadores celulares, enquanto outras são incorporadas ao espermatozóide durante o seu trânsito pelas vias espermáticas, por meio de interações lipido-proteína, proteína-proteína e/ou lectina-carbohidrato. Dentre estas, destacam-se proteínas cinases A (PKA; cinases de serina/treonina capazes de fosforilar uma grande diversidade de proteínas, desempenham papel importante na função espermática) com domínios catalíticos ancorados na membrana (AKAPS), em microdomínios lipídicos ricos em colesterol e esfingomiélinina, resistentes à solubilização por detergentes, os “lipid rafts”, que apresentam difusão lateral na bicamada. Muitas das proteínas que emergem na face externa da MP encontram-se glicosiladas, formando a interface entre o espermatozóide e o meio circundante, o glicocálice. Adicionalmente, o glicocálice apresenta também proteínas que se ligam à MP da célula por via da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e cuja característica mais marcante é encontrarem-se associadas aos microdomínios lipídicos. Nas células somáticas as proteínas GPI incorporadas nestes microdomínios modulam várias funções de relevância biológica como as vias de transdução de sinal e o endereçamento de proteínas. A função do glicocálice não se encontra totalmente esclarecida pensando-se, contudo, que, a par do citoesqueleto, joga um papel na manutenção da regionalização da MP (*vide* SCHRÖTER *et al.*, 1999; FLESCHE e GADELLA, 2000; BOERKE *et al.*, 2008).

2.2. PRODUÇÃO ESPERMÁTICA

Os testículos são considerados os órgãos principais do sistema reprodutor uma vez que neles se produzem os espermatozóides (via espermatogénese) e algumas das hormonas que governam as funções reprodutivas.

Os espermatozóides desenvolvem-se no interior dos túbulos seminíferos, cordões testiculares primários que se dispõem no interior de lóbulos coniformes formados por lamelas que divergem do corpo de Highmore, ou mediastino testicular (SIMÕES, 1984). Os túbulos seminíferos representam cerca de 72% do parênquima testicular e o seu epitélio é constituído por células da linha germinal (as espermatogénicas) e pelas

células de Sertoli (JOHNSON *et al.*, 2000). Entre os tubos seminíferos encontram-se as células intersticiais ou de Leydig, ricas em recetores de LH, e responsáveis pela produção de testosterona e estrogénios, importantes na regulação da função do epitélio seminífero, do eixo hipotálamo-hipofisário e das glândulas anexas ao aparelho reprodutor (para revisão ver HESS, 2000, ROSER, 2008 e JOHNSON, THOMPSON e VARNER, 2008).

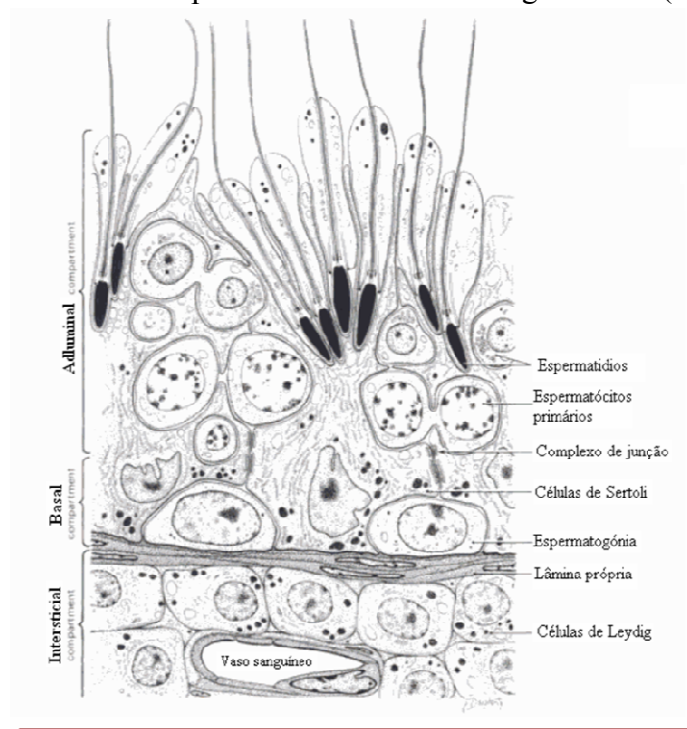


Figura 2.5. Representação esquemática de uma secção de um tubo seminífero mostrando a relação entre as células da linha germinal e as células de Sertoli adjacentes no epitélio seminífero. *Adaptado de AMANN, 1993a*

As células de Sertoli dispõem-se acima da lâmina própria (tecido peritubular) e encontram-se ligadas por projeções do seu citoplasma (“tight junctions”) formando a barreira hemato-testicular que divide o epitélio germinal nos compartimentos basal e adluminal isolando as células germinais mais desenvolvidas (espermátocitos e espermátides) do sistema imunitário (*vide* Figura 2.5) (JOHNSON, THOMPSON e VARNER, 2008). Às células de Sertoli é também marcadamente reconhecida uma função de suporte

e de nutrição das células germinais, garantindo o ambiente ótimo para o seu desenvolvimento e diferenciação. Estão também envolvidas no movimento dos espermatócitos do compartimento basal para o adluminal, na espermição (libertação dos espermátides no lúmen dos tubos seminíferos) e na fagocitose de células germinativas em degeneração (NAKANISHI e SHIRATSUCHI, 2004) e de corpos citoplasmáticos residuais. Assumem papel importante na resposta e na produção a fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos moduladores da espermatogênese uma vez que possuem recetores para a FSH e testosterona e produzem estrogénios, inibina e outros fatores parácrinos-autócrinos como *insulin-like growth fator-1* (IGF-1) e Transferrina, em resposta aos estímulos recebidos. Neste contexto, interagem intimamente com as células de Leydig, as células germinais e as células do tecido peritubular suportando, em conjunto, o desenvolvimento e a libertação dos espermatozóides no lúmen dos tubos seminíferos. Com efeito, a testosterona produzida nas células de Leydig difunde até aos tubos seminíferos e, em conjugação com a FSH, estimula as células de Sertoli a produzirem fatores (como o IGF-1) que induzem a meiose e modificações pós-meióticas nas células germinais assim como exercem efeito mitogénico sobre as células de Leydig imaturas, induzindo a produção de testosterona. A testosterona é ainda responsável por manter uma adequada função da barreira hemato-testicular. Os estrogénios, resultantes da conversão de androgénios pela enzima aromatase, aumentam com a maturidade sexual no garanhão e atuam como fatores parácrinos-autócrinos; o estradiol (E₂) produzido pelas células de Sertoli atua sobre as células germinais enquanto o E₂ produzido pelas células de Leydig atua sobre as células mióides peritubulares. A inibina, lançada na circulação periférica, inibe a produção e secreção de FSH; nos testículos, atua como fator parácrino influenciando tanto a esteroidogenesis nas células de Leydig como a espermatogênese. Os níveis intratesticulares de inibina tendem a ser baixos a vestigiais em garanhões sub-férteis e inférteis, respetivamente. Estudos recentes sobre a fisiologia da reprodução nos equinos sugerem ainda um papel de opióides e de outras hormonas como a prolactina, hormona do crescimento, hormona tiroideia, activina e *insulin-like peptide 3* (INSL3) na regulação da função reprodutiva. Os opióides atuam como neurotransmissores modulando a função hipotalâmica ao suprimirem a libertação de GnRH durante a contra-estação. A INSL3, produzida quase exclusivamente pelas células de Leydig, por estimulação da LH, parece

ter um papel parácrino no controlo da apoptose das células germinais (*vide* ROSER, 2008 e as referências aí citadas, para revisão).

2.2.1. ESPERMATOGÉNESE E BIOGÉNESE DO ACROSSOMA

O estabelecimento do processo espermatogénico atinge-se na puberdade que, no garanhão, sobrevém entre os 12 e os 24 meses de vida. Já a maturidade sexual é atingida entre os 24 e os 36 meses (JOHNSON *et al.*, 1991a). A espermatogénese pode ser dividida em três fases: a fase proliferativa, ou espermatocitogénese, caracterizada por sucessivas divisões mitóticas das células primordiais da linha germinal que se diferenciam em espermatogónias que, ao sofrerem também mitose

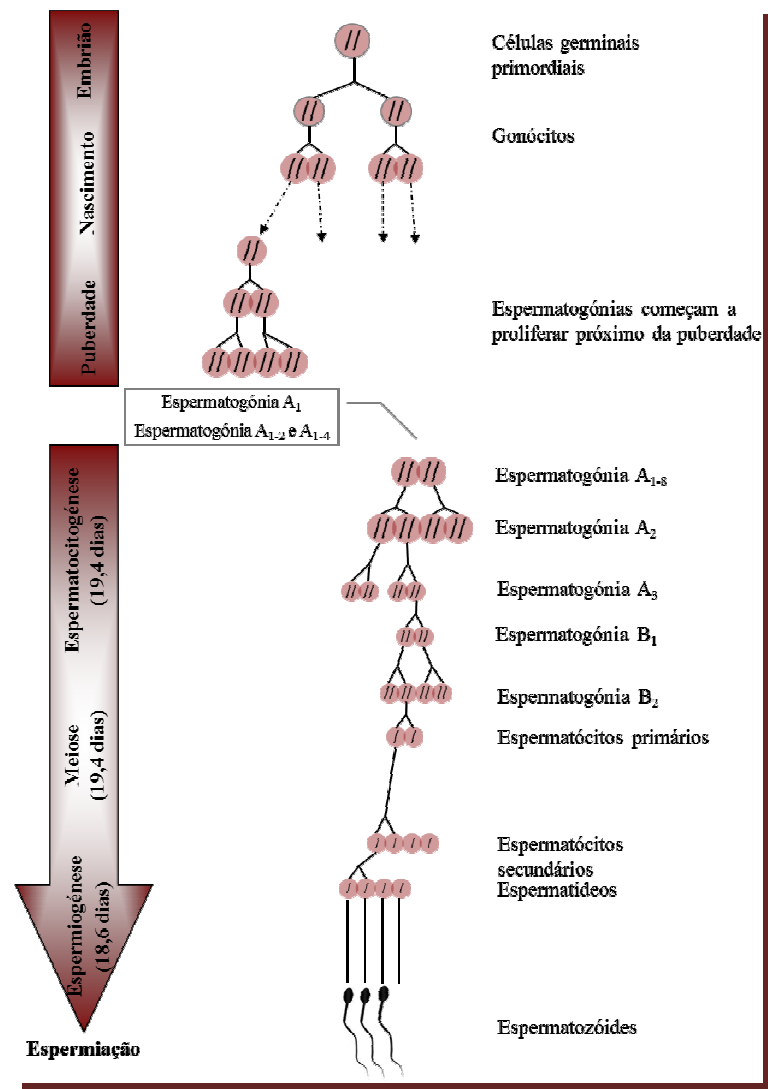


Figura 2.6. Espermatogénese no garanhão
Adaptado de Amann, 1993b.

originam espermatócitos primários; a fase meiótica, donde resultam espermatídeos haplóides e a fase de diferenciação, ou espermiogénese, em que os espermatídeos se diferenciam em espermatozoides que são, posteriormente, libertados para o lúmen dos tubos seminíferos num processo denominado espermição (JOHNSON *et al.*, 2000) (Figura 2.6).

Durante a fase mitótica, as células primordiais da linha germinal sofrem uma série de divisões equacionais destinando-se umas à manutenção do seu próprio número sendo que outras expandem o número de espermatogónias (espermatocitogénese). Temporalmente, estes eventos podem ser concomitantes ou sequenciais; geograficamente, a fase proliferativa ocorre no compartimento basal e a fase de diferenciação ocorre no compartimento adluminal após passagem dos espermatócitos primários através da barreira hemato-testicular. A fase meiótica inicia-se com a última fase S do ciclo celular e culmina em duas divisões meióticas que ocorrem rapidamente, das quais resultam espermatídeos haplóides. Os espermatozóides propriamente ditos formam-se na fase pós-meiótica (espermiogénese ou fase de alongação dos espermatídeos) por um processo de extensa remodelação celular onde é possível distinguir quatro fases: 1) a fase Golgi, em que pequenas estruturas em forma de grânulos se começam a diferenciar no complexo de Golgi, coalescem com outras vesículas e se justapõem à membrana nuclear formando a vesícula pré-acrossómica; os centríolos dispõem-se no pólo oposto ao da vesícula pré-acrossómica e o axonema emerge do centríolo distal orientado perpendicularmente à superfície da célula enquanto o centríolo proximal se dispõe próximo do núcleo, eventualmente formando a peça de ligação ao nível do colo; aparece a manchete microtubular; 2) a fase “cap”, em que a vesícula pré-acrossómica se distende distalmente, recobrando cerca de metade do núcleo; 3) a fase acrossómica, em que o acrossoma completa a sua diferenciação, as mitocôndrias se aproximam do flagelo, ocorre condensação da cromatina nuclear; e 4) a fase de maturação, em que as fibras densas se organizam rapidamente em torno do axonema, as mitocôndrias alongam, são revestidas pela cápsula mitocondrial e parte delas se dispõem em volta das fibras densas (revisto em SUTOVSKY e MANANDHAR, 2006). Nesta altura ocorre degradação do centríolo distal, perda de citoplasma e destacamento dos espermatozóides, já diferenciados, do epitélio seminífero; o acrossoma encontra-se bem desenvolvido e apresenta já alguma compartimentalização morfológica e bioquímica revelada pelos diferentes graus de densidade eletrónica que apresenta: algumas proteínas passam a localizar-se nas membranas acrossómicas e outras desaparecem da região equatorial do acrossoma e concentram-se na região apical (*vide* YOSHINAGA e TOSHIMORI, 2003, para revisão).

A partir da puberdade, a espermatogénese é um processo contínuo que ocorre em ciclos sucessivos, ou associações celulares, denominados ciclos do epitélio seminífero. No garanhão, reconhecem-se oito associações celulares diferentes, ou estádios, baseadas em 4 a 5 tipos específicos de células da linha germinal (espermatogónias, espermatócitos e espermatídeos), que se encontram associadas de uma forma característica numa mesma secção dos tubos seminíferos (SWIERSTRA, GEBAUER e PICKETT, 1974). Ao longo destes, estabelecem-se assim arranjos característicos das células germinais, em camadas concêntricas, com formas tanto mais diferenciadas quanto mais próximas estão do lúmen do tubo (SIMÕES, 1984). Cada secção constitui uma geração de células germinais a qual se encontra 12,2 dias mais desenvolvida que a da secção seguinte (SWIERSTRA, GEBAUER e PICKETT, 1974). Este intervalo de tempo, que medeia entre dois aparecimentos consecutivos do mesmo grau de desenvolvimento, dentro da mesma geração celular e numa dada área do tubo seminífero, constitui o ciclo do epitélio seminífero (SIMÕES, 1984). Como no macho equino é possível reconhecer 4,7 gerações de células (AMANN, 1993b), resulta que a duração total da espermatogénese, nesta espécie, é de 57 dias (Figura 2.7).

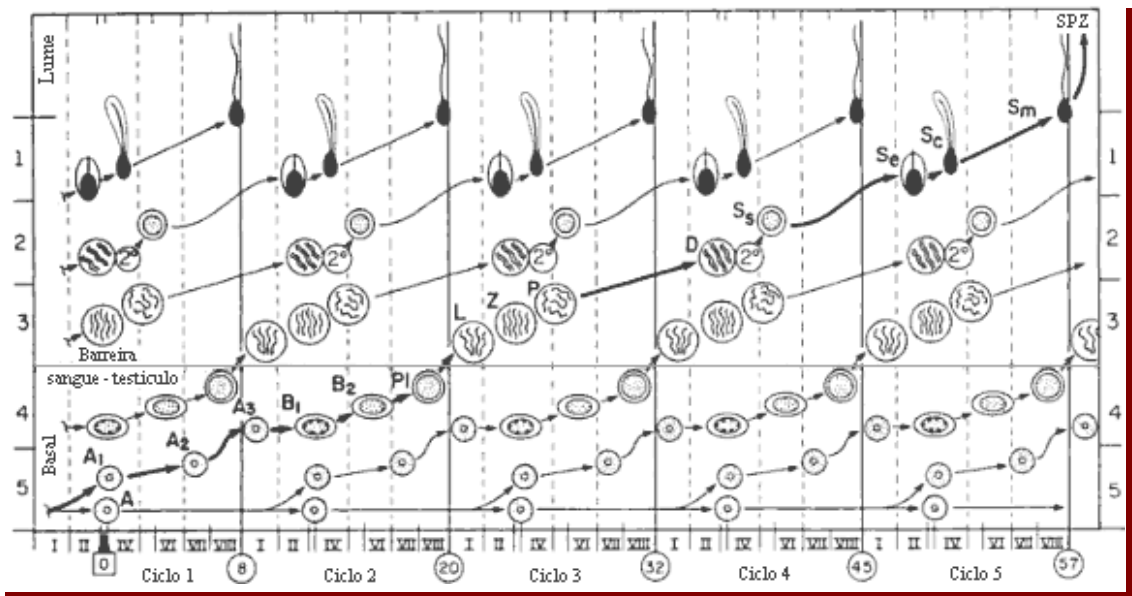


Figura 2.7. Ciclo do epitélio seminífero no garanhão.

A₁, A₂, A₃, B₁ e B₂ – espermatogónias; Pl – Preleptotono; L – Leptotono; Z – Zigotono; P – Paquítono; D – Espermatócito primário na fase Diplóteno; 2° – espermatócito secundário; Ss, se, Sc e Sm – formas celulares correspondentes à maturação dos espermatídeos; SPZ – espermatozóide pronto para ser libertado por espermiacção. Adaptado de AMANN, 1993b

Falhas no processo espermatogénico podem traduzir-se por modificações à morfologia da célula. De acordo com (HOLSTEIN *et al.*, 2003), alterações morfológicas observáveis ao nível do flagelo ocorrem durante a diferenciação dos espermátides e estão relacionadas com as estruturas da peça intermédia assim como da peça principal. Já a presença de cabeças e caudas isoladas no sémen parece ficar a dever-se à dissociação entre os centríolos proximal e distal durante os primeiros estágios da diferenciação dos espermátides (PEROTTI *et al.*, 1981; BACCETTI *et al.*, 1984; HOLSTEIN *et al.*, 1986).

2.2.2. FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO ESPERMÁTICA

A magnitude da espermatogénese, medida em termos de produção diária de espermatozóides, tem sido relacionada com o número de células de Sertoli tanto em equinos como em humanos (*vide* JOHNSON, THOMPSON e VARNER, 2008, para revisão.). Em equinos, o número de células de Sertoli relaciona-se com o peso do parênquima testicular e o volume deste com o tamanho do testículo (JOHNSON *et al.*, 1994) pelo que o tamanho destes tem sido associado à capacidade de produção espermática. Esta última aumenta com a idade do macho no período pós-púbere até à maturidade sexual mantendo-se mais ou menos constante até cerca dos 20 anos de idade (JOHNSON *et al.*, 1991b). Essa variação na produção de espermatozóides será uma consequência das alterações à composição percentual do parênquima testicular, nomeadamente, comprimento total e diâmetro dos tubos seminíferos, número de células de Leydig (JOHNSON e NEAVES, 1981) e número de células de Sertoli, por grama de parênquima testicular (BLANCHARD e JOHNSON, 1997a).

BLANCHARD e JOHNSON (1997b) verificaram que garanhões com elevada produção diária de espermatozóides possuíam tanto um maior número de células de Sertoli por testículo como de células germinais por célula de Sertoli comparativamente a garanhões com produções diárias de espermatozóides mais baixas. Nos bovinos, o número de células de Sertoli é um fator determinante do número de espermatozóides que os testículos podem produzir (BERNDTSON *et al.*, 1987). Nesta espécie, o tamanho testicular apresenta heritabilidade elevada ($\geq 65\%$), não havendo dados relativos à

espécie equina. Contudo, nesta última, dos parâmetros testiculares mensuráveis, largura total do escroto e comprimento e largura dos testículos, somente a largura total do escroto parece ser útil para estimar a produção diária de espermatozoides (PICKETT, 1993a) uma vez que permite explicar 39% das variações observadas na PDE (THOMPSON *et al.*, 1979a).

Variações nas dimensões testiculares têm, assim, sido associadas à idade dos garanhões, podendo esta explicar até 40% das variações registradas no tamanho dos testículos (THOMPSON *et al.*, 1979a). Pickett e colaboradores (citado por AMANN, 1993b) associaram a idade dos garanhões à produção espermática após observarem, entre os 13 e os 20 anos de idade dos animais, um aumento no número de células de Leydig e um declínio no número de células de Sertoli, por grama de parênquima testicular, sugerindo que a diminuição no número de células de Sertoli suportava os declínios observados na espermatogênese. Contudo, outros autores consideram que entre os 4 e os 20 anos de idade não existe relação entre o declínio no número de células de Sertoli e a produção espermática uma vez que, com o avançar da idade, a diminuição no número de células de Sertoli é compensada pelo facto de cada célula de Sertoli passar a ter capacidade de acomodar mais células da linha germinal (JONES e BERNDTSON, 1986).

CLAY *et al.* (1987) referem ainda a ocorrência de aumentos no peso dos testículos na estação reprodutiva concomitantes com o aumento da PDE. No entanto, BERNDTSON, SQUIRES e THOMPSON, (1983) não encontraram grandes variações ao longo do ano para o peso testicular e para a proporção de parênquima testicular ocupado pelos tubos seminíferos mas observaram que os tubos seminíferos apresentavam um diâmetro superior em Julho, quando comparado com os restantes meses do ano. Esse aumento de diâmetro poderá resultar do aumento no número de células de Sertoli que, segundo JOHNSON e THOMPSON (1983) e JOHNSON *et al.*, (1991b) proliferam com o aproximar da estação de reprodução.

JOHNSON *et al.*, (1997) referem que, nos equinos, o maior impacto da sazão sobre a espermatogênese ocorre na espermatocitogênese. Parece que durante a estação de reprodução cada célula de Sertoli só pode acomodar 9 a 10 espermátides de uma determinada geração e 2,5 espermátocitos primários donde, todos os espermátocitos formados darão origem, virtualmente, a quatro espermatozoides. Durante a contra-

estação, 35% e 40% menos de espermatogónias A e B₂, respetivamente, são encontradas por grama de testículo (*vide* AMANN, 1993b, para revisão) mas cada uma das espermatogónias B₂ dá origem a dois espermatócitos primários donde o número destas células por grama de testis não difere entre as estações do ano. Contudo, na contra-estação, 23% do potencial de espermatócitos redondos não se formam, degenerando durante a meiose. De facto, segundo JOHNSON (1985), o efeito da sazão sobre a espermatogénese traduz-se na perda de células da linha germinal durante a meiose e na modulação sazonal no número de espermatogónias A, as quais são duas vezes superiores na estação de reprodução. A alteração durante a época de reprodução envolve fundamentalmente a perda de espermatogónias B₂ enquanto durante a contra estação envolve maioritariamente espermatogónias A₁₋₈ e A₃. Durante a época de reprodução, a perda das espermatogónias B₂ parece ser compensada pelo incremento significativo observado no número de espermatogónias A, em resultado do aumento no número de células de Sertoli; já durante a contra-estação, o número de células de Sertoli disponíveis não parece suficiente para suportar o desenvolvimento das espermatogónias A. O resultado global é o de que tanto na época de reprodução como na contra estação, somente 75% do potencial de espermatozóides é formado por grama de testis (PICKETT, 1993a). Contudo, devido à diminuição do peso testicular na contra estação, a produção diária de espermatozóides no garanhão apresenta-se inferior à da época de reprodução, com variações que vão desde os 20% nos animais jovens (4 a 5 anos) a 50% nos adultos (6 a 12 anos) (JOHNSON e THOMPSON, 1983).

2.2.3. MATURAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES

Após a sua libertação no lúmen dos túbulos seminíferos os espermatozóides transitam pelas vias espermáticas, um extenso sistema canalicular que desemboca na uretra, até serem, ou não, libertados na ejaculação (SIMÕES, 1984).

Os tubos seminíferos continuam-se pelos tubos retos que convergem para a rede testicular que deriva numa rede de pequenos ductos, os canais eferentes. É-lhes atribuída, para além da função de conduzir os espermatozóides mediante os movimentos vibráteis dos cílios e as contrações das suas paredes, uma função de absorção da maior

parte do fluido e proteínas provenientes da rede testicular (AMANN, 1993a) e a eventual fagocitose de espermatozóides anormais (GOYAL, 1982). No rato, o fluido dos tubos seminíferos contém um elevado conteúdo em sódio e cloro e um baixo teor de potássio sendo ligeiramente hipertónico quando comparado com o plasma sanguíneo (LEVINE e MARSH, 1971). Os estudos de JONES e JURD (1987) indicam que a absorção de fluido nos ductos eferentes é isoosmótica e a favor do gradiente, sugerindo o envolvimento de trocadores Na^+/H^+ e (*vide* HESS, 2001, para revisão), e é regulada pelos estrogénios produzidos nos testículos, sendo nos ductos eferentes que se encontra o maior número de recetores destas hormonas (HESS, 2000). O número de canais eferentes no testículo do garanhão varia segundo os autores entre 12 a 23, de acordo com Mobilio e Campus (1912) e 14 a 17, de acordo com Hemeida *et al.* (1978) (*apud* ILIO e HESS, 1994).

Os ductos eferentes fundem-se num só ducto, o ducto epididimário que se prolonga pelo canal do epidídimo. Este estende-se de um pólo ao outro do testículo (ao longo do seu bordo medial), prolongando-se pelo canal deferente, e forma numerosas flexuosidades que, se estendidas, atingiriam um comprimento de 70 a 85 m no garanhão. Sob o ponto de vista funcional, o epidídimo considera-se dividido em três regiões: a cabeça, localizada no pólo dorsal, um corpo, porção que medeia entre a cabeça e o pólo ventral da estrutura, esta última denominada de cauda do epidídimo. Estas regiões julgam-se afetas ao transporte, à concentração, à maturação (porção média ou corpo) e ao armazenamento (cauda) dos espermatozóides (SIMÕES, 1984).

Nos equinos, o trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo dura cerca de 12 dias (aproximadamente 3-4 dias na cabeça, 1-2 dia no corpo e 6 dias na cauda) e é nesta passagem que os espermatozóides que deixaram as gónadas sofrem eventos pós-testiculares, genericamente designados por maturação, que lhes garante não só o potencial para expressar mobilidade (*vide* YEUNG e COOPER, 2002, para revisão), apesar desta só se iniciar após diluição no plasma seminal, mas também a habilidade para fertilizar um oócito. A maior parte dos aspetos que se relacionam com a funcionalidade do epidídimo no garanhão não se encontra esclarecida, pelo que se assume que ocorram semelhanças relativamente aos outros mamíferos estudados como touros, carneiros e ratos (AMANN, 1993a). Fatores expressos no fluido que compõe o lúmen do epidídimo, como a concentração iónica e a secreção de proteínas, em resposta a estímulos de

androgénios, de acordo com CUASNICU *et al.* (1984a e 1984b) e ROBAIRE e VIGER (1995), associados a uma intensa atividade enzimática (BEU *et al.*, 2007), são apontados como os responsáveis não só pela estabilização dos componentes celulares e supressão da ativação precoce da mobilidade e da fusão do acrossoma, mas também por outras alterações que os espermatozóides aqui sofrem antes de serem libertados na ejaculação.

Tais eventos pós-testiculares caracterizam-se por aumentos na condensação da cromatina (aumento nas ligações dissulfito, entre resíduos -SH de cisteína das protaminas – DIAS, RETAMAL e TOBELLA, 2006 - que alteram ainda a dimensão do núcleo), por modificações na estrutura interna do acrossoma (redução do tamanho molecular de algumas proteínas, por remoção de glicosídeos e redistribuição de outras pelos diferentes domínios; para revisão *vide* OLSON *et al.* 2003 e YOSHINAGA e TOSHIMORI, 2003), por mudanças na composição dos fosfolípidos de membrana (LÓPEZ e SOUZA, 1991) com alterações ao rácio colesterol/fosfolípidos (Cl/PL) (SAEZ, OUVRIER e DREVET, 2011), pela glicosilação de proteínas integrais e/ou periféricas (formação do glicocálice; RETAMAL *et al.*, 2000a e 2000b) e pela eliminação e incorporação de proteínas, incluindo proteínas de glicosilfosfatidilinositol, (GPI; *vide* KIRCHHOFF e HALE, 1996, para revisão).

Contrariamente ao observado em ovinos e caprinos, em que o rácio Cl/PL na MP do espermatozóide aumenta, mas similarmente ao que ocorre em ratos, nos equinos, o conteúdo em colesterol diminui durante a passagem dos espermatozóides pelo epidídimo (revisto em CROSS, 1998) possivelmente devido à ação da proteína HE1/CTP (proteína que transfer colesterol) e da albumina, secretadas em grande quantidade na porção mediana e distal do epidídimo do garanhão (FOUCHÉCOURT *et al.*, 2000).

A incorporação de proteínas GPI parece ser mediada pelos epidídimosomas (ou exossomas, ARIENTI *et al.*, 1998), estruturas vesiculares secretadas pelo epitélio do epidídimo, ricas em esfingomiélinina e com uma razão Cl/PL elevada (REJRAJI *et al.*, 2006) e que transportam ainda outras proteínas secretadas sem sequências sinal (AUMÜLLER *et al.*, 1997; HERMO e JACKS, 2002), também incorporadas nos espermatozóides (FRENETTE *et al.*, 2002; SULLIVAN, FRENETTE e GIROUARD, 2007). De acordo com FOUCHÉCOURT *et al.* (2000), no garanhão, a cabeça do epidídimo é a região mais ativa em termos de secreção proteica (73% da secreção proteica), seguida do corpo (20,5%) e da cauda (6,5%). Os fatores envolvidos na interação do espermatozóide com o oolema são produzidos na

porção anterior do epidídimo enquanto as proteínas envolvidas na ligação do espermatozóide à zona pelúcida, assim como os fatores descapacitantes, são produzidos na região distal (COOPER, 1999; AITKEN *et al.*, 2007).

Alterações à morfologia normal da célula, quer ao nível do tamanho da cabeça como do enrolamento do flagelo (YEUNG *et al.*, 2009; JOSEPH *et al.*, 2010; COOPER, 2011) têm também sido reportadas em mamíferos como ocorrendo durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo. Isto parece estar relacionado com a capacidade das células responderem às variações na osmolalidade do fluido que lhes serve de suporte (DAMM e COOPER, 2010). A composição do fluido que entra no epidídimo, de conteúdo em sódio e cloro superior ao de potássio, começa a mudar na porção inicial do epidídimo devido à ação combinada da absorção de água (TURNER, 2008), Na^+ , Cl^- , HCO_3^- e da secreção de K^+ e proteínas pelas células do ducto, pelo que na porção caudal do epidídimo o conteúdo em sódio e cloro é baixo, o de potássio elevado e o pH ácido (HESS, 2001). Assim, quando os espermatozoides transitam pelo epidídimo fazem-no num ambiente de tonicidade crescente (JOHNSON e HOWARDS, 1977) e superior à da que encontram quando se misturam com os fluidos das glândulas anexas durante a ejaculação (no garanhão, a osmolalidade do plasma seminal situa-se entre 300 e 334 mOsm/Kg). *In vitro*, e quando sujeitos a condições hipo-osmóticas, os espermatozoides alteram rapidamente o seu volume em resultado do influxo de água, fenómeno observável pelo aspeto enrolado dos flagelos, já que a célula é muito compacta e contém pouco citoplasma, obstando a que se registem grandes alterações de volume (DREVIUS e ERIKSSON, 1966). Esta é aliás a base do teste hipo-osmótico (teste HOS) desenvolvido por JEYENDRAN *et al.* (1984). O fenómeno é reversível uma vez que o efluxo dos osmolitos que se segue permite à célula reduzir lentamente (da ordem de minutos) o seu volume, mecanismo este conhecido por RVD (Regulatory Volume Decrease; WEHNER *et al.*, 2003). A habilidade dos espermatozoides desenvolverem a capacidade de regular o seu volume (RV) parece ocorrer também durante a sua passagem pelo epidídimo, por incorporação de osmolitos orgânicos de baixo peso molecular (COOPER e YEUNG, 2006; COOPER, 2007) via mecanismo RVI (Regulatory Volume Increase; WEHNER *et al.*, 2003), em resposta ao ambiente de tonicidade crescente que vão encontrando (YEUNG, BARFIELD e COOPER, 2006; COOPER e YEUNG, 2007). O sorbitol é um osmolito orgânico que aparece em

elevadas quantidades no esperma do garanhão sem que os seus espermatozoides tenham capacidade de o metabolizar (AMANN e GRAHAM, 1993).

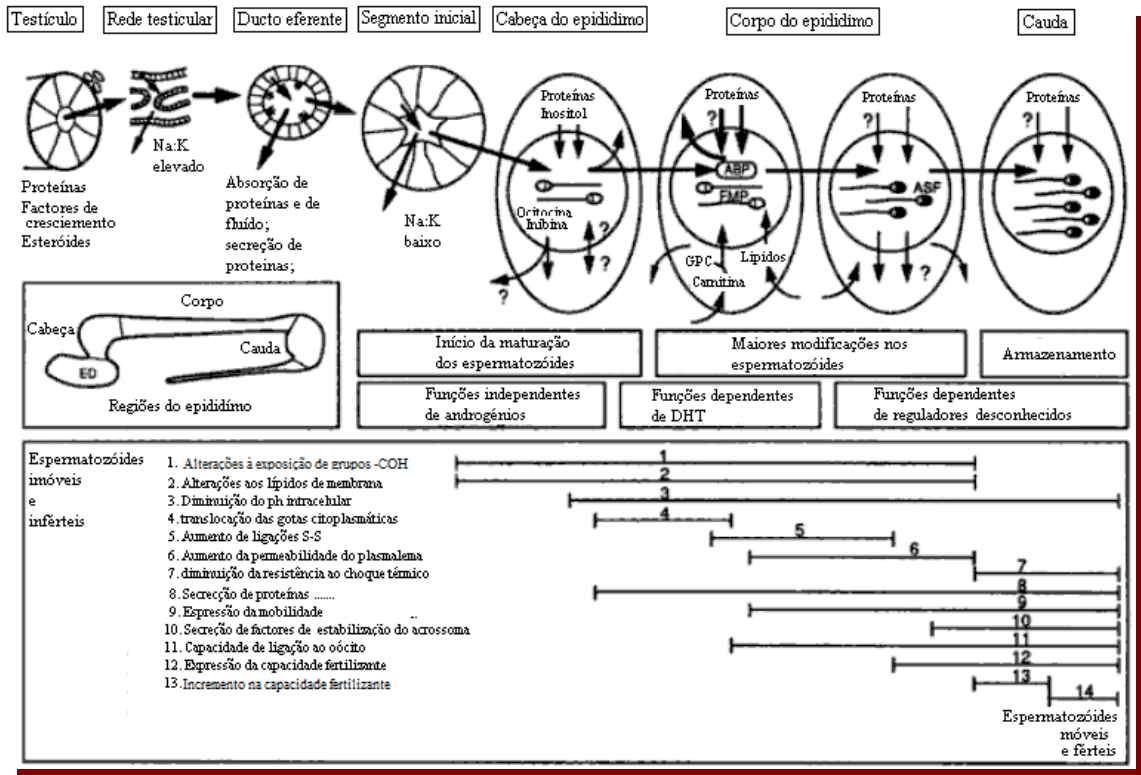


Figura 2.8. Sequência de eventos pós-testiculares e modificações sofridas pelos espermatozoides.

As moléculas presentes no fluido do lúmen do epidídimo incluem ABP (proteínas de ligação a androgénios), ASF (factores de estabilização do acrossoma), DHT (dihidrotestosterona), FMP (proteína da mobilidade progressiva) e GaitkanPC (glicerilfosforilcolina).

Adaptado de Amann (1993b).

A passagem dos espermatozoides pelo epidídimo caracteriza-se, assim, por uma remodelação constante da membrana plasmática (*vide* CUASNICU *et al.*, 2002, JONES, 2002, e CORNWALL, 2009, para revisão) em que os componentes lipídicos e proteicos são organizados possibilitando a formação de complexos de sinalização multimoleculares importantes nos eventos que levam à fertilização de um oócito, como veremos adiante. A figura 2.8 esquematiza a sequência de eventos pós-testiculares e as modificações sofridas pelos espermatozoides que lhe estão associadas.

Alguns autores consideram que é durante este trânsito que ocorre a migração das gotas citoplasmáticas (resíduos de citoplasma que permanecem ligados ao espermatozóide após a espermição), da base da cabeça para o término da peça intermédia seguida da sua eliminação (*vide* HERMO *et al.*, 2010b, para revisão). Contudo, nem todos os espermatozóides parecem capazes de descartar a gota citoplasmática distal sendo que, nalguns casos, ocorre uma curvatura ao nível do ânulo, ficando a PP dobrada (BONET *et al.*, 1992), condição que se reflete sobre os índices reprodutivos uma vez que, nestas condições, a mobilidade da célula é afetada.

Em algumas espécies, estudos sugerem ainda um papel do epidídimo na remoção seletiva de espermatozóides malformados uma vez que o número de células com defeitos primários diminui ao longo das suas diferentes porções (RAMAMOYANA, BANE e GUSTAFSSON, 1980; AXNÉR, STROM e LINDE-FORSBERG, 1999; CHENOWETH *et al.*, 2000). Contudo, não há unanimidade na literatura relativamente ao mecanismo pelo qual esses espermatozóides são eliminados. Alguns estudos estruturais evidenciam fagocitose de espermatozóides envolvendo as principais células que revestem a região da cauda do epidídimo no garanhão (*vide* GALLEGOS-AVILA *et al.*, 2010) enquanto outros atribuem a função de remover espermatozóides mal formados à via da ubiquitinação diferencial (SUTOVSKY *et al.*, 2001).

O canal do epidídimo prolonga-se pelo ducto deferente e estende-se até à uretra, onde desemboca. Na sua porção terminal apresenta um segmento dilatado de natureza glandular, a ampola, que no cavalo exibe um comprimento de 13 a 20 cm e um diâmetro de 1,8 a 2,5 cm (SIMÕES, 1984). As secreções desta estrutura contribuem grandemente para o volume de ejaculado no macho equino e apresentam-se ricas em ergotioneína, um agente antioxidante, que se apresenta em maior concentração nos ejaculados durante a Primavera e Outono (0,03-1,0mg/ml; DAVIS-MOREL, 1999). Por este motivo a ampola é considerada por alguns autores como uma glândula anexa sendo as suas secreções associadas à fração pré-espermática. A ampola é também considerada como um reservatório de espermatozóides superior ao da cauda do epidídimo.

2.2.4. O PLASMA SEMINAL: CONTRIBUIÇÃO DAS GLÂNDULAS ANEXAS AO APARELHO REPRODUTOR

O plasma seminal, a fração líquida do esperma, representa cerca de 90% do volume final de um ejaculado e é constituído maioritariamente pelas secreções das glândulas anexas ao aparelho reprodutor. As glândulas vesiculares, a próstata e as glândulas bulbo-uretrais encontram-se presentes no garanhão e tal como a ampola, a sua função depende da presença de androgénios.

No garanhão o esperma é expelido em várias ondas ejaculatórias, o que permite diferenciar 5 a 10 frações, física e quimicamente distintas, durante um período de 8 a 10 segundos (TISCHNER, KOSINIAK e BIELAŃSKI, 1974; KOSINIAK, 1975). A primeira fração, ou pré-espermática, é expelida antes das primeiras contrações penil-urtrais. Apresenta-se de aparência aquoso, rica em cloro e ácido láctico (12mg/100ml, segundo MANN, MINOTAKIS e POLGE, 1963) e parece resultar da atividade das glândulas bulbo-uretrais, ou de Cowper (MAGISTRINI *et al.*, 2000), uma vez que estas apresentam aumentos de volume com a estimulação do macho, nomeadamente com o aumento dos falsos cavalgamentos pré-coitais (WEBER *et al.*, 1990). A segunda fração do sémen, composta por fluido libertado em vários jactos, é rica em espermatozóides, ergotioneina (proveniente da ampola) e glicerilfosforilcolina (provenientes do epidídimo; DAVIS-MOREL, 1999) mas a maior parte das secreções presentes nesta fração provém da ampola e da próstata, cuja atividade se inicia antes da ejaculação e se prolonga ainda pelas primeiras contrações penil-uretrais (WEBER e WOODS, 1993). No garanhão, o fluido da ampola não contém frutose. À próstata é também atribuída a secreção de vesículas ricas em colesterol, proteínas e cálcio, denominadas prostasomas, similarmente ao que acontece em humanos (RONQUIST e BRODY, 1985; ARVIDSON *et al.*, 1989). Contudo, quando comparado com os prostasomas do esperma humano, no esperma equino os prostasomas apresentam maior fluidez, devido ao menor conteúdo em ácidos gordos saturados, e a sua presença ocorre em muito menor expressão (ARIENTI *et al.*, 1998, MINELLI *et al.*, 1998, 2001; SOSTARIC *et al.*, 2008) o que se apresenta coerente se atendermos a que a deposição do sémen nas vias genitais da égua se faz no útero, contrariamente aos humanos, em que o sémen é depositado no fundo vaginal. Assim, o papel fisiológico apontado aos prostasomas em humanos e que se pensa ser o de interagir com os espermatozóides,

protegendo-os das condições hipotónicas e acídicas que encontram no ambiente vaginal (*vide* BURDEN *et al.*, 2006), não se levanta no caso dos equinos pois os prostasomas são imóveis e os SPZ rapidamente deixam para trás o plasma seminal na sua jornada pelas trompas uterinas.

WEBER e WOODS (1993) só observaram movimento de fluidos nos ductos excorrentes das glândulas vesiculares após a cessação da atividade prostática e em garanhões cujos ejaculados apresentavam quantidades apreciáveis de porção gelatinosa. As glândulas vesiculares parecem ser, assim, a principal fonte de gel, última fração do ejaculado, presente nos espermatozoides de alguns garanhões e de pH mais elevado do que o do espermatozóide livre de gel (PICKET *et al.*, 1976), provavelmente devido à presença de ácido láctico (MANN, 1964). Uma vez que a atividade das glândulas vesiculares depende dos níveis de testosterona, a contribuição desta glândula para a porção gelatinosa aumenta durante a estação de reprodução (TIBARY, 2006).

Contrariamente ao espermatozóide de touros ou carneiros, o espermatozóide equino praticamente não contém frutose (0,02 mg/ml) mas sim glicose (0,82 mg/ml) (DAVIS-MOREL, 1999). O volume e composição do plasma seminal (para revisão ver TOPFER-PETERSEN *et al.*, 2005 e KARESKOSKI e KATILA, 2008) varia grandemente entre garanhões e entre ejaculados do mesmo garanhão (MANN *et al.*, 1956). Varia ainda com a idade do macho (SQUIRES, PICKET e AMANN, 1979), com a estação do ano, com a raça e com a frequência de colheitas (DOWSETT e PATTIE, 1987; PICKETT *et al.*, 1975). Estando as glândulas anexas sob controlo hormonal, o volume do plasma seminal apresenta-se superior na estação de reprodução (PICKETT, FAULKNER e VOSS, 1975; PICKET *et al.*, 1976).

O papel do plasma seminal sobre a qualidade dos espermatozoides equinos é controverso, nomeadamente porque a maioria dos estudos se centra na sua ação sobre espermatozoides conservados, quer por refrigeração quer por congelação e porque a variedade de métodos utilizados é tanta que dificulta a interpretação de resultados (KARESKOSKI e KATILA, 2008). No entanto, há unanimidade quanto à sua função de desencadear a mobilidade espermática. Os espermatozoides presentes no epidídimo do garanhão são imóveis, mas férteis e expressam mobilidade após tratamento com plasma seminal (BRAUN *et al.* 1994), resultando em melhores taxas de fertilidade (HEISE, THOMPSON e GERBER *et al.*, 2010). Contudo, AURICH *et al.* (1996) sugerem que a

composição individual do plasma seminal afeta a capacidade dos espermatozóides suportarem as baixas temperaturas de conservação (congelamento) sendo que MOORE, SQUIRES e GRAHAM (2005) verificaram ter o plasma seminal um efeito deletério sobre os espermatozóides sujeitos a congelamento. No entanto, e apesar de o conteúdo em proteínas ser baixo (20-60mg/mL), algumas delas têm revelado correlacionar-se com a fertilidade dos garanhões (*vide* TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2006, para revisão). TROEDSSON *et al.* (2006) atribuem a componentes do PS um papel modulador na supressão de endometrites desencadeadas pela cobertura/IA na égua permitindo, assim, a sobrevivência dos SPZ num ambiente que, de outra forma, lhes seria hostil.

2.3. O APARELHO COPULADOR E A EJACULAÇÃO

O pênis (ou verga) do garanhão, do tipo musculo-cavernoso, é responsável pela deposição do sémen nas vias genitais femininas durante a cópula. Apresenta, quando não erético, um comprimento de 50 cm e um diâmetro de 2,5 a 6 cm com a extremidade distal 15 a 20 cm livre no prepúcio. Quando ereto, o pênis duplica o seu comprimento e a sua espessura e a glândula aumenta 3 a 4 vezes. Anatomicamente, é constituído pelo corpo cavernoso, a uretra extra-pélvica e o corpo esponjoso da glândula.

O comportamento copulador inclui a monta (encabritamento), inserção do pênis na vagina, ejaculação e desmonta. Todo o processo que leva à ereção, emissão e ejaculação está sob dependência do sistema nervoso central autónomo. Impulsos simpáticos condicionam o movimento e a deposição, na uretra pélvica, dos espermatozóides e dos fluidos dos ductos deferentes e da cauda do epidídimo, assim como dos fluidos das glândulas acessórias (BENSON, 1988).

Na monta natural, a deposição do esperma efectua-se na porção caudal do útero da égua, através do canal cervical relaxado. As distintas frações do esperma são encaminhadas através da uretra pélvica em resultado das contrações rítmicas dos músculos bulboesponjoso e ischiocavernoso (LITTLE e HOLYOAK, 1992). Como referido acima, as três primeiras frações do sémen são ricas em espermatozóides (80% do total) e secreções ampulares (TISCHNER, KOSINIAK e BIELAŃSKI, 1974). A fração gelatinosa do

sémen, produto das glândulas vesiculares, quando presente, é libertada nas últimas frações do sémen (PICKET e VOSS, 1974). As ondas ejaculatórias, controladas por impulsos parassimpáticos (LOPATE, LE BLANC e KNOTTENBELT, 2003) são concomitantes com movimentos dorso-ventrais da cauda do garanhão (SIMÕES, 1984).

No geral, o macho equino adapta-se facilmente aos diversos sistemas e práticas de manejo reprodutivo sendo que, com um bom manejo e um bom estímulo, se mantém constante o seu comportamento sexual ao longo de toda a época de cobrição (TIBRY, 2006). Quando na presença da égua em cio, interage rapidamente com ela (cortejamento), atinge a ereção passados 2 minutos e está pronto a se encabritar 5-10 segundos após a ereção. Em média, ao fim de seis a oito movimentos rítmicos da pélvis ocorre a ejaculação. Falsos cavalgamentos pré-coitais são típicos no macho equino e coincidem frequentemente com um certo grau de exteriorização do pénis, senão mesmo com uma ereção completa (SIMÕES, 1984).

2.4. EFICIÊNCIA DA ESPERMATOGÉNESE

Num garanhão com espermatogénese normal, um número considerável de células da linha germinal (entre 25-75%, segundo CLERMONT, 1962 e HUCKINS, 1978) morre no decurso da espermatogénese donde o número de espermatozóides que teoricamente poderia ser produzido por grama de tecido testicular nunca é atingido. Esta ineficiência da espermatogénese é resultado da sobre-produção de células da linha germinal para além daquela que as células de Sertoli têm capacidade de manter (JOHNSON, 1985).

A espermatogénese é controlada por um complexo sistema de sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos que assentam na correta funcionalidade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. As hormonas e moléculas produzidas e secretadas favorecem, durante todo o processo espermatogénico, a comunicação entre as células de Leydig, Sertoli e da linha germinal, bem como entre elas. A testosterona assume-se como a principal hormona a governar a espermatogénese em sinergia com a FSH sendo cada uma delas mais relevante consoante a fase do ciclo celular e o tipo de célula que

expressa, à superfície, maior ou menor número de recetores destas hormonas. Nos machos de espécies de reprodução sazonal, a redução da atividade das gónodas coincide com baixos níveis de gonadotropinas circulantes e de produção de testosterona. Estudos em ratos indicam que uma consequência da deficiência nos níveis de testosterona é a indução de apoptose nos espermatócitos em fase preleplóteno e paquiteno nos estadios VIII. Já uma deficiência de FSH afeta as espermatogónias A₃–A₄ (associada aos estadios XIV–I). O controlo neuroendócrino da apoptose testicular em reprodutores sazonais tem sido evidenciado nos estudos de FURUTA *et al.*, 1994 (*Phodopus sungorus*), de YOUNG *et al.*, 2001 (*Peromyscus leucopus*) e de DADHICH *et al.*, 2010 (*Talpa occidentalis*), que sugerem que as variações no fotoperíodo alteram a extensão da apoptose das células germinais, modulando a regressão e/ou a recrudescência testicular.

Fatores intrínsecos ao epitélio seminífero responsáveis pela renovação das células primordiais controlam a espermatogénese ao nível parácrino. Algumas helicases de RNA reguladas por gonadotropinas e proteínas de reparação do DNA, como Dmc1 e ligases de ubiquitina E3, assim como reguladores de apoptose (Bax, Bcl-2, FasR/FasL e algumas caspases) estão envolvidas no controlo da qualidade da espermatogénese, participando nos mecanismos que levam à eliminação do excesso de células, bem como do de células defeituosas (*vide* SUTOVSKY e MANANDHAR, 2006, para revisão).

2.4.1. APOPTOSE

A apoptose, ou morte celular programada, tem sido considerada como o mecanismo primário de remoção de células da linha germinal do epitélio seminífero, sendo ainda necessária para o curso normal da espermatogénese em mamíferos (RODRIGUEZ *et al.*, 1997; RUSSELL *et al.*, 2002) e tem sido descrita nos testículos de uma variedade de espécies estudadas (SANTOS *et al.*, 1999; WEINBAUER *et al.*, 2001; BLANCO-RODRIGUEZ, 2002a, 2002b; LUE *et al.*, 2002) incluindo os equinos (HENINGER *et al.*, 2004).

A apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e crescimento, como um mecanismo de manutenção da homeostasia celular nos tecidos do corpo. Caracteriza-se por modificações morfológicas específicas mediadas por mecanismos

bioquímicos dependentes de energia. Uma vez desencadeado o processo apoptótico, o citoplasma adensa, com conseqüente redução do volume celular e o ADN nuclear condensa grandemente. Os contornos nucleares e celulares tornam-se irregulares, o núcleo picnótico colapsa e a célula sofre um extenso processo de vesiculação. Estas vesículas englobam porções do citoplasma, organelos e/ou os fragmentos nucleares, e acabam por se dispersar sob a forma de corpos apoptóticos que são subsequentemente fagocitados por macrófagos, células parenquimatosas ou neoplásicas, e degradados nos fagolisossomas. Sob o ponto de vista bioquímico, o processo apoptótico caracteriza-se pela clivagem de proteínas do citoesqueleto e do citoplasma, mediada por caspases, fragmentação do ADN nuclear em porções com cerca de 200pb (por ação de endonucleases dependentes de cálcio e magnésio) (WYLLIE, 1980) e expressão, à superfície da célula, de marcadores, como a fosfatidilseina (PS) que permite o reconhecimento dos corpos apoptóticos pelas células adjacentes e a sua fagocitose subsequente (para revisão *vide* ELMORE, 2007).

Aparentemente, existem três vias de indução da apoptose nas células de mamíferos: a via intrínseca, ou mitocondrial, que envolve a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT; RASOLA e BERNARDI, 2007) com perda do potencial transmembranar e a libertação do citocromo *c*, do espaço intermembranar das mitocôndrias, para o citosol, seguido da ativação sequencial de caspases-9 e -3; a via extrínseca (ALBECK *et al.*, 2008), ou dos recetores de “morte”, que é ativada por ligação de ligandos, o TNF- α e o FasL, que ativam a caspase 8; e a via da perforina/granzima, que envolve linfócitos T citotóxicos. Estas vias podem ser iniciadas por uma variedade de estímulos ou condições, tanto fisiológicas como patológicas, incluindo o calor (SINHA-HIKIM *et al.*, 2003), radiações, agentes citotóxicos e *stresse* oxidativo, e convergem para o mesmo fim. Contudo, a via intrínseca e a extrínseca determinam a morte celular por fragmentação das cadeias duplas do ADN enquanto a via da granzima determina danos no ADN em cadeia simples.

Ao nascimento, o testículo do cavalo contém somente células de suporte indiferenciadas e gonócitos (CLEMMONS, THOMPSON JOHNSON e, 1995) que se mantêm, até à puberdade, em túbulos seminíferos rudimentares. À puberdade, as células de suporte indiferenciadas começam a diferenciar-se em células de Sertoli e os gonócitos

diferenciam-se em espermatogónias. Com o progresso normal da puberdade, as espermatogónias (A_s ou A_0) vão-se diferenciando nas várias formas (A_{1-4} e B_{1-2}) sendo que, umas vão mantendo a reserva de espermatogónias e outras vão dando origem às gerações seguintes de células da linha germinal (*vide* AMANN, 1993b, para revisão). Há, assim, uma primeira onda da espermatogénese correspondente à diferenciação dos gonócitos e espermatogónias e parece que é nesta fase que ocorre uma onda apoptótica importante para manter uma população equilibrada de espermatogónias/células de Sertoli, de forma que a espermatogénese madura se desenrole normalmente (RODRIGUEZ *et al.*, 1997). A partir da maturidade sexual, a homeostasia celular/tecidual testicular parece ser mantida ainda por apoptose das células da linha germinal nalguns estádios da sua diferenciação. A via extrínseca Fas/FasL assim como a via mitocondrial parecem ser as vias moduladoras da apoptose nas células da linha germinal em mamíferos (PAREEK *et al.*, 2007), mantendo-se o equilíbrio entre a produção espermática por eliminação das células excedentárias e das não apropriadas à sua função.

Casos de infertilidade idiopática em humanos têm sido associados a uma taxa elevada de apoptose nas células germinais assim como à presença, nos ejaculados, de espermatozóides expressando marcadores de apoptose (WENG *et al.*, 2002; STEGER *et al.*, 2008). Nos equinos, alguns autores mencionam alterações em espermatozóides sujeitos a congelação, similares às que ocorrem durante a apoptose em células somáticas, (ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2008; BALL, 2008; BRUM, SABEUR e BALL *et al.*, 2008; ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2009a; ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2010) e relacionam-nas com os fracos índices de prenhez obtidos. Tais estudos utilizam marcadores de apoptose tais como proteínas que ligam caspases ativas ou mesmo ativadores destas proteínas, a Anexina-V, uma proteína que liga fosfatidilserina (PS) translocada para o folheto externo da MP durante a apoptose, e o ensaio do TUNEL, método que emprega a incorporação enzimática de nucleotídeos associados a fluorocromos, em regiões 3'-OH do ADN fragmentado de cadeia simples ou dupla, o que tem acalentado a ideia de que a apoptose ocorre em espermatozóides maduros. Contudo, e tal como para a generalidade dos mamíferos estudados, incluindo humanos, ainda não é claro se essas marcações são sinais de apoptose iniciada após ejaculação, se resultado de um processo apoptótico que foi interrompido antes da ejaculação (*vide* SAKKAS *et al.*, 1999 e RICHBURG, 2000, para revisão) ou, simplesmente, alterações que a célula sofre induzidas pelas condições

experimentais, como as baixas temperaturas de congelação (BAUMBER *et al.*, 2003a ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2009b) ou os meios de incubação utilizados nos estudos *in vitro* (BALL, 2008), e que podem não traduzir mecanismos apoptóticos. Os estudos dedicados à apoptose nas células somáticas não deixam dúvidas quanto ao envolvimento das caspases nas vias de morte celular programada mais comuns contudo, estudos recentes evidenciam que estas proteínas estão também envolvidas em outros eventos celulares importantes não apoptóticos, como a regulação do ciclo celular e a proliferação e diferenciação celular (SCHWERK e SCHULZE-OSTHOFF, 2003; CHOWDHURY *et al.*, 2008), fenómenos intrínsecos ao tecido testicular e à sua função.

A exposição de PS ao folheto externo da membrana em espermatozóides sujeitos a conservação a baixas temperaturas (GUTHRIE e WELCH, 2005) parece traduzir mais danos na membrana devidos ao frio do que um mecanismo apoptótico. O processo de congelação-descongelação é acompanhado de uma sobre-produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) com consequências para a MP, traduzidas por aumentos na destabilização das membranas e por remodelações à distribuição dos fosfolípidos, com exposição de PS no folheto externo (THOMAS, MEYERS e BALL, 2006). A(s) via(s) de sinalização subjacente(s) ao desencadear destes processos parece(m) diferir da que é ativada quando os espermatozóides ejaculados mantidos *in vitro*, sob condições capacitantes, expõem PS no folheto externo da MP, (de VRIES *et al.*, 2003; GADELLA e HARRISON, 2002; THOMAS, MEYERS e BALL, 2006). Com efeito, a maior parte dos meios de incubação contém albumina e bicarbonato; a albumina medeia o efluxo de colesterol da MP e o bicarbonato ativa uma via de sinalização envolvendo adenil ciclases e proteínas cinases, característica da capacitação, fenómeno que se caracteriza também pela exposição de PS no folheto externo da MP (VISCONTI *et al.* 2002), como veremos adiante.

Segundo LACHAUD *et al.* (2004) e MURATORI *et al.* (2000), a presença, num ejaculado, de espermatozóides com ADN fragmentado deve ser tomada como um marcador de funcionalidade deficiente em vez de um índice de apoptose uma vez que a presença de ADN fragmentado não significa que esses espermatozóides estivessem forçosamente destinadas a morrer. De facto, a fragmentação de ADN, detetada pelo TUNEL, pode resultar de uma incompleta maturação das células devido a falhas na compactação da cromatina, quer por distúrbios na atividade da topoisomerase II

(McPHERSON e LONGO, 1993; SAILER *et al.*, 1995), durante a substituição da maior parte das histonas pelas protaminas (SAKKAS *et al.*, 2002; LABERGE e BOISSONNEAULT, 2005) quer por deficiência nos níveis de protaminas (AOKI *et al.*, 2005).

As protaminas condensam de tal forma a cromatina, mantendo-a estável e transcripcionalmente inativa, que a tornam resistente à sonicação (TATENO *et al.*, 2000) e até às elevadas temperaturas (YANAGIDA *et al.*, 1991), fatores estes que destroem o ADN das células somáticas. AITKEN *et al.* (2011) referem que o elevado grau de compactação da cromatina nos espermatozóides previne a ocorrência de quebras no ADN por ação de caspases. Contudo, outros estudos têm evidenciado que este elevado grau de compactação do ADN não o torna insuscetível de sofrer danos por ação de outros mecanismos, como a ação de ROS (AITKEN *et al.*, 1998; AITKEN, BAKER e SAWYER., 2003; MURATORI *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003). Como nem todas as histonas são substituídas pelas protaminas e as que permanecem parecem situar-se entre os toroides, nas regiões de ligação do ADN à matriz (MARS) (WYKES e KRAWETZ, 2003), as porções de ADN ligadas a histonas constituem boas candidatas a sofrer danos oxidativos (*vide* SHAMAN e WARD, 2006, para revisão). Nos espermatozóides sujeitos a congelação, os níveis de peroxidação lipídica induzidos por ROS aumentam consideravelmente quando comparados com os medidos no sémen antes da congelação (NEILD *et al.*, 2005) e segundo ORTEGA-FERRUSOLA *et al.* (2009a), correlacionam-se significativamente com atividade de caspases. Contudo, de VRIES *et al.* (2003) verificou que a presença, no esperma humano, de caspases ativas ou inativas está associada a contaminantes celulares ou a espermatozóides com gotas citoplasmáticas e nunca a espermatozóides maduros. PAASCH *et al.* (2003) observaram atividade de caspases em SPZ humanos, quer de dadores quer de pacientes, sendo que nos dadores a atividade das caspases era detetada na região pós-acrossómica enquanto que na de pacientes, se observava nas gotas citoplasmáticas.

Em humanos, e apesar de se verificar a existência de uma relação entre diversos marcadores de apoptose, presentes em espermatozóides ejaculados e a infertilidade, alguns estudos têm mostrado que esses marcadores não coexistem nas mesmas células (SAKKAS *et al.*, 2002; McVICAR *et al.*, 2004) sugerindo que a presença de moléculas das vias apoptóticas não acarreta a morte programada da célula. MURATORI *et*

al. (2000) são de opinião que a presença de ADN fragmentado nos espermatozóides ejaculados não corresponde ao fenómeno apoptótico apesar de muitos trabalhos evidenciarem que uma variedade de estímulos, *in vitro*, ativam vias apoptóticas nos espermatozóides maduros (*vide* AITKEN e KOPPERS, 2010, pra revisão).

Os mecanismos envolvidos no desencadear da apoptose das células germinais parecem altamente preservados nos mamíferos e apoiam a ideia de que a apoptose não ocorre indiferenciadamente nos diferentes estádios celulares mas está bem demarcada às fases de transição entre espermatogónias e espermatócitos. No rato, as espermatogónias A₂-A₄ (estádios XII, XIV e I, respetivamente) são as que mais se observam marcadas com o TUNEL, seguidas dos espermatócitos em metáfase (estádios XIV) e, em menor extensão na fase zigoteno (estádio XII) e na transição zigoteno-paquiteno (estádios XIV-I) (LEVY e SEIFER-AKNIN, 2001).

No que concerne à espécie equina, o estudo de HENINGER *et al.* (2004) revelou que espermatogónias e espermatídeos constituem os tipos celulares que mais marcam com o ensaio do TUNEL enquanto espermatídeos redondos e alongados aparecem em muito menor extensão. Em ganhões com espermatogénese normal, são os estádios IV, V e VI que predominam enquanto nos ganhões com espermatogénese anormal são os IV, V, VI e VIII. Estes resultados são consistentes com os estádios em que picos de mitose e de meiose ocorrem durante o desenvolvimento celular (BLANCO-RODRIGUEZ, 1998) sugerindo que há fases da diferenciação em que determinados tipos celulares são mais suscetíveis à apoptose, similarmente ao reportado para outras espécies de mamíferos. Aparentemente, é como se existisse uma linha de fronteira a partir da qual a apoptose não ocorre e as células que são marcadas para morrer nessa fronteira escapam à morte mas apresentam os marcadores de apoptose quando ejaculadas e estão relacionadas com pior qualidade seminal. Num estudo publicado em 1997, BLANCHARD e JOHNSON (1997b) já associavam a degeneração das células da linha germinal no ganhão, não só a menores produções espermáticas mas também à pior qualidade do esperma. HENINGER *et al.* (2004) também constataram uma taxa mais elevada de apoptose nas células germinais em ganhões com reduzida qualidade espermática tendo observado que as células da linha germinal que apresentavam morfologia normal nunca apareciam marcadas pelo método TUNEL. De acordo com de VRIES *et al.* (2003) não há

relatos da presença de espermatozóides maduros a sofrerem apoptose nos ejaculados de mamíferos. MORTE *et al.* (2007) não encontraram valores significativos de espermatozóides marcados pelo método do TUNEL no esperma de garanhões. HENDRICKS e HANSEN (2009) comprovaram que os espermatozóides equinos ejaculados resistem à indução de apoptose por agentes como o calor e a carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), um agente despolarizador da mitocôndria.

Para além do método TUNEL, outras metodologias foram desenvolvidas para aceder à integridade do ADN, incluindo ISNT (*in situ* nick translation; deteta quebras no ADN de cadeia simples), os ensaio do “COMET” (deteta quebras no ADN de cadeia simples e dupla) e do SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay, desenvolvido por Evenson em 1980, deteta quebras no ADN de cadeia simples e dupla nas regiões entre os toróides) (*vide* SHAMAN e WARD, 2006, para revisão) e o teste de dispersão da cromatina (SCDT, Sperm Chromatin Dispersion Test). Este último baseia-se no facto dos espermatozóides com ADN fragmentado não mostrarem o halo característico de dispersão do ADN típico do observado em espermatozóides com ADN integro após desnaturação ácida (FERNÁNDEZ *et al.*, 2003). De acordo com SHAMAN e WARD (2006) os métodos TUNEL, SCSA, e *in situ* translation detetam danos ao ADN nas regiões dos toróides enquanto o ensaio do “COMET” deteta muito mais quebras no ADN, mas sem qualquer distinção relativa à sua localização cromossómica.

2.4.2. UBIQUITINAÇÃO DIFERENCIAL

O extenso processo de remodelação das células, durante a espermatogénese e a maturação, requer sincronização entre a formação de estruturas acessórias transitórias ou permanentes e a remodelação, redução ou degradação de determinados peptídeos e organelos. Nas células somáticas, o sistema proteolítico dependente da ubiquitina assume-se como um processo catabólico fundamental na regulação de processos fisiológicos como o ciclo celular, a degradação de organelos, as vias de transdução de sinal, entre outros (para revisão *vide* GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002). A ubiquitina é um pequeno peptídeo de 8,5 kDa que se apresenta evolutivamente conservada entre os eucariotas. Liga covalentemente outras proteínas marcando-as para degradação

proteolítica pelo 26S proteosoma, um complexo proteico lábil das vias proteolíticas dependentes de ATP (para revisão *vide* COUX, TANAKA e GOLDBERG, 1996). A ubiquitina apresenta distribuição ubíqua sendo que, recentemente, se lhe atribui função não-proteolítica devido ao seu envolvimento em vias de tráfico vesicular e regulação na modificação de histonas (*vide* NATH e SHADAN, 2009, para revisão do sistema da ubiquitina).

A degradação de proteínas por via do sistema ubiquitina/proteosoma envolve primeiro a ligação de múltiplas unidades de ubiquitina ao substrato, seguida da degradação da proteína, assim marcada, pelo complexo 26S proteosoma e regeneração da ubiquitina. A conjugação da ubiquitina ao substrato proteico procede por ação das enzimas E1, E2 e E3; a E1 ativa uma molécula de ubiquitina, a E2 transfere a ubiquitina ativada, por transtilação, e conjuga-a ao substrato e a E3 promove a ligação da ubiquitina ao substrato (HOCHSTRASER, 2009). A molécula de ubiquitina é transferida para um grupo amino (-NH₂) de um resíduo de lisina do substrato podendo, contudo, conjugar-se a um grupo amino terminal (NH₂-). A cadeia poliubiquitilada é, assim, sintetizada por sucessivas adições de ubiquitinas ativadas a resíduos internos de lisina do substrato (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002). Esta cadeia é reconhecida pelo complexo 26S proteasome (Figura 2.9).

O 26S proteosoma é expresso de forma proeminente nos testículos (*vide* SUTOVSKY, 2003, para revisão) pelo que se considera que o sistema proteolítico dependente da ubiquitina é central na espermatogénese (ROEST *et al.*, 1996; BEBINGTON, DOHEERTY e FLEMING, 2001) tanto mais que se têm verificado elevados níveis de ubiquitinação nas células germinais durante a primeira onda espermatogénica (HERMO *et al.*, 2010c). Na espermatogénese madura e nos diferentes estádios das células da linha germinal tem-se observado ainda a expressão da ubiquitina e de subunidades do proteosoma, nomeadamente durante a formação do axonema do espermatozóide (ESCALIER *et al.*, 2003) e durante a fase de alongação dos espermátides, nomeadamente ao nível das mitocôndrias (SUTOVSKI *et al.*, 1999) e das histonas (BAARENS, ROEST e GROOTEGED, 1999), sugerindo-se o envolvimento da ubiquitina na destabilização da cromatina durante a substituição das histonas pelas protaminas. O envolvimento da maquinaria do proteosoma nas mitocôndrias durante a espermatogénese parece assegurar não só a destruição de

grande parte delas durante a biogênese da célula mas também a sua marcação para serem destruídas posteriormente, após a fertilização (SUTOVSKY *et al.*, 2003). Diversos estudos (WOJCIK *et al.* 2000; MORALES *et al.* 2003; PIZARRO *et al.*, 2004; MORALES *et al.* 2009) têm demonstrado a presença, em espermatozóides de mamíferos, do complexo 26S proteosoma, relacionando-o com alguns dos eventos envolvidos na capacitação, na reação do acrossoma e na ligação do espermatozóide à zona pelúcida do oócito (*vide* SUTOVSKY, 2011, para revisão).

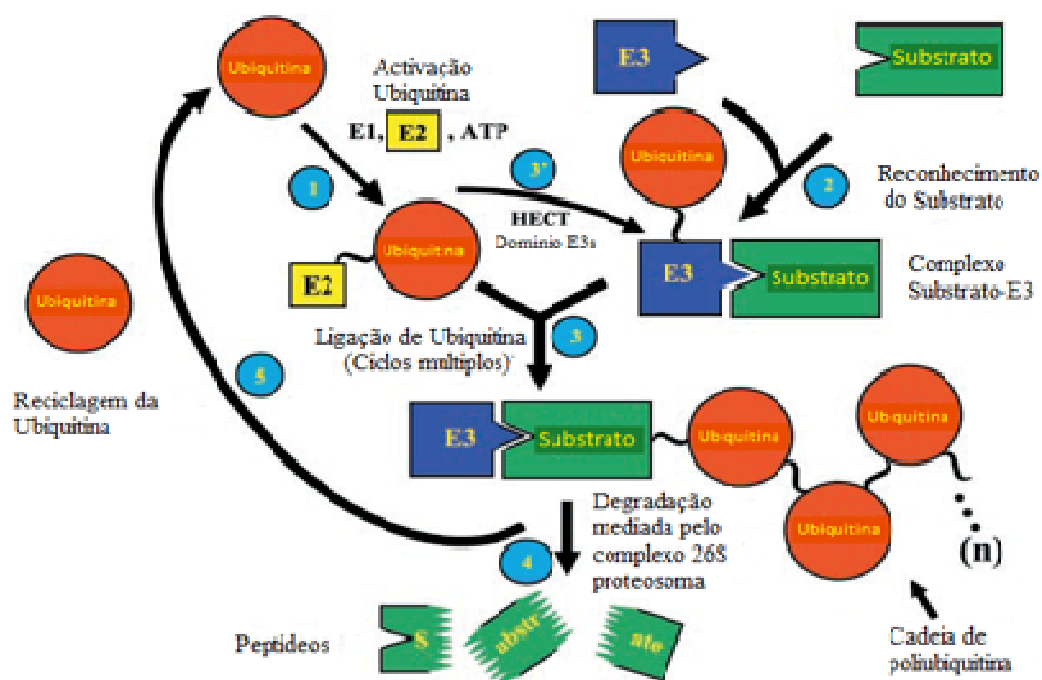


Figura 2.9. A via proteolítica da ubiquitina.

(1) Ativação da ubiquitina pela enzima E1, E2 e ATP. (2) Ligação do substrato proteico à proteína ubiquitina ligase E3. (3) Múltiplos ciclos de conjugação (n) da ubiquitina ao substrato e síntese da cadeia poliubiquitina. (4) Degradação do substrato marcado pelo complexo 26 S proteosoma com liberação de pequenos peptídeos. (5) A ubiquitina é reciclada via atividade das enzimas deubiquitinantes (DUBs). Adaptado de GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002

Os estudos de sutovsky e colaboradores mostraram que os espermatozóides de mamíferos com alterações visíveis, ou não, à morfologia normal exibiam, à superfície, padrões de marcação com anti-corpos anti-ubiquitina (SUTOVSKY *et al.*, 2000), tendo os níveis de espermatozóides ubiquitinados presentes num ejaculado sido relacionados com casos de infertilidade, assim como com a baixa qualidade dos espermatozóides, não só em

humanos (SUTOVSKY, TERADA e SCHATTEN, 2001) mas também em animais de produção como bovinos (BASKA *et al.*, 2008), suínos (KUSTER, HESS e ALTHOUSE, 2004) e equinos (GAMBOA e RAMALHO-SANTOS, 2005; SUTOVSKY *et al.*, 2003). A ubiquitina, presente no fluido do epidídimo (SUTOVSKY *et al.*, 2001; HERMO e JACKS, 2002; BASKA *et al.*, 2008), marca diferencialmente os espermatozóides à sua passagem (SUTOVSKY, TERADA e SCHATTEN, 2001; SUTOVSKY, HAUSER e SUTOVSKY, 2004).

Um padrão sazonal de ubiquitinação dos espermatozóides equinos foi sugerido por SUTOVSKY *et al.*, (2003) assim como uma afetação da concentração espermática, ao verificar um aumento da ubiquitinação de Março a Dezembro no entanto, o pouco número de amostras e animais envolvidos, levanta algumas reservas quanto a estes resultados.

2.5. FERTILIZAÇÃO

A interação entre o gâmeta masculino e o feminino, nos mamíferos, envolve uma série de eventos regulados que se sucedem temporalmente e apresentam algumas particularidades de acordo com a espécie: penetração através da *corona radiata*, ligação do espermatozóide à zona pelúcida (ZP) do oócito, reação acrossômica (libertação do conteúdo do acrossoma), penetração no espaço perivitelino, ligação do espermatozóide ao oolema e sua incorporação no citoplasma do oócito (para revisão ver WASSARMAN, JOVINE e LITSCHKE, 2001). No entanto, o espermatozóide não é capaz de interagir com o oócito sem antes sofrer uma série de modificações moleculares, bioquímicas e fisiológicas, induzidas no ambiente intra-uterino, genericamente denominadas por capacitação e que tornam o espermatozóide capaz de fertilizar.

2.5.1. CAPACITAÇÃO

As bases moleculares da capacitação não se encontram ainda totalmente esclarecidas mas sabe-se que o fenómeno se caracteriza por aumentos tanto da fluidez da MP, como da fosforilação de resíduos de tirosinas e da mobilidade espermática, que se torna mais vigorosa (hiperativação). A capacitação espermática é observável *in vitro*

quando os espermatozóides são incubados na presença de cálcio, bicarbonato, BSA e um monossacarídeo. Durante a capacitação, o espermatozóide sofre modificações estruturais e funcionais que traduzem eventos sequenciais e concomitantes com alterações moleculares ao nível da cabeça e da peça intermédia em resultado da ativação de vias de sinalização não totalmente conhecidas. Uma dessas vias ($\text{HCO}_3^-/\text{SAC}/\text{PKA}$) é dependente de HCO_3^- , cujo influxo (através de um cotransportador da família $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$), leva à ativação de uma adenil ciclase solúvel (SAC) moduladora do metabolismo do cAMP (HERMO *et al.*, 2010b). Este ativa proteínas cinases A (PKA) que, uma vez ativadas, tanto fosforilam outras proteínas que, presume-se, iniciam outras vias de sinalização, como ativam *scrambelases* que rompem a assimetria dos fosfolípidos da MP, expondo PS ao folheto externo (de VRIES *et al.*, 2003) e aumentando a disponibilidade do colesterol a aceptores de esteróis presentes no meio extracelular, como a albumina (para revisão *vide* SALICIONI *et al.*, 2007). *In vivo*, os níveis de bicarbonato no epidídimo, onde os SPZ são armazenados antes da ejaculação, são muito baixos (3-4mM), em comparação com os dos fluídos do oviducto (>20mM) (GADELLA e VAN GESTEL, 2004).

O efluxo de colesterol, e conseqüentemente a alteração ao rácio Cl/PL determinante do aumento da desordem dos PL e do aumento da fluidez da MP, é uma das mais significativas alterações observáveis no espermatozóide, durante a capacitação *in vitro*, nomeadamente na região da MP que recobre o acrossoma. Nesta região, a MP apresenta microdomínios lipídicos ricos em colesterol e insolúveis à extração por detergentes (TRAVIS *et al.*, 2001; CROSS, 2004; SLEIGHT *et al.*, 2005; van GESTEL *et al.*, 2005), similarmente aos caveoleos (SIMONS e IKONEN, 1997; ROTHBERG *et al.*, 1992) e “lipid rafts” descritos em células somáticas (FIELDING e FIELDING, 2003). Ambos se caracterizam por um elevado conteúdo em colesterol e glio esfingolípido sendo que nos caveoleos se reconhece a presença da proteína caveolina, ausente nos “lipid rafts” (FIELDING e FIELDING, 2003). Estes últimos apresentam-se ricos em proteínas GPI (*vide* PIKE, 2009, para revisão) e desempenham papel importante em vias de transdução de sinal, ao atuarem como centros organizadores de proteínas envolvidas na iniciação e propagação de eventos de sinalização celular (SIMONS e TOOMRE, 2000). De acordo com RIETVELD e SIMONS (1998) os “lipid rafts” podem ser estabilizados em estruturas maiores por ação da caveolina (TREVINO *et al.*, 2001; TRAVIS *et al.*, 2001), formando os caveoleos. A caveolina é uma proteína que liga colesterol (MURATA *et al.*, 1995) donde o seu papel será

o de regular o balanço deste esterol, fundamental para a integridade dos “lipid rafts”. A caveolina-1 foi já identificada na região da MP que recobre o acrossoma em espermatozóides de mamíferos, nas mesmas frações de membrana ricas em colesterol e insolúveis à remoção por detergentes (TRAVIS *et al.*, 2001; CROSS, 2004; SLEIGHT *et al.*, 2005; van GESTEL *et al.*, 2005) e enriquecidas em proteínas envolvidas na interação do espermatozóide com a zona pelúcida do oócito (ZP proteínas) (van GESTEL *et al.*, 2005).

A presença de microdomínios lipídicos no acrossoma é consistente com o facto de os espermatozóides maduros serem células desprovidas da maquinaria de transcrição e transdução comum às células somáticas, devendo pois, possuir, quando maduras e nos locais apropriados, todas as vias de sinalização e metabólicas de tal forma organizadas que só sejam ativadas quando necessárias. Nas células somáticas, o colesterol é um estabilizador dos “lipid rafts” e a sua remoção implica a ativação de eventos celulares envolvendo tirosina cinases e proteínas G. No entanto, nos espermatozóides, não se sabe ainda qual(ais) a(s) via(s) de sinalização que o efluxo de colesterol desencadeia, apesar de se verificar uma modulação também da via do cAMP (VISCONTI *et al.*, 1999a), mas é evidente que o processo determina alterações à fluidez da membrana (detetada por meio do sensor cromogénico aniónico Merocianina 540 - M540; HARRISON *et al.*, 1996), um incremento nos níveis de fosforilação de resíduos de tirosinas na célula e alterações no padrão de mobilidade espermática (hiperativação).

Outras modificações associadas à capacitação incluem ainda perda de moléculas à superfície da célula, denominados fatores decapacitantes por se ter verificado que a sua incorporação a spz capacitados reverte a capacitação (para revisão *vide* FRASER, 2010). A remoção dessas moléculas será importante na medida em que expõe recetores celulares envolvidos na reação acrossómica e na interação com o oolema. Estes eventos, associados aos desencadeados pelo efluxo de colesterol, possibilitarão a redistribuição dos complexos moleculares envolvidos na reação do acrossoma. SHADAN *et al.*, (2004) verificaram que, nos espermatozóides de suínos, o efluxo de colesterol mediado por metil- β -ciclodextrina (MBCD) destabilizava os “lipid rafts”, sem que a sua composição fosse alterada. Os estudos de SHADAN *et al.*, (2004) também mostraram que durante a capacitação *in vitro*, mediada pela MBCD, o gangliósido GM1 (recetor da subunidade β da toxina da cólera, localizado no folheto

externo da MP; SPANGLER, 1992), um marcador de “lipid rafts” (PARTON, 1994), inicialmente distribuído no flagelo, se redistribuía por *clusters* na porção anterior da cabeça da célula sugerindo que o colesterol efluído da membrana não está associado aos “lipid rafts” mas induz a sua realocização em regiões da célula envolvidas na reação acrossômica. No entanto, JONES *et al.*, (2010), observaram que inicialmente o GM1 se distribuía pela região apical do acrossoma, em *clusters* associados às proteínas de ligação à zona pelúcida, e que após o efluxo de colesterol mediado por MBCD esses *clusters* se distribuía ao acaso por todo o acrossoma.

O efluxo de colesterol mediado pelo bicarbonato e albumina ocorre rapidamente (questão de minutos) observando-se, seguidamente, fosforilações de resíduos de serina e treonina (HARRISON, 2004; JHA *et al.*, 2006) ainda antes do aumento nos níveis de fosforilação de tirosinas (após cerca de meia hora de incubação-VISCONTI *et al.*, 1999a; HARRISON, 2004; HARRISON e GADELLA, 2005). Estas parecem depender dos níveis de CAMP ativados via PKA (VISCONTI *et al.*, 1995) mas não se sabe como isto ocorre uma vez que a PKA não fosforila proteínas nos resíduos de tirosina. VISCONTI *et al.* (2002) sugerem que a PKA promove fosforilação em resíduos de treonina e serina, que marcam as proteínas para posterior fosforilação em resíduos de tirosina. Tirosinas cinases citosólicas da família Src, Tec, Csk e Fyn foram já identificadas em frações citosólicas da região acrossômica, pós-acrossômica, peça-intermédia e flagelo dos espermatozóides. Das proteínas presentes nos SPZ que se reconhece serem fosforiladas por via das proteínas cinases encontram-se aldolases específicas do testículo, canais aniônicos dependentes da voltagem de tipo 2 (VDAC 2), glutationa-S-transferase, NADH desidrogenase Fe-S proteína 3, precursor da acrosina, sub-unidade alfa do proetasoma, piruvato desidrogenase E1, tubulina beta 5 e a subunidade 1 do complexo citocromo b-c1 (ARCELAY *et al.*, 2008).

CROSS (1996) verificou que o colesterol presente no plasma seminal de humanos tem um efeito regulador sobre a capacitação, ao bloquear o efluxo de colesterol da membrana. VISCONTI *et al.*, (1999b) também observaram que a adição de colesterol, ou de seus análogos, aos meios de incubação inibia a capacitação dos espermatozóides. Os prostasoms identificados no plasma seminal dos mamíferos são ricos em colesterol e a sua função ainda é controversa (CROSS e MAHASRESHTI, 1997; PALMERINI *et al.*, 2003;

SICILINO, MARCINO e CARPINO, 2008). RONQUIST *et al.* (2009) identificaram ADN em prostasmas iolados do plasma seminal em humanos. LLORENTE *et al.*, (2004) e OH, HAN e CHO *et al.*, (2009) descrevem ainda a presença de caveolina-1, respetivamente nos prostasomas e nos epididossomas. Estes últimos parecem desempenhar um papel de incorporação de proteínas GPI nos espermatozóides durante a maturação no epidídimo (SULLIVAN, FRENETTE e GIROUARD, 2007) conforme referido acima.

Alguns autores apontam que o tempo requerido para a capacitação nas diferentes espécies de mamíferos está relacionado com o conteúdo em colesterol na MP: espécies em que a razão colesterol/fosfolípidos (Cl/PL) é elevada, como nos humanos, requerem mais tempo para a capacitação quando comparadas com outras em que o conteúdo é mais baixo (*vide* FLESCHE e GADELLA, 2000, para revisão). Nos equinos, a razão Cl/PL na MP na região da cabeça dos espermatozóides é de 0,36 (0,23, de acordo com KOMAREK, 1965) valor ligeiramente acima ao referido para os suínos (0,26) mas abaixo do encontrado para outras espécies como os bovinos (0,45) PARKS e LYNCH, 1992), ovinos (0,43; PARKS e HAMMERSTEDT, 1985) e humanos (0,83; MACK, EVERINGHAM e ZANEVELD, 1986). De acordo com Bracket e colaboradores (*apud* AMANN e GRAHAM, 1993) parece que o tempo de capacitação nos espermatozóides equinos é de entre 18 a 20 horas.

2.5.2. REAÇÃO ACROSSÓMICA E INTERAÇÃO COM O OOLEMA E

Uma vez ultrapassada a *corona radiata*, por ação de hialuronidases, o espermatozóide capacitado contacta a zona pelúcida do oócito e a reação acrossómica é desencadeada. A reação acrossómica, um evento exocitótico regulado, envolve a fusão da membrana acrossómica externa (MAE) com a membrana plasmática (MP), em vários pontos da região apical da cabeça da célula. Daqui resulta a formação de múltiplas vesículas que dispersam o conteúdo do acrossoma, rico em enzimas responsáveis pela digestão da zona pelúcida do oócito. Os mecanismos moleculares envolvidos na reação acrossómica ainda não estão totalmente esclarecidos mas assume-se que a exocitose do acrossoma é similar a outros eventos secretórios desencadeados pelo ião cálcio (Ca^{2+}).

Durante a maturação e a capacitação espermática o acrossoma mantém-se quiescente, considerando-se que os estímulos que desencadeiam a reação acrossómica resultam do contacto de recetores presentes na membrana plasmática (recetores associados a proteínas G) com uma glicoproteína específica da zona pelúcida do oócito, a ZP3 (FLORMAN *et al.*, 1989; WARD *et al.*, 1992). O reconhecimento e interação entre estas proteínas, aliado à presença de progesterona (RATHI *et al.*, 2003) (libertada pelas células da *corona radiata*), desencadeiam um incremento bifásico do cálcio intracelular, primeiro por via da abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem seguida da abertura de canais SOC (store-operated channels). O primeiro incremento ativa vias de fosfolipases C (PC) que resultam em incrementos de inositol trifosfato (IP3) que induz a mobilização de cálcio intracelular. A perda de cálcio do acrossoma ativa os canais SOC que medeiam a entrada massiva de cálcio do meio extracelular induzindo incrementos de cAMP que, via um mecanismo dependente de EPAC, desencadeia a fusão da MP com a MAE (*vide* BRANHAM *et al.*, 2001, para revisão).

A fusão das membranas biológicas é mais complexa do que a fusão de bicamadas de lípidos na medida em que requer proteínas específicas capazes de vencer a “barreira” que a hidrofobicidade dos lípidos impõe (repulsões electrostáticas e forças de repulsão) e vários modelos de fusão de membranas mediados por proteínas têm surgido nas últimas décadas (JAHN e GRUBMULLER, 2002). A hipótese SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein recetors*) é uma boa candidata a mediador universal de fusão de membranas nas vias secretoras. As proteínas SNARE agrupam várias famílias de pequenas proteínas que se pensa operarem pelo mesmo mecanismo, sendo que as isoformas encontradas na exocitose neuronal são as melhores caracterizadas. As primeiras a serem distinguidas foram a NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), a sintaxina 1A (STX1A, proteína transmembranar, ancorada na membrana pelo terminal carboxilo), a SNAP25 (proteína associada aos sinaptossomas, ancorada à membrana via cadeias laterais de palmitoil) e a VAMP (também denominada sinaptobrevina, proteína integral da membrana, associada à vesícula de transporte) (TRIMBLE, COWAN e SCHELLER, 1988; TENG, WANG e TANG, 2001).

As proteínas SNARE foram inicialmente classificadas em v-SNARES e t-SNARES de acordo com a sua localização ser na membrana alvo ou na da vesícula de transporte

(SÖLLNER e ROTHMAN, 1993) contudo, visto se ter verificado mais tarde que este modelo não se ajustava a fenômenos de fusão homotípicos foram reclassificadas de acordo com a identidade de resíduos altamente conservados em R-SNARES (SNARES contendo resíduos de arginina) e Q-SNARES (SNARES contendo resíduos de glutamina) (FASSHAEUER *et al.*, 1998).

O conhecimento até à data considera que uma pequena GTPase da família das proteínas Ras, a Rab3A, é crucial para mediar a aproximação das duas membranas (primeira etapa do processo) (ZERIAL e McBRIDE, 2001), cabendo às SNARES a formação de um complexo quaternário formado por um segmento α -hélice de syntaxina e outro de VAMP, e dois segmentos α -hélice de SNAP-25 (segunda etapa). Este complexo *trans*-SNARE, quando estimulado, permite que se ultrapasse a barreira energética imposta pela hidrofobicidade dos ácidos gordos constituintes dos PL, e medei a fusão das membranas (terceira etapa). A dissociação do complexo assim formado é mediada pela ATPase NSF e por uma proteína adaptadora, a α -SNAP (soluble NSF attachment protein) que liberta assim complexos *cis*-SNARE para novos eventos de fusão (Figura 2.10) (*vide* CHEN e SCHELLER, 2001 e MAY, WHITEHEART e WEIS, 2001, para revisão).

Uma vez que a fertilização envolve previamente a reação do acrossosma, vários autores (SCHULZ, WESSEL e VACQUIER, 1997; MICHAUT *et al.*, 2000; RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2000; YUNES *et al.*, 2000) investigaram a presença da maquinaria mínima necessária para a fusão de membranas (hipótese SNARE) nos espermatozoides de várias espécies de mamíferos (para revisão *vide* MAYORGA, TOMES e BELMONTE, 2007). RAMALHO-SANTOS *et al.*, (2000) localizaram homólogos da VAMP/sinaptobrevina e da syntaxina no acrossosma dos espermatozoides de várias espécies, juntamente com um homólogo do sensor de cálcio sinaptotagmina, e verificaram que estas proteínas modulavam a secreção do acrossosma durante a reação acrossómica.

O influxo de Ca^{2+} é o estímulo necessário para que a terceira etapa, do modelo de fusão mediado pelas SNARES, tenha lugar. A sinaptotagmina está implicada na exocitose celular mediada pelo íão Ca^{2+} e é encontrada associada às SNARES nas células com atividade secretora regulando, pois, uma variedade de processos celulares (*vide* BARAM, MEKORI e SAGI-EISENBER, 2001, para revisão). A Rab3A (WARD, FAUNDES e

FOSTER, 1999; IIDA *et al.*, 1999; YUNES *et al.*, 2000), assim como SNAPS (TOMES *et al.*, 2005;) e NSF (MICHAUT *et al.*, 2000; RAMALHO-SANTOS e SCHATTEN, 2004) foram também identificadas nos espermatozoides de mamíferos.

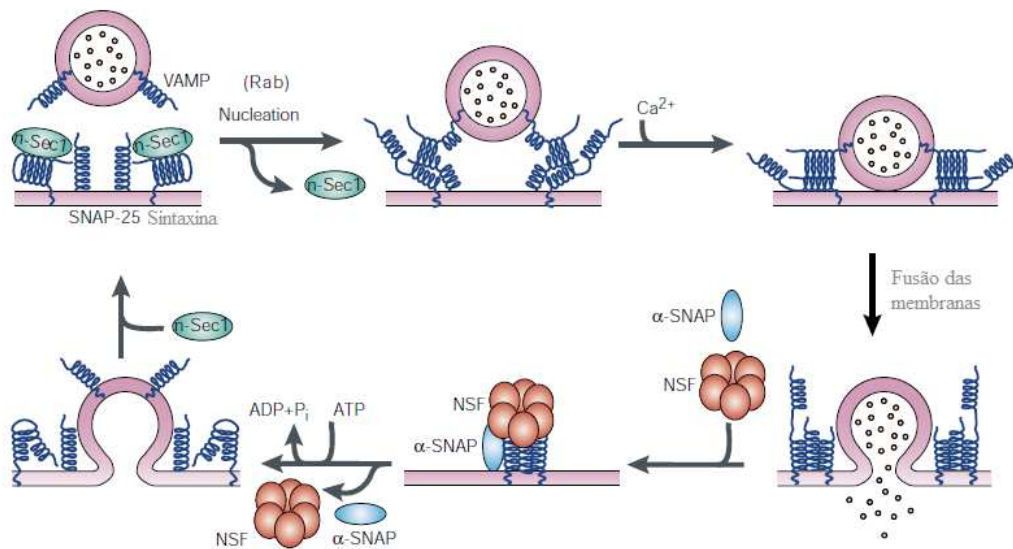


Figura 2.10. Modelo molecular para a exocitose vesicular.

A sintaxina encontra-se ligada a *n-Sec1* antes da formação do complexo *trans-SNARE*. As proteínas *Rab* facilitarão a dissociação da sintaxina permitindo a ligação subsequente entre as três SNAREs, sintaxina, SNAP-25 e VAMP (por simplicidade só um segmento da SNAP-25 está representado). O íon Ca^{2+} desencadeia a abertura do complexo, que resulta na fusão das duas membranas e liberação do conteúdo da vesícula. Após o evento de fusão, o α -SNAP e a NSF são recrutadas do citoplasma e a subsequente hidrólise de ATP pela NSF determina a dissociação do complexo *trans-SNARE*. A Sintaxina, a VAMP e a SNAP-25 ficam assim livres para participar em outro evento de fusão. (NSF; *N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein*; SNAP-25, 25 kDa *synaptosome-associated protein*; SNARE, *soluble NSF attachment protein receptor*, VAMP, *vesicle-associated membrane protein*). Adaptado de CHEN e SCHELLER, 2001.

BRINSKO *et al.* (2007) observaram que os espermatozoides de garanhões com infertilidade idiopática, não desencadeavam a capacitação nem a reação acrossômica quando sujeitos às mesmas condições que estimulavam a capacitação e a reação acrossômica em espermatozoides de garanhões de fertilidade comprovada. Nos ejaculados destes últimos, a razão Cl/PL apresentava-se significativamente inferior à dos animais com problemas de infertilidade. BELMONTE *et al.* (2005) verificaram que o efluxo de colesterol durante a capacitação facilita a associação da Rab3A ao plasmalema,

provavelmente como resultado do influxo de cálcio mediado pela progesterona (LOPEZ *et al.*, 2007).

A detecção de acrossomas íntegros, não reagidos, é possível mediante a utilização de lectinas que se ligam a carboidratos de glicoproteínas exclusivamente localizadas na região do acrossoma (para revisão *vide* YOSHINAGA e TOSHIMORI, 2003). FARLIN *et al.* (1992) demonstraram que a utilização da aglutinina de *Pisum sativum* associada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) permite aceder ao estado do acrossoma nos espermatozóides equinos. Uma vez ultrapassada a zona pelúcida, o espermatozóide reagido alcança o espaço perivitelino e liga-se ao oolema, por meio da região equatorial e ocorre fusão entre bicamadas.

2.6. PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ENERGIA

A função última do espermatozóide encerra, pois, uma sequência de eventos relacionados (capacitação, ligação à zona pelúcida do oócito, reação acrossômica, ligação ao oolema e singamia) caracterizados por uma variedade de processos que maioritariamente envolvem a arquitetura lipídico-proteica determinante para o sucesso do desfecho biológico, a formação de um novo ser. Esses eventos, incluindo a mobilidade e a hiperativação dos espermatozóides, caracterizam-se por uma série de transformações bioquímicas que requerem ATP. A mobilidade espermática, conexas de reações de fosforilação-desfosforilação do complexo proteico Dineina-Mg²⁺ ATPase (SUMMERS e SIBBONS, 1971) associado a α - e β -tubulina do axonema (TURNER, 2006), é governada por princípios hidrodinâmicos (GIBBONS, 1981; GAILLARD *et al.*, 2006) e está relacionada com a quantidade de energia gasta no processo (WILLIAMS e FORD, 2001) que, por sua vez, estará em equilíbrio com a que é gerada (YUNDT, SHACK e LARDNER, 1975; BROKAW, 2006). Os açúcares simples, como a glicose e a frutose, presentes no plasma seminal dos mamíferos, constituem as principais fontes de energia utilizadas pelas células. Contudo, os SPZ equinos têm uma capacidade muito limitada de metabolizar frutose. De fato, a glicose é o substrato energético metabolizado preferencialmente pelo SPZ equino, podendo fazê-lo quer pela via anaeróbia, degradando-a a ácido láctico (glicólise), quer em aerobiose (YANAGIMACHI, 1981).

Na presença de oxigénio (O_2), os equivalentes redutores (armazendos sob a forma de coenzimas reduzidas - NADH e $FADH_2$) resultantes da oxidação de substratos são transferidos para o O_2 através dos complexos proteicos que constituem a cadeia respiratória mitocondrial (I, II, III e IV). No processo, prótons (H^+) são bombeados para o espaço intermembranar ao nível dos complexos I, III e IV gerando-se, assim, um gradiente químico (ΔpH) e eléctrico ($\Delta\psi$) possibilitador do fluxo inverso dos prótons através da ATP sintetase (complexo V) com a resultante formação de ATP.

A presença de mitocôndrias integras e funcionais em torno das fibras densas indicia, assim, como produtor mais significativo de ATP, a fosforilação oxidativa (MANN, 1975) contudo, ela ocorre numa região da célula apenas aquela onde é mais necessária, ou seja, a peça principal. A hipótese de que a difusão de ATP ao longo do flagelo é uma alternativa ao fornecimento de energia até à porção distal daquele não é consensual (NEVO e RIKMENSPOEL, 1970) donde, a produção local de ATP pela via glicolítica, como alternativa ao suprimento da demanda energética ao longo da peça principal (MUKAI e OKUNO, 2004; MIKI *et al.* 2004; LEEB, SIEME e TOPFER-PETERSON, 2005), passou a ter alguma emergência na literatura da especialidade, tanto mais que falharam as tentativas de se comprovar a existência (STEEGHS, OERLMANS e WIERINGA, 1995; KAMP, BUSSELMANN e LAUTERWEIN, 1996; YEUNG *et al.* 1996), em mamíferos, de uma via de transporte de ATP da mitocôndria para o axonema, então proposta (TOMBES e SHAPIRO, 1987). Contudo, e apesar de algumas izoenzimas da via glicolítica (*vide* FORD, 2006, para revisão) assim como uma proteína transportadora de ADP/ATP (SFEC [AAC4 ou Ant4], uma translocase de nucleótidos de adenina), terem sido identificadas na PP dos espermatozóides (KIM *et al.* 2007), os estudos conducentes a comprovar a hipótese da produção local de ATP ao longo do flagelo lançaram alguma confusão nos meios académicos ao sugerirem não ter a glicólise local um papel primordial no suprimento energético sustentador da mobilidade espermática uma vez que MUKAI e OKUNO (2004) já haviam observado supressão da mobilidade na presença de inibidores da fosforilação oxidativa mitocondrial.

O advento do eléctrodo de Clark, em 1953 (*apud* STOREY, 2008) permitiu aceder ao consumo de O_2 (respiração celular), possibilitando estudar extensivamente o metabolismo mitocondrial em diversos tipos celulares incluído espermatozóides de

mamíferos (STOREY, 2008). Nos equinos, somente conhecemos o trabalho de SCHOBER *et al.* (2007) que faz uso do eléctro de Clark na avaliação do metabolismo espermático. A nossa experiência mostrou que, nesta espécie, as metodologias adoptadas por B. Storey (*vide* STOREY, 2008, para revisão) no tratamento das células inviabilizava-as, só sendo possível monitorar o consumo de oxigénio sobre o esperma em natureza, após incubação em aerobiose e na presença de antibióticos (dados não publicados). No entanto, o acesso à integridade e funcionalidade das mitocôndrias encontra-se facilitado pela variedade de fluorocromos catiónicos disponíveis no mercado. Contudo, GARNER *et al.* (1997) verificaram que a rodamina 123 e o Mito Tracker não se apresentavam tão eficientes quanto o JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina) na apreciação da função metabólica mitocondrial em esperma de bovinos. Essa carbocianina lipofílica, quando translocada através da membrana da mitocôndria, subsiste como monómeros verde-fluorescentes a baixo potencial de membrana ($\Delta\Psi_{mit}$) contudo, num ambiente de $\Delta\Psi_{mit}$ elevado, forma multímeros de J-agregados que emitem fluorescência vermelho-alaranjada (REERS, SMITH e CHEN, 1991).

2.6.1. ATIVIDADE MITOCONDRIAL E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Em estudos conduzidos sobre as células espermáticas de mamíferos verificou-se que o metabolismo aeróbio levava a uma produção de H_2O_2 (JONES, MANN e SHERINS, 1979; HOLLAND e STOREY, 1981) e do anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$; HOLLAND, ALVAREZ e STOREY, 1982), com consequências sobre a mobilidade espermática (JONES, MANN e SHERINS, 1979). A cessação da mobilidade na presença de H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ fica a dever-se a alterações à topologia da membrana, com aumento da permeabilidade membranar devido à peroxidação dos PUFA, nomeadamente docosahexanóico (DHA; 22:6) presente na MP (*vide* STOREY, 1997, para revisão).

A mitocôndria tem sido, pois, apontada como a principal fonte de radicais livres intracelulares seguida do sistema NADPH oxidase da membrana plasmática (*vide* AGARWAL e PRABAKARAN, 2005;). De acordo com HALLIWELL e GUTTERIDGE (1999) cerca de 1 a 3% do oxigénio metabolizado durante a respiração celular dá origem a espécies reativas de oxigénio (ROS), termo genericamente aplicado ao conjunto de

metabólitos derivados da redução do oxigénio (como o anião superóxido - $O_2^{\bullet-}$, e o radical hidroxilo, $\bullet OH$) e de espécies moleculares (como as derivadas da reação entre compostos de carbono e o oxigénio molecular: radicas peróxido - ROO^{\bullet} , alcóxido - RO^{\bullet} e hidroperóxidos orgânicos - $ROOH$). Dentre as ROS, ao anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$ - resultante do transporte de electrões para o O_2), e ao radical hidroxilo ($\bullet OH$ - resultante da transferência de um electrão do $O_2^{\bullet-}$ para o H_2O_2 , de acordo com a equação de Haber-Weiss) é atribuído o principal papel no desencadear da peroxidação espontânea dos lípidos da MP observada nos espermatozóides de uma variedade de espécies, em condições fisiológicas (ALVAREZ *et al.*, 1987; AITKEN *et al.*, 1992; STOREY, 1997). O $O_2^{\bullet-}$ pode ser diretamente protonado originando o radical hidroperóxido HO_2^{\bullet} , potente oxidante ao qual a MP é permeável.

Uma vez iniciada a peroxidação lipídica por ação destes radicais ($\bullet OH$ e HO_2^{\bullet}), os peróxidos lipídicos formados (LOO^{\bullet} e LO^{\bullet} , produtos primários da peroxidação lipídica) tendem a estabilizar subtraindo um hidrogénio à cadeia carbonada de um ácido gordo vizinho, originando um radical de carbono que, combinando-se com o O_2 , gera outro peróxido lipídico, perpetuando-se a propagação da reação às moléculas vizinhas, num fenómeno em cadeia que só é interrompido na presença de antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos (JONES, MANN e SHERINS, 1979; BILESKI, ARUDI e SUTHERLAND, 1983). Caso contrário, a reação só termina quando dois radicais reagem formando produtos secundários estáveis como o aldeído malónico (MDA) e o 4-hidroxinonennal (4-HNE) (*vide* Figura 2.11).

O MDA, ao reagir com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), forma um aducto rosado estável detetável a 530nm pelo que o grau de peroxidação lipídica no esperma pode ser determinado pelo grau de formação de substâncias Reativas ao Ácido TioBarbitúrico (TBARS) - método dos TBARS, ou do MDA (BARBER e BERNHEIM, 1967). Uma das limitações deste método é não fornecer informação relativamente às macroregiões celulares mais afetadas pelo ataque de ROS. Assim, o sensor lipofílico de radicais livres 4,4-difluor-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-boro-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ácido undecanóico (BODIPY® 581/591 C11) tem sido utilizado para avaliação da extensão da peroxidação lipídica ao nível dos espermatozóides dos animais de produção (BALL e VO, 2002; BROUWERS e GADELLA, 2003; CHRISTOVA *et al.*, 2004; NEILD *et al.*, 2005;

BROUWERS, SILVA e GADELLA, 2005). Da interação de radicais livres de oxigênio com a porção butadienil poli-insaturada do sensor (NAGUIB, 1998; PAP *et al.*, 1999) resulta um desvio do pico de emissão de fluorescência de ~590nm (vermelho) para ~510nm (verde), mecanismo este similar ao que ocorre naturalmente no ácido *cis*-paranóico.

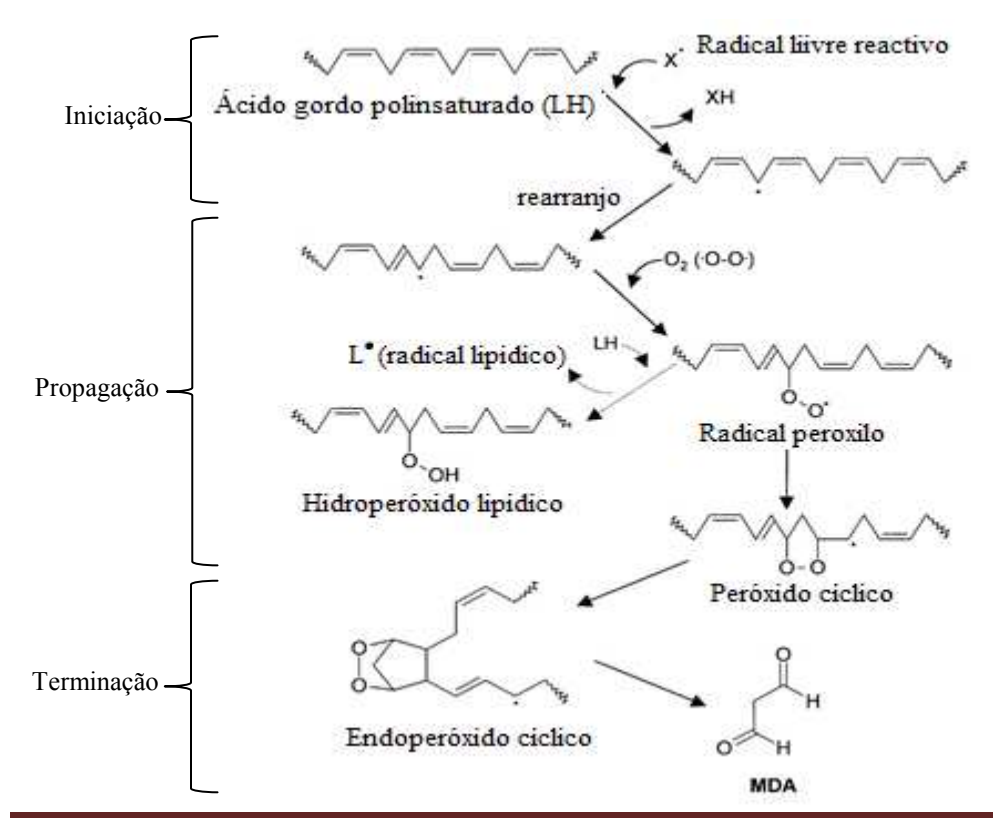


Figura 2.11. Ataque dos radicais livres de oxigênio a ácidos gordos polinsaturados. Adaptado de Singh *et al.*, 2001.

O envolvimento de ROS nos eventos associados à célula espermática tem sido alvo de interesse porquanto se lhes atribui um papel fisiológico (BIZE *et al.*, 1991; de LAMIRANDE e GAGNON, 1993; GRIVEAU, RENARD e LE LANNOU, 1994; BAUMBER *et al.*, 2003b) na medida em que ao peroxidar lipídios da membrana, destabiliza-a (NEILD *et al.*, 2005), tornando-a mais fusogénica. Com efeito, no conjunto das modificações associadas a eventos finais da capacitação têm sido identificados, em diversas espécies, mecanismos de fosforilação de tirosinas, modulados por cinases (PKA, PKC e PKT) (NAZ

e RAJESH, 2004; URNER e SAKKAS, 2003) e regulados por espécies reativas de oxigénio (ROS) (O'FLAHERTY, de LAMIRANDE e GAGNON, 2006) (*vide* FORD, 2004, para revisão).

Apesar de, recentemente, ter também sido descrito um processo de libertação de ROS induzido por ROS que envolve o “poro” de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial (ZOROV *et al.*, 2006), as espécies reativas de oxigénio de origem mitocondrial não se prefiguram como as únicas responsáveis pela destabilização das membranas, nestas células. As fosfolipases citosólicas, nomeadamente as A₂ e C parecem também estar envolvidas no processo uma vez que, adicionalmente, a hidrólise de DAG gera ácido araquidónico (LAPETINA., 1982), elemento precursor de um elevado grupo de mediadores celulares, os ecosanóides (BALSINDE, WINSTEAD e DENNIS, 2002). As lipoxigenases constituem um dos grupos de enzimas que catalizam a síntese daqueles, concomitantemente com a libertação de hidroperóxidos que afetam o ADN de alguns tipos celulares (JIAN *et al.*, 2009). Desconhece-se, até que ponto, estão estas moléculas envolvidas na coreografia que acompanha o espermatozóide equino durante a sua existência enquanto unidade biológica, desde a maturação até à fertilização ou morte.

2.7. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Em todas as células existe um equilíbrio entre as espécies oxidantes e a capacidade de remoção do intermediário reativo formado. Este equilíbrio pode romper-se se os sistemas antioxidantes da célula se encontrarem diminuídos, quer por defeitos no próprio sistema quer pela excessiva concentração de espécies reativas, donde resulta *stresse* oxidativo que amplifica os danos tecidulares (GUTTERIDGE, 1995). Ao nível do espermatozóide, o *stresse* oxidativo é apontado como responsável por danos irreparáveis à MP e ao ADN (KEMAL *et al.*, 2000) assim como pela diminuição da mobilidade (AITKEN *et al.*, 1989) e pela incapacidade do espermatozóide interagir com a zona pelúcida do oócito (AITKEN e FISHER, 1994; AITKEN, 1995).

O *stresse* oxidativo pode resultar da presença de leucócitos no esperma (AITKEN, 1995) e de espermatozoides imaturos e/ou com alterações morfológicas (RAO *et*

al., 1989). Com efeito, os espermatozóides não viáveis e os morfologicamente anormais (BALL, VO e BAUMBER, 2001), nomeadamente aqueles que apresentam gotas citoplasmáticas, constituem fonte de ROS uma vez que se esses resíduos de citoplasma se apresentam ricos na enzima glucose-6-fosfato desidrogenase, enzima envolvida na formação de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) na via das pentoses (GOMEZ *et al.*, 1996; SABEUR e BALL, 2007), afetando os restantes espermatozóides viáveis. A fraca qualidade inicial de um ejaculado parece, assim, coexistir com um maior potencial de se gerarem danos adicionais nas células. Se nalgumas situações de infertilidade humana, a elevada produção de ROS é concomitante com uma baixa atividade antioxidante (ALKAN *et al.*, 1997) outros casos há em que os níveis enzimáticos antioxidantes não se apresentam deficitários e subsistem com elevadas produções de ROS (ZINI, GARRELS e PHANG, 2000).

De acordo com alguns autores, o *stresse* oxidativo pode ainda ter origem durante o desenvolvimento e maturação dos espermatozóides como resultado da insuficiente proteção antioxidante conferida pelo trato reprodutor (SHARMA e AGARWAL, 1996). VERNET, AITKEN e DREVET (2004) consideram que é no epidídimo que ocorrem os maiores danos celulares devido ao stress oxidativo, no entanto, SULLIVAN, FRENETTE e GIROUARD (2007) postulam que a isoforma da glutathiona peroxidase, GPX5, secretada no lúmen da cabeça do epidídimo, via epididimosomas, protege os espermatozóides do *stresse* oxidativo nessa região. POTTS, JEFFERIES e NOTARIANNI (1999) também consideram que o epidídimo possui capacidade antioxidante associada a regiões específicas para além de contribuir para a capacidade antioxidante do plasma seminal.

As baixas temperaturas de conservação do esperma têm também sido consideradas como promotoras de peroxidação dos lipídios da MP verificando-se, que a adição de diluidores de refrigeração permite sustentar a atividade do sistema antioxidante enzimático presente no plasma seminal (KANKOFER *et al.*, 2005).

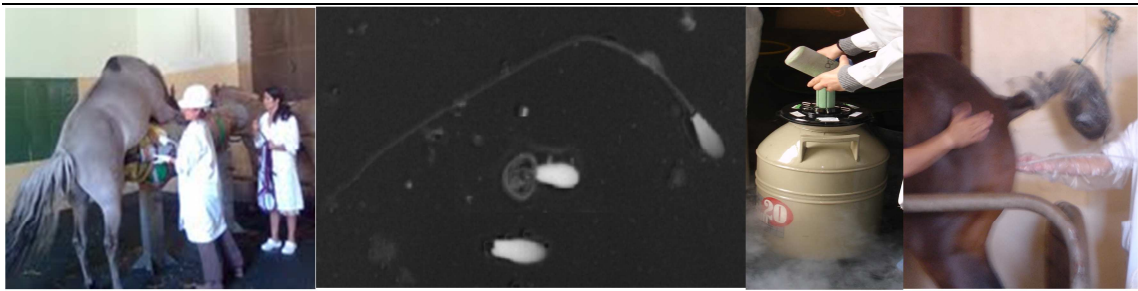
A presença de mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, no esperma, permite fazer frente, até determinado ponto, aos efeitos nocivos das ROS (GRIVEAU e LANNOU, 1997). Os mecanismos enzimáticos encontram-se representados pelas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px); dos

mecanismos não enzimáticos, destacam-se os ácidos ascórbico e úrico, o α -tocoferol a albumina, a taurina e a hipotaurina e a ergotioneína (*vide* SANOCKA e KURPISZ., 2004 e AGARWAL, GRUPTA e SIKKA, 2006, para revisão). No entanto, os espermatozóides, pela escassez de citoplasma, apresentam níveis mais baixos de catalase, superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e α -tocoferol, em contraste com o plasma seminal onde a capacidade antioxidante parece ser elevada (THIELE *et al.*, 1995).

Nos equinos, já se observou atividade da GSH-Px, da CAT e da SOD tanto no plasma seminal como nos testículos, no epidídimo, nas glândulas bulbouretrais e nas glândulas vesiculares contudo, foi na próstata que se notou maior atividade da catalase (BALL *et al.*, 2000; BAUMBER e BALL, 2005; KANKOFER *et al.*, 2005). A atividade, quer da CAT quer da SOD, parece ser elevada no PS equino apresentando contudo, variações significativas entre garanhões. Relativamente aos mecanismos não-enzimáticos, pouco se sabe nos equinos mas, similarmente ao observado para outros mamíferos, pensa-se que representarão uma componente considerável da capacidade antioxidante do esperma (*vide* BALL *et al.*, 2008, para revisão). Estudos conducentes à quantificação da capacidade antioxidante não-enzimática no PS de esperma humano têm revelado resultados contraditórios (LEWIS *et al.*, 1995; SMITH *et al.*, 1996; JÓZWIK *et al.*, 1997) quanto à relação entre a disfunção deste mecanismo de controlo de ROS e a fertilidade. Nos equinos, WNUK *et al.* (2010) observaram que baixos níveis de atividade antioxidante total não-enzimática no plasma seminal se correlacionavam com danos no ADN espermático.

CAPÍTULO 3

OBTENÇÃO, EXAME, VALORIZAÇÃO, CONSERVAÇÃO E APLICAÇÃO DO ESPERMA



SUMÁRIO

Neste capítulo são descritas as metodologias utilizadas na obtenção, avaliação, valorização, conservação e aplicação do esperma equino utilizadas na rotina laboratorial implementada no Laboratório de Reprodução Animal Dr. França Martins da Escola Superior Agrária de Coimbra e que estiveram subjacentes neste trabalho.

De acordo com o nº2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº388/70 são descritas na elaboração deste capítulo algumas metodologias parcialmente publicadas:

(i) Em capítulo de livro

Ramalho-Santos, J.; Amaral, A.; Sousa, A.P.; Rodrigues, A.S.; Martins, L.; Baptista, M.; Mota, P.C.; Tavares, R.; Amaral, S.; Gamboa, S. - Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy. In: Méndez-Vilas, A; Díaz, J, eds. Modern Research and Educational Topics in Microscopy: Applications in Biology and Medicine. vol.1. Badajoz: Formatex; 2007. ISBN-13: 978-84-611-9420-9. pp. 394-402.

As técnicas descritas neste capítulo encontram-se implementadas no Laboratório de Reprodução Animal Dr. França Martins da ESAC e resultam de um trabalho que foi sendo desenvolvido ao longo das últimas três décadas, primeiro pela mão do Prof. Manuel Machado-Faria (MDV), cuja formação na área de reprodução equina havia sido feita na Escola de Medicina Veterinária de Hannover e, posteriormente (a partir de 1993), pela mão da autora desta tese. A implementação de técnicas de fluorescência directa (IP/SYBR14 e PSA-FITC) foi fruto de um contato estabelecido, em 1994, com os Haras Nacionais franceses tendo, as técnicas aí em uso (MAPA, 1996), sido transpostas para a realidade do Laboratório de Reprodução Animal Dr. França Martins da ESAC e utilizadas desde então, com uma ou outra adaptação, conforme se descreve neste capítulo.

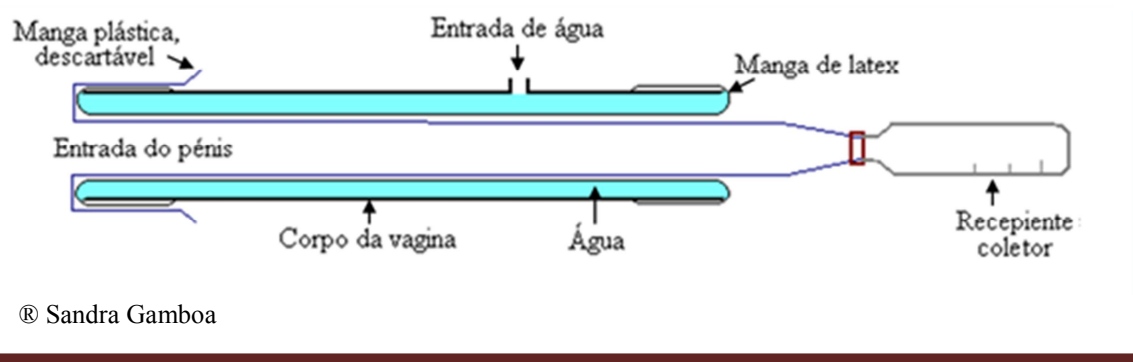
Os animais utilizados permaneceram nas instalações da Escola Superior Agrária de Coimbra, alojados em boxes, com água e palha *ad libitum* e alimentados três vezes ao dia com uma ração composta, adquirida ao exterior ou formulada localmente.

3.1. OBTENÇÃO

As colheitas de esperma permitem tanto a avaliação do potencial de fertilidade de um futuro reprodutor, como a apreciação da qualidade espermática de ejaculados destinados a serem utilizados em Inseminação Artificial (IA) (quer sob a forma fresca ou conservada), para além da detecção de problemas de fertilidade que possam surgir durante a utilização de um garanhão (BRINSKO e VARNER, 1993). Adicionalmente, a IA possibilita o uso mais eficiente de um garanhão, na medida em que permite veicular os espermatozoides em mênstruos desenhados para aumentar a taxa de sobrevivência das células (BATELLIER et al., 2001) para além do tempo e do espaço, facultando a difusão do material genético de um mesmo indivíduo por um número de fêmeas superior ao que seria possível em cobrição natural.

Das técnicas vulgarizadas para a obtenção de esperma na generalidade das espécies pecuárias (electroejaculação, massagem manual e vagina artificial), o método da vagina artificial (VA) é o mais indicado para a espécie equina. Neste método, são os estímulos térmicos e mecânicos que incentivam a ejaculação no macho. Grosso modo, a vagina artificial é constituída por um tubo rígido (PVC), aberto nas extremidades, no

interior do qual se introduz uma manga de látex (flexível) mais comprida que, revertida sobre os extremos do tubo, delimita um espaço que se preenche com água quente. A utilização de uma manga plástica (destinada a entrar em contato com o pénis do macho), descartável, no interior do dispositivo permite, para além de uma maior higienização de todo o processo, acoplar, numa das extremidades da VA, um recipiente que receberá a totalidade do ejaculado. A outra extremidade do tubo rígido, devidamente lubrificada, constitui a porção vulvar (*vide* Figura 3.1 e Figura 3.2)



© Sandra Gamboa

Figura 3.1. Representação esquemática do modelo de vagina artificial para equinos.

Modelo INRA, construída pelos Serviços Técnicos da ESAC e utilizada no seu Posto de Cobrição desde 1999

A quantidade de água e a sua temperatura determinam, no interior do tubo rígido, as condições de pressão e temperatura que, sobre o pénis, constituem o estímulo necessário que conduz à ejaculação. A temperatura visa, também, estabelecer no todo da vagina artificial e especialmente nas superfícies passíveis de contato com o sémen, o ambiente térmico equiparável aos tratos genitais masculino e feminino (BARRISCO, 1984).

Para a colheita de sémen, o macho foi conduzido à presença de uma fêmea em cio e incentivado a encabritar-se sobre ela, ou sobre um manequim de colheita (feito à semelhança do existente na escola de Hannover), dependendo dos recursos disponíveis e/ou do temperamento do macho em causa. O pénis foi desviado para o interior da vagina artificial de forma que a ejaculação se processasse normalmente (*vide* Figura 3.3).



Figura 3.2. Vagina artificial para equinos, utilizada no Posto de Cobrição da ESAC

O comportamento do garanhão durante a colheita foi observado registando-se o número de saltos necessários para a obtenção de um ejaculado. Considerou-se um salto toda a intromissão do pénis na vagina artificial, acompanhada de pelo menos um movimento rítmico da região da bacia.



Figura 3.3. Colheita de sémen em equinos, sobre uma égua em cio e sobre manequim, na presença de uma égua em cio

3.2. EXAME

A avaliação de parâmetros espermáticos básicos é a ferramenta mais utilizada quer para a predição da fertilidade potencial de um garanhão quer para a detecção de problemas de fertilidade, isto apesar desses parâmetros não fornecerem informação relativa a aspectos cruciais para a fertilização como a capacidade para a capacitação e ligação à zona pelúcida, reação acrossómica e integridade da cromatina, entre outros.

3.2.1. ESPERMOGRAMA SUMÁRIO

No exame dos parâmetros espermáticos associam-se as avaliações das características comportamentais do garanhão (tempo de preparação, tempo de recolha e número de saltos), às características que ilustram a atividade das glândulas anexas ao aparelho reprodutor (volume de gel, volume de filtrado e pH) bem como as características quantitativas (concentração espermática e número total de espermatozoides - NTE) e qualitativas (mobilidade, vitalidade e morfologia espermáticas) dos espermatozoides.

Imediatamente após a colheita, os ejaculados são encaminhados para o laboratório e a porção gelatinosa removida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Os ejaculados são filtrados através de uma gaze estéril para eliminar vestígios de gel e partículas maiores de lixo. O aspecto do esperma (cor e opacidade), bem como o cheiro, são sempre observados e os espermatozoides mantidos em banho-maria a 35°C durante toda a manipulação do sémen.

i. CONCENTRAÇÃO

O volume de esperma varia inversamente com a concentração espermática. Esta é uma das características mais variáveis do sémen entre as consideradas na sua avaliação (BARRISCO, 1984) e assume particular relevo nos programas de inseminação artificial porquanto é determinante do título de diluição que o sémen suportará. O método de referência utilizado para a sua determinação foi o da contagem das células num hemocitómetro com recurso à microscopia de campo claro. A precisão do método hemocitométrico assenta na combinação da imobilização, fixação, diluição das células (numa solução salina de formalina; 0,154M NaCl e 1.85% de formaldeído a 37%) e redução ao mesmo plano de focagem dos espermatozoides sujeitos a contagem individual. Considerando que na espécie equina, a concentração espermática média se situa entre os $150-200 \times 10^6$ spz/ml, um fator de diluição de 40x é normalmente apropriado para se proceder a uma contagem correcta, por microscopia de campo claro com uma ampliação de 400x. Para cada tipo de hemocitómetro, a área de cada retículo associada à altura do espaço que medeia entre a câmara e a lamela que recobre os

retículos, perfaz um volume conhecido. O número de espermatozoides por unidade de volume no sémen em natureza pôde, assim, ser determinado.

O método da contagem em hemocítometro permite aferir espectrofotómetros e fotocolorímetros. Estas técnicas, que tiram partido das propriedades de absorção de luz por partículas em solução, apresentam a vantagem de darem uma resposta mais imediata, fundamental quando se trabalha com o sémen equino, que perde qualidade muito rapidamente e quando se pretende a aplicação imediata do sémen após colheita. A determinação da concentração espermática dos ejaculados que serviram de base a esta tese foi efectuada num fotocolorímetro (Colorimeter 254, Ciba-Corning), a um comprimento de onda (λ) de 546nm, previamente aferido (anualmente) por contagem directa em câmara de Neubauer (3 câmaras/amostra - Improved Double Neubauer, prof.: 0,100 mm; 0,0025 m).

ii. MOBILIDADE

Contrastando com as espécies bovina e ovina, em que no sémen em natureza se observa a mobilidade massal, na equina, a concentração espermática permite a observação da mobilidade individual. A percentagem de espermatozoides móveis em cada ejaculado foi estimada em duas gotas de sémen (5,5 μ l) em natureza, entre lâmina e lamela (18x18 mm), sobre a platina aquecida de um microscópio com contraste de fase (Laborlux, Leica). Com uma ampliação de 100x foi possível observar vários campos ópticos (5 a 10) em cada gota e estimar o tipo de movimento prevalecente (*vide* Figura 3.4) fazendo-se, assim, uma estimativa média da mobilidade, traduzindo-se o resultado em percentagem (%) de espermatozoides com movimentos progressivos (PMS). Importa referir que é comum observar-se, no sémen equino, uma certa percentagem de espermatozoides com movimentos circulares amplos, que conferem à célula um deslocamento em progressão. Este tipo de movimento pode dever-se à inserção do flagelo em posição abaxial.

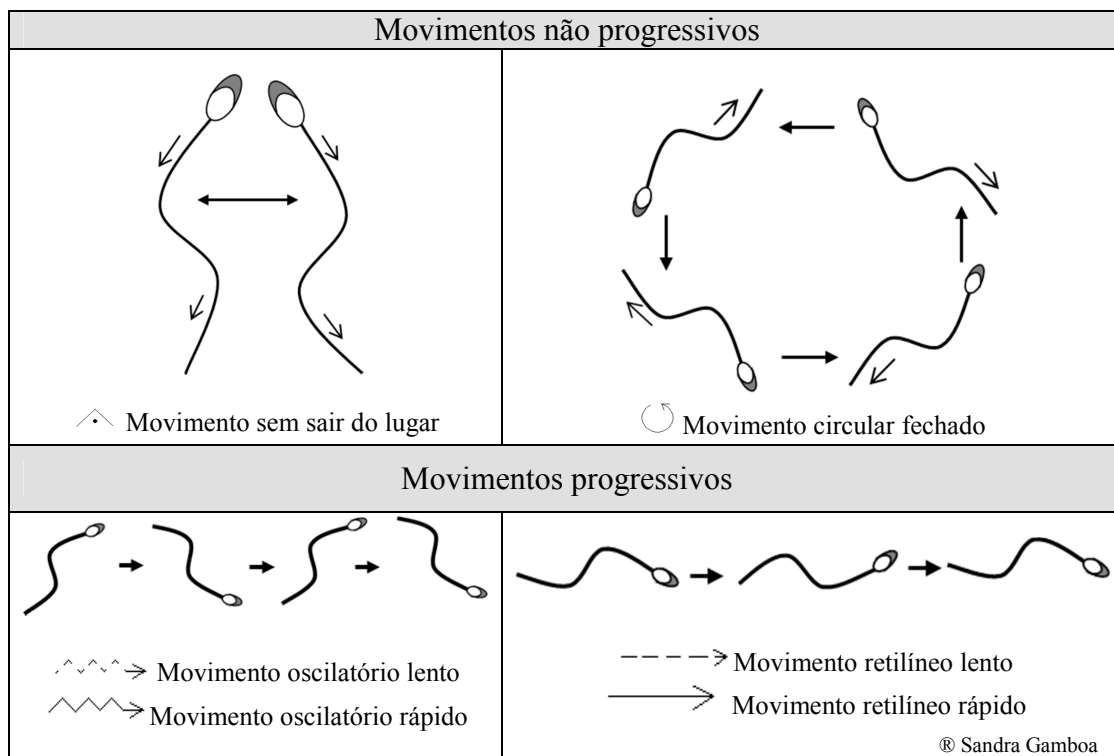


Figura 3.4. Tipo de movimento observável nas células espermáticas e notação utilizada.

(Adaptado de MAPA, 1996)

A mobilidade espermática é considerada um teste fundamental para estimar a proporção de células viáveis (e funcionais) num ejaculado. Contudo, nos equinos, o movimento das células é intercalado por períodos de repouso ou imobilidade. Assim, alguns dos espermatozoides que se apresentarem imóveis podem não estar necessariamente mortos (DAVIS-MOREL, 1999). Adicionalmente, na maior parte das amostras de esperma, a percentagem de mobilidade é sempre inferior à percentagem de células vivas indicando que células vivas mas imóveis estão presentes no ejaculado (CASEY *et al.*, 1993). Por estas razões, testes de avaliação da vitalidade (% de espermatozoides vivos) são utilizados como complemento à avaliação da mobilidade.

iii. VITALIDADE

Contrariamente à maioria das células vivas, em que a vitalidade não é definida exclusivamente em termos de uma propriedade fisiológica ou morfológica (NEBE-VON CARON *et al.*, 2000), nos espermatozoides a vitalidade é sinónimo de integridade do

plasmalema. Assim, os testes de vitalidade assentam nas propriedades de exclusão de corantes vitais por parte da membrana plasmática (MP) intata (íntegra).

A eosina é o corante celular que mais se utiliza (BLOOM, 1950b), associado a outros corantes de fundo como a nigrosina, o azul de bromofenol e o azul de opala. Espermatozoides com membranas danificadas permeiam a eosina e coram de vermelho-rosado (“mortos”, Figura 3.5 A), ao passo que os espermatozoides com membranas estruturalmente intatas (“vivos”, Figura 3.5 B) permanecem incolores.

Esfregaços de sémen foram preparados (diluição 1:1) com uma solução de eosina-nigrosina (eosina Y 0,014M e nigrosina 0,1M, numa solução de citrato de sódio 0,1M), sobre uma placa de aquecimento. Após secagem, contaram-se 200 células em campos não contíguos (20 a 50) com recurso a microscopia de campo claro (ampliação de 1000x, Laborlux, Leica). Os resultados foram traduzidos em percentagem de espermatozoides vivos.

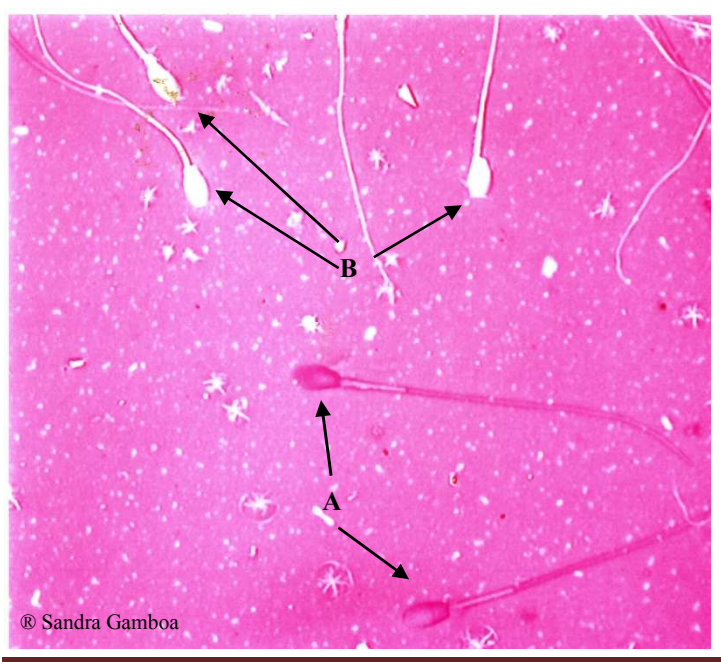


Figura 3.5. Esfregaço de espermatozoides equinos corados com eosina-nigrosina.

A) espermatozoides mortos e B) espermatozoides vivos, na altura da execução do esfregaço.

O kit de viabilidade celular LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, desenvolvido pela Molecular Probes Inc (Eugene, OR, USA) em colaboração com GARNER *et al.* (1994), sobre espermatozoides bovinos, mostrou-se consistente na discriminação de células vivas/mortas em outras espécies de mamíferos, incluindo equinos. Baseia-se também no mesmo princípio descrito acima, mas utiliza dois fluorocromos que se intercalam entre as bases do ácido desoxirribonucleico nuclear (ADN): o SYBR14, um composto que permeia a MP independentemente do seu estado estrutural, mostrando fluorescência

verde na região do núcleo, e o Iodeto de Propídio (IP), que só atravessa o plasmalema quando este apresenta alterações estruturais, exibindo fluorescência vermelha (Figura 3.8). GRUNDLER *et al.* (2004) consideram que o fator determinante para a distinção das células viáveis das mortas é a extinção (quenching) do SYBR14 pelo IP, extinção esta que poderá ocorrer por fenómenos de transferência de energia por ressonância uma vez que o espectro de absorção do IP ($\lambda_{\text{excitação}}$ máximo - 535 nm) se sobrepõe ao espectro de emissão do SYBR14 ($\lambda_{\text{emissão}}$ máximo - 525 nm).

Para aceder à viabilidade espermática por esta metodologia, uma amostra de esperma (20×10^6 spz) foi incubada com o fluorocromo SYBR14 a uma concentração final de 6 μM , numa solução de sais de Hanks com Heppes (HH: 1,3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,4 mM KH_2PO_4 ; 5,4 mM KCl; 0,8 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,13 M NaCl; 26 mM $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$; 5,5 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; 417 mM NaHCO_3 ; COGNARD, 1996) e 1% de BSA, por 5 minutos a 35°C. Findo este tempo, o iodeto de propídio (IP, 0,48 mM) foi adicionado e a suspensão incubada por mais 5 minutos (COGNARD, 1996). Montaram-se 5,5 μl da preparação, entre lâmina e lamela vedada com verniz, à temperatura ambiente e observaram-se 200spz por lâmina em pontos não contíguos com recurso a um microscópio de fluorescência (HUND H 600 AFL filtro de fluoresceína $\lambda_{\text{excitação}}=494$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=520$ nm).

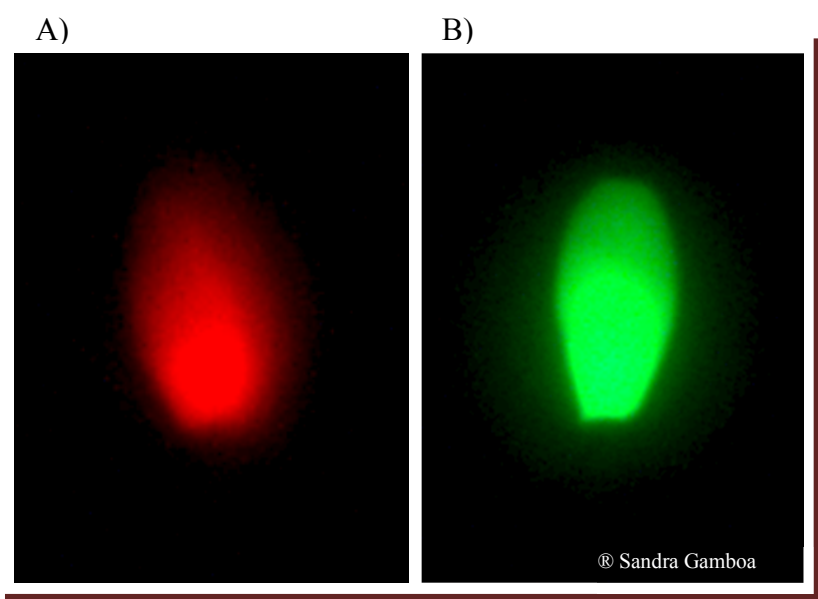


Figura 3.6. Espermatozoides equinos marcados com o IP/SYBR14.
*Os espermatozoides com MP danificada permeiam também o IP (A)
enquanto os que apresentam membrana plasmática íntegra só
permeiam o SYBR14 (B)*

Tanto num como no outro método acima referidos é normal encontrar espermatozoides com uma coloração intermédia: no método da eosina, uma coloração rosada na base da cabeça e a restante porção incolor e no do IP/SYBR14, uma coloração branco-amarelada, na região do núcleo. Esta coloração (ou ausência dela/fluorescência) apresenta-se dependente do tempo e surge em resultado da perda de fluorescência verde e antes do aparecimento de fluorescência vermelha. Células com esses aspectos são normalmente consideradas moribundas e foram classificadas como mortas uma vez que traduzem alterações à topologia/estrutura da membrana.

iv. MORFOLOGIA

Para se fazer a estimativa do tipo de alterações à morfologia normal do espermatozoide e da sua incidência, observam-se esfregaços feitos a partir de esperma em natureza misturado com corantes como a tinta-da-china (Figura 3.7), a eosina-nigrosina (SWANSON e BEARDEN, 1951), a hematoxilina de Harris, o de Wright-Giemsa, (combina a eosina com o azul de metileno) ou os kites comerciais à base destes dois (ou seus derivados) como o Diff-Quik® e o Hemacolor® (*vide* Figura 3.8), que permitem ainda assinalar a presença de células somáticas, especialmente leucócitos.

A tinta-da-china faculta uma imagem incolor dos espermatozoides em fundo negro (coloração negativa) (BARRISCO, 1984), por microscopia de campo claro e foi o método escolhido para as avaliações da morfologia espermática uma vez que nos esfregaços de eosina-nigrosina não é possível distinguir com rigor, nos espermatozoides incolores, determinado tipo de anomalias como peças intermédias com fibras isoladas, colos anormais, etc.

De igual modo, os kites comerciais como o Spermac®, Diff-Quik® e Hemacolor®, revelaram uma maior incidência de cabeças e flagelos isolados quando comparados com as observações sobre esfregaços de eosina-nigrosina ou tinta-da-china, o que poderá ficar a dever-se à ação mecânica que todo o processo de coloração exerce sobre as células. Como na espécie equina, as cabeças e os flagelos isolados são contados separadamente, de forma a possibilitar a distinção entre anomalias primárias (resultado da espermatogénese) e terciárias (induzidas *in vitro*) entendeu-se ser praticável a

coloração negativa para avaliação da morfologia espermática. Por outro lado, variações nas dimensões das cabeças dos espermatozoides têm sido atribuídas aos métodos de coloração das células (HIDALGO *et al.*, 2005; SOLER *et al.*, 2005) o que sobrestima a população de espermatozoides morfologicamente anormais relativamente à população total.

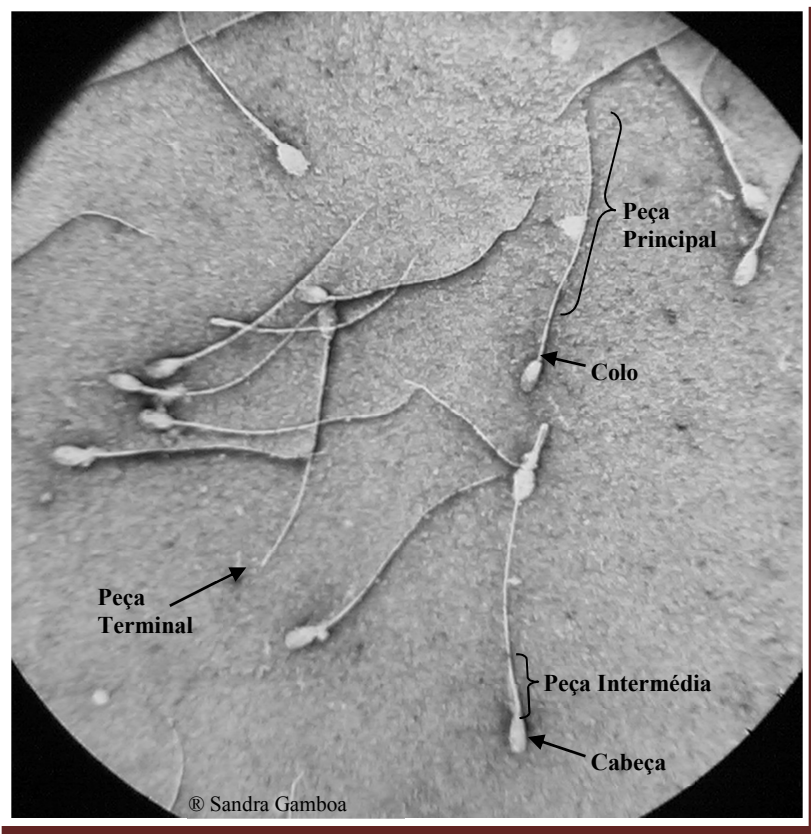


Figura 3.7. Morfologia de espermatozoides equinos.
Esfregaço de esperma executado com tinta-da-china.

Da mesma forma que para os esfregaços da vitalidade, também os da morfologia foram preparados sobre uma placa de aquecimento, com o corante à mesma temperatura que a do esperma (35°C) de forma a evitarem-se alterações morfológicas (caudas enroladas, por exemplo) induzidas por choque térmico. O número de espermatozoides normais e anormais foi anotado, registando-se a sede da anomalia, de acordo com a classificação da Figura 3.9.

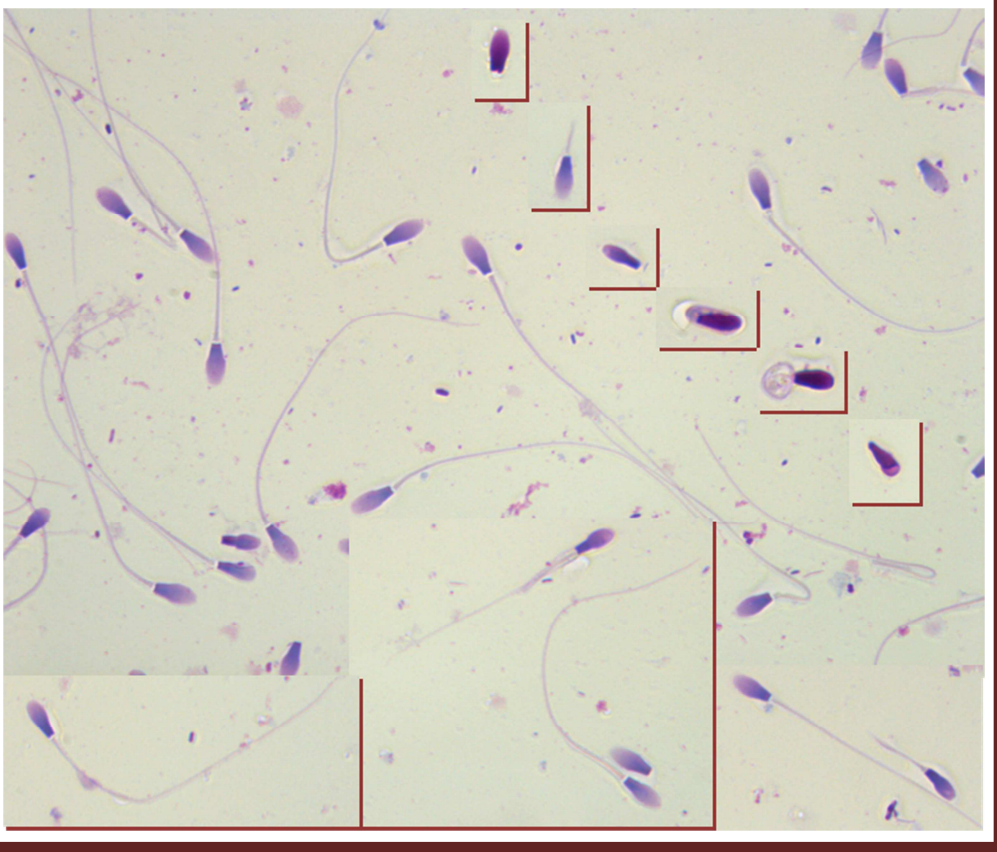


Figura 3.8. Morfologia de espermatozoides equinos corados com Hemacolor®

A gênese da alteração morfológica (testicular, epididimal ou *in vitro*) e a sua importância para a função celular são tidas em conta nos sistemas de classificação das anomalias morfológicas do espermatozoide (BIELAŃSKI *et al.*, 1982; BARRISCO, 1984; MAPA, 1996). O registo da sede da anomalia permite assim averiguar do correcto manejo reprodutivo dos animais, da eficiência da espermatogénese e da correcta manipulação do sémen. Com efeito, a presença elevada de gotas citoplasmáticas proximais e distais pode ser reveladora de uma incompleta maturação no epidídimo, fruto de um elevado ritmo de colheitas, enquanto a presença de anomalias ao nível da cabeça, por exemplo, sugere uma espermatogénese deficiente e um elevado número de caudas enroladas pode ser indiciador de choque térmico.

Espermatozoides com mais do que uma alteração morfológica foram registados de acordo com as hierarquias estabelecidas em função da região da célula e, para cada região, em função do tipo de alteração (BARRISCO, 1984; MAPA, 1996). Assim,

as alterações à morfologia do espermatozoide foram assinaladas, por ordem decrescente de severidade: anomalias da cabeça > peça intermédia > peça principal; gotas citoplasmáticas proximais > peça intermédia e peça principal curta, dupla ou espessa > peça intermédia e peça principal enrolada ou partida > gotas citoplasmáticas distais.

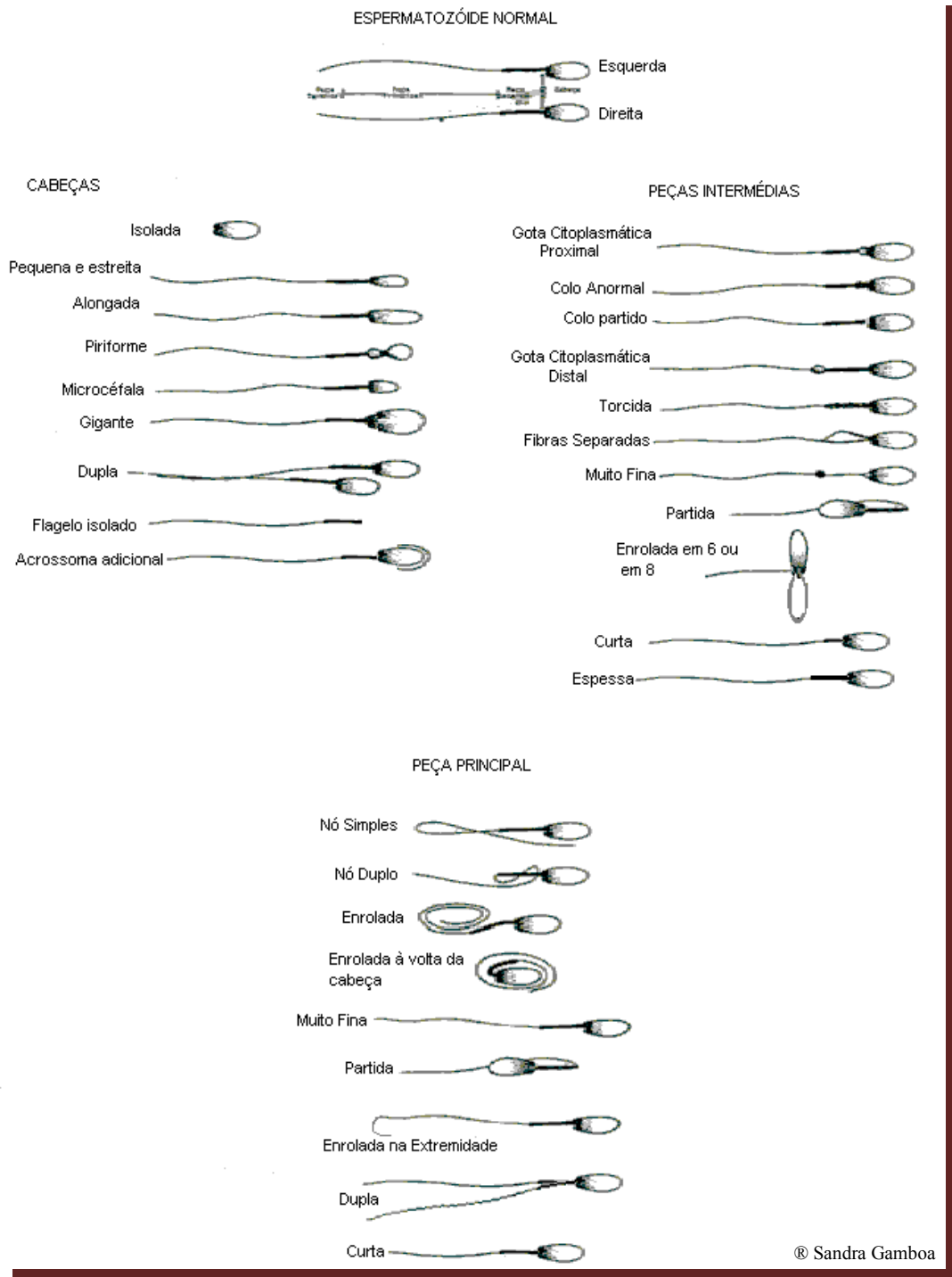


Figura 3.9. Morfologia de espermatozoides equinos.

(Adaptado de BARRISCO, 1984 e MAPA, 1996)

3.2.2. OUTROS EXAMES

Na generalidade, a mobilidade espermática associada à vitalidade, permite inferir da viabilidade celular. Contudo, células móveis e com membranas intatas não são sinónimo de células competentes para a fertilização uma vez que membranas celulares (plasmática e acrossómica) funcionalmente íntegras são requeridas para que os fenómenos de capacitação, reação acrossómica e interação com o oolema tenham lugar (JEYENDRAN *et al.*, 1984; CORREA e ZAVOS, 1994).

i. TESTE HIPO-OSMÓTICO

O teste hipo-osmótico (teste HOS) tem sido apontado como um teste útil para estimar a proporção de células com membranas funcionalmente intatas presentes num ejaculado. O princípio do teste baseia-se nas propriedades elásticas e de permeabilidade selectiva da membrana

plasmática, que fazem com que a célula se comporte como um osmómetro ideal. O influxo de água aumenta o volume celular e provoca a dilatação do plasmalema, nomeadamente na região do flagelo que se enrola sobre si próprio (*vide* Figuras 3.10 e 3.11). Esta característica é considerada como resposta positiva ao teste (HOST+) pois traduz a integridade física e a funcionalidade ativa da membrana plasmática (JEYENDRAN *et al.*, 1984, CORREA e ZAVOS, 1994) e é facilmente observada por microscopia de campo claro e/ou de contraste de fase. A osmolaridade ideal da solução é a que proporciona a maior percentagem de espermatozoides HOST+ sem redundar na lise das células (ROTA *et al.*, 2000). A osmolaridade crítica para os espermatozoides equinos foi calculada em 47 mOsm (NOILES *et al.*, 1993) pelo que amostras de sémen (100µl) foram expostas a uma solução hipo-osmótica (50mOsm) de sais de Hanks com Hepes (HH: 1,3 mM CaCl₂.2H₂O; 0,3 mM Na₂HPO₄.12H₂O; 0,4 mM KH₂PO₄; 5,4 mM KCl; 0,8



Figura 3.10. Diferentes tipos de enrolamento do flagelo observados nos espermatozoides equinos quando sujeitos a condições hipo-osmóticas (50mOsm).

mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 26 mM $C_8H_{18}N_2O_4S$; 5,5 mM $C_6H_{12}O_6$; 417 mM $NaHCO_3$; COGNARD, 1996), incubadas por 10 minutos e observadas por microscopia de campo claro (Laborlux 12, Leica). De forma a eliminar possíveis erros de interpretação, a incidência de flagelos enrolados no sémen em natureza foi determinada no meio isotónico (HH 300 mOsm).

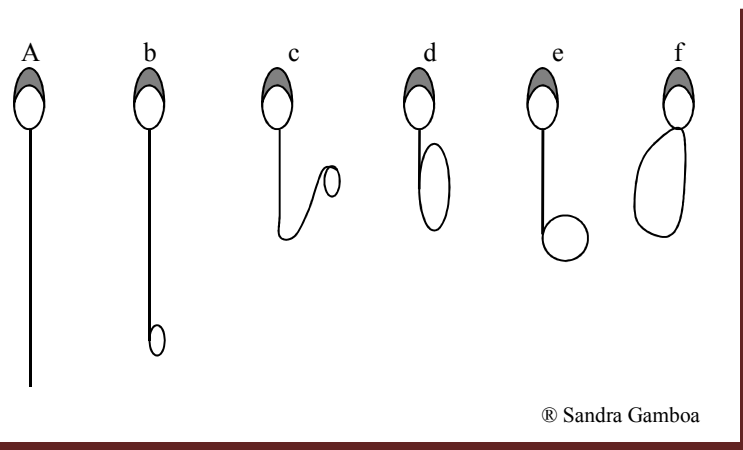


Figura 3.11. Representação esquemática dos diferentes tipos de enrolamento do flagelo (b a f) observados nos espermatozoides equinos quando sujeitos a condições hipo-osmóticas (50mOsm).

(adaptado de NEILD *et al.*, 1999)

ii. ESTADO DO ACROSSOMA

Contrariamente a outras espécies pecuárias, como a suína (GADELLA *et al.*, 1991), cuniculus, bovina e ovina (CROSS e MEIZEL, 1989), na espécie equina, o acrossoma não é visível em microscopia de contraste de fase devido às reduzidas dimensões desta estrutura. As colorações combinadas bicromáticas (Diff-Quik® e Hemacolor®) e tricromáticas (Spermac®) põem em evidência o acrossoma de uma forma subtil, para além de que alguns dos componentes destes kites exibem metacromasia elevada, o que dificulta a avaliação. Mesmo para um observador treinado, os diferentes padrões/intensidades de coloração tornam difícil estabelecer com precisão a diferença entre um espermatozoide com acrossoma íntegro daquele com alterações à sua integridade.

A integridade do acrossoma pode ser acedida por várias técnicas que empregam fluorocromos (THOMAS *et al.*, 1997). CASEY *et al.*, (1993) e MEYERS *et al.* (1995) confirmaram, por microscopia electrónica, a utilidade dos métodos que usam lectinas vegetais, como a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) e de *Arachis hypogaea* (PNA), conjugadas ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), no acesso à integridade do acrossoma. A PSA tem elevada afinidade por terminais α -D-glucosil e α -D-manosil de resíduos de glicoproteínas da matriz acrossómica e liga-se preferencialmente à α -manose presente no conteúdo do acrossoma (CROSS, LAMBERT e SAMUELS, 1986). Nestes métodos, o termo acrossoma reagido emprega-se para designar a perda do acrossoma, tanto por reacção acrossómica como por danos estruturais. A interpretação do resultado depende da metodologia empregue: se as células forem permeabilizadas antes da ligação ao PSA-FITC, a presença ou ausência de fluorescência indica acrossoma intato ou acrossoma reagido/ausente; se a metodologia não envolver permeabilização a presença ou ausência de fluorescência indica acrossoma reagido/ausente ou acrossoma-intato.

Uma solução de PSA-FITC (L0770, Sigma, St. Louis, MO, USA) foi preparada dissolvendo 2 mg de PSA-FITC em 2 ml de sais de Hanks com Hepes (HH), que se distribuíram em aliquotas e se armazenaram a -20°C . Amostras de esperma foram diluídas em HH BSA (1%) a 35°C (20×10^6 spz/ml) e fixadas em paraformaldeído a 2% por 10 minutos, a 20°C . Após centrifugação ($600 \times g$ for 3 min), as células foram permeabilizadas por 30 minutos, a 4°C , com etanol a 95% em HH BSA (1:1, vol). Após lavagem em HH BSA, os acrossomas foram marcados com a solução de PSA-FITC (1mg/ml) (COGNARD, 1996).

Montaram-se $5,5\mu\text{l}$ da preparação, entre lâmina e lamela vedada com verniz, à temperatura ambiente e observaram-se 200spz por lâmina em pontos não contíguos com recurso a um microscópio de fluorescência (HUND H 600 AFL, filtro de fluoresceína $\lambda_{\text{excitação}}=494\text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}}=520\text{ nm}$).

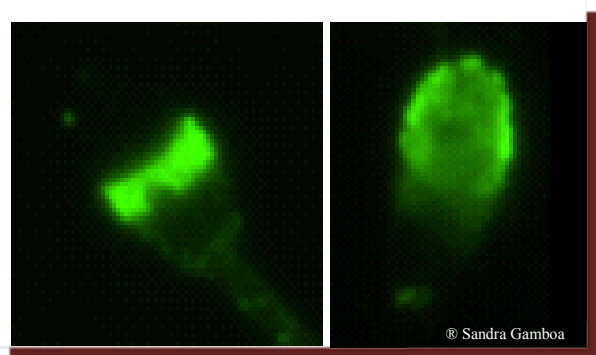


Figura 3.12. Espermatozoides marcados com PSA-FITC

A imagem da esquerda corresponde a um espermatozóide com acrossoma reagido e a da direita a um espermatozóide com acrossoma intato

Os padrões de marcação observados (Figura 3.12) circunscreveram-se às regiões apical e equatorial do acrossoma. Na região apical, fluorescência verde homogénea indica um acrossoma intato e fluorescência verde heterogénea aponta para um acrossoma já em processo de vesiculação ou de alteração à estrutura da membrana acrossómica externa. Ausência de fluorescência na região apical e equatorial interpreta-se como perda completa da membrana acrossómica externa enquanto fluorescência só na região equatorial indica a perda da membrana acrossómica externa somente na região apical.

3.3. VALORIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO ESPERMA

Contrariamente ao esperma do homem, touro ou varrasco, no sémen em natureza do garanhão os espermatozoides perdem mobilidade rapidamente (BARRISCO, 1984), sendo necessário diluí-lo de imediato, após recolha, num meio (ou diluidor) apropriado capaz de manter a viabilidade celular. A valorização do esperma tem, pois, como objectivo preservar o poder fecundante dos espermatozoides acrescentando a grande vantagem de poder veicular um número de células suficientes para garantir uma fecundação. Os diluidores a utilizar diferem segundo o tempo de conservação do esperma/momento da inseminação artificial (*vide* BRINSKO e VARNER, 1993). para revisão).

A manutenção da viabilidade celular por ação de temperaturas baixas constatada, em 1776, por Lazaro Spallanzani em espermatozoides de rãs, equinos e humanos, constituiu o primeiro grande marco das tecnologias reprodutivas. O segundo foi a descoberta do glicerol como crioprotector, por Ernest J. C. Polge e seus colaboradores, em 1949 (*apud* CLARKE *et al.*, 2006 e GROBFELD *et al.*, 2008). Desde então, progressos notáveis se têm verificado para as mais variadas espécies animais. Nos equinos, procura-se adequar os diluidores, o acondicionamento, a temperatura e a duração da conservação de forma a maximizar o potencial de fertilidade da amostra (BATELLIER, 1997). Assim, as temperaturas classicamente utilizadas são as de refrigeração (4-5°C e 15°C) e as de congelação em azoto líquido (-196°C).

Considerando as recomendações dos Serviços Coudélicos Franceses (French National Studies; MAPA, 1996) (Tabela 3.1), o leite comercial ultra-pasteurizado (UHT), meio-gordo, adicionado de Penicilina (50000 UI/L) e Gentamicina (50 mg/L) foi utilizado para a valorização do esperma. Amostras de sémen foram diluídas em leite UHT a uma concentração de 20×10^6 PMS/mL de leite. Para amostras com mobilidade baixa (< 40%) procurou-se sempre não ultrapassar a relação 1/3 de sémen para 2/3 de diluidor.

Tabela 3.1. Diferentes diluidores em função do momento da IA

Tempo entre a recolha e a inseminação artificial	Técnica Utilizada	Diluidor Utilizado
0 h	Sémen fresco (IA imediata)	<u>Leite UHT, meio gordo (AB)</u>
0,5 h		Kenney (AB) INRA 82 (AB)
↓	Sémen fresco (IA diferida)	<u>Leite UHT, meio gordo + AB</u>
12 h		Kenney + AB INRA 82 + AB
↓	Sémen refrigerado (IA diferida)	Leite UHT, meio gordo + AB
24 h		<u>Kenney + AB</u> <u>INRA 82 + AB</u>
↓	Sémen congelado (IA diferida)	2 diluidores de congelação + AB (técnica INRA84)

Nota: (AB): Antibióticos; é desnecessária a utilização de antibióticos em doses para utilização em IA na primeira meia hora após colheita. Diluidores sublinhados: os mais indicados de acordo com o momento da IA. *Adaptado de MAPA, 1996.*

Na refrigeração do esperma tratado neste trabalho, conservaram-se as amostras a 4°C, em anaerobiose. Para amostras acondicionadas em seringas de 20 mL (B|BRAUN Injekt®, Melsungen, Alemanha), não se deixou ficar ar entre o êmbolo e a amostra, sendo a seringa posteriormente introduzida num tubo de poliestireno; para amostras acondicionadas em tubo, utilizaram-se tubos estéreis de 12 mL (polipropileno, 17/77mm; Greiner Bio-One GmbH, Alemanha), que foram seguidamente acomodadas em tubos cónicos de 50 mL (polipropileno, 29,5/114,5mm, com tampa de polietileno de alta densidade, Greiner. Bio-One GmbH, Alemanha) (MAPA, 1996). Tanto o tubo de poliestireno como o cónico têm por função permitir que as trocas de temperatura que se produzem se façam de forma gradual, minimizando os efeitos do choque térmico sobre as células. A conservação decorria até às 72 horas.

3.4. APLICAÇÃO DO ESPERMA

O fim último das tecnologias que sobre o esperma se aplicam não pode deixar de ser a inseminação artificial (IA). Por esta via se deposita no útero da fêmea em cio o número mínimo de células espermáticas (200×10^6) necessárias para garantir uma fecundação.

Para a detecção do cio (estro) das éguas observou-se o grau de receptividade das fêmeas na presença de um rufião. Face a este, a fêmea em estro faz a paragem ao macho, levanta e põe de lado a cauda e exhibe contrações rítmicas do clitóris acompanhadas (ou não) de micções. A presença (+) e/ou ausência (-) destes sinais comportamentais foi tomada como índice da fase do estro. Na presença de 3 sinais positivos a fêmea foi sujeita a exame ginecológico e obstétrico, coadjuvado por ecografia, de acordo com o preconizado pela Escola de Medicina Veterinária de Hannover (MACHADO-FARIA, 1991).

Durante o estro, a porção da cérvix que se projecta para dentro da cavidade vaginal (a *portio vaginalis*) apresenta abertura e flacidez variáveis, podendo ser visualizada com o auxílio de um espéculo iluminado ou palpada através da parede vaginal. Na fase pré-ovulatória, a abertura e flacidez do colo uterino é máxima, o que permite a sua fácil transposição pelo cateter de inseminação artificial.

O exame obstétrico, realizado por Médico Veterinário, permitiu avaliar, em tempo real, quer a fase do ciclo éstrico, quer a dinâmica folicular, a iminência da ovulação (Figura 3.13), assim como a presença de corpos lúteos.

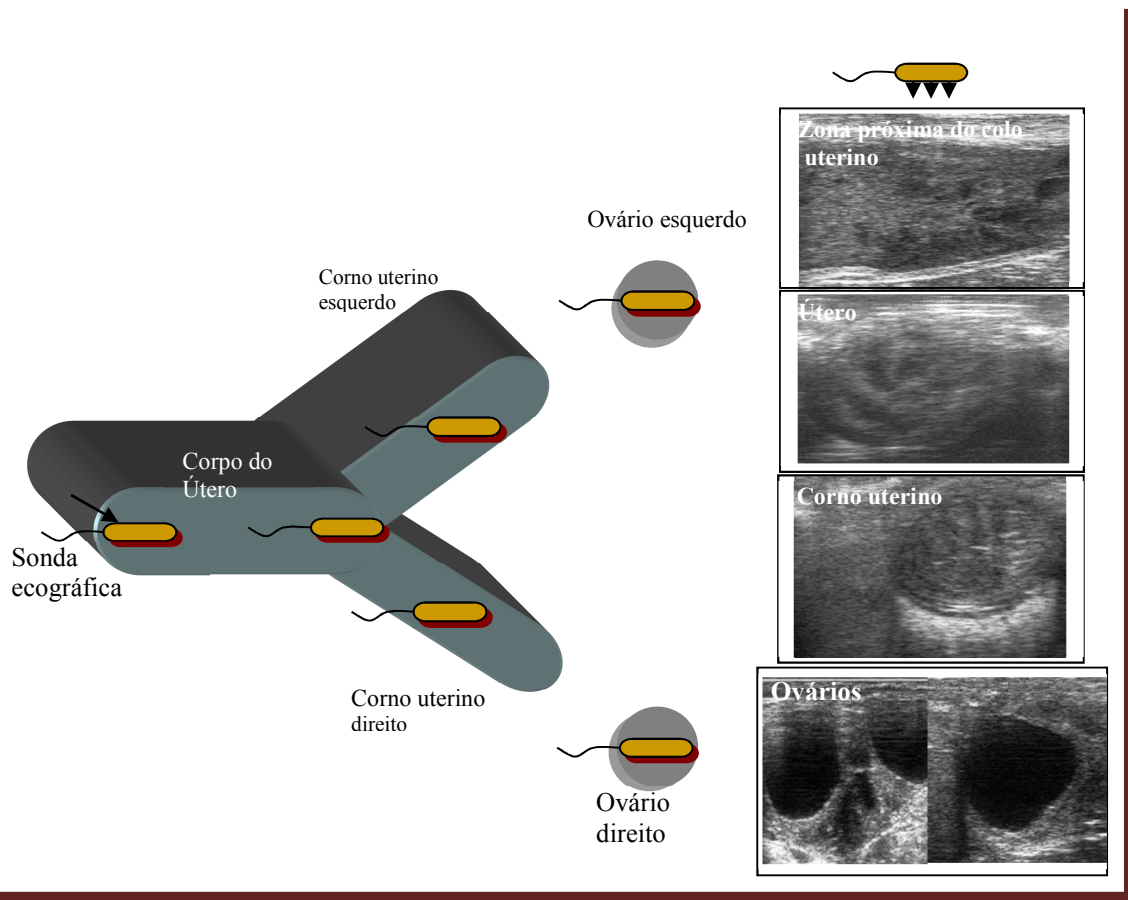


Figura 3.13. Representação esquemática de exame ecográfico trans-rectal.

Aspecto das estruturas uterinas e ováricas. As imagens ecográficas foram adquiridas com ecógrafo Aloka SSD 500 e sonda de 5MHz (UST 5871-5) obtendo-se cortes longitudinais no corpo do útero e sagitais nos cornos uterinos; imagens obtidas por sonda manipulada por Manuel Machado-Faria (MDV). (Adaptado de MAPA, 1996)

As inseminações foram praticadas, segundo a técnica desenvolvida na escola de Medicina Veterinária de Hannover, por transposição da cérvix com o auxílio de um cateter de inseminação (Minitub GmbH, Alemanha) orientado em direcção ao corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o folículo pré-ovulatório. As IA iniciaram-se quando se detectou um folículo com um diâmetro ≥ 35 mm e repetiram-se todas as 48 horas até se constatar a ovulação. A figura 3.14 ilustra os procedimentos adoptados para as doses acondicionadas em seringa (A) ou em tubo (B), respectivamente.

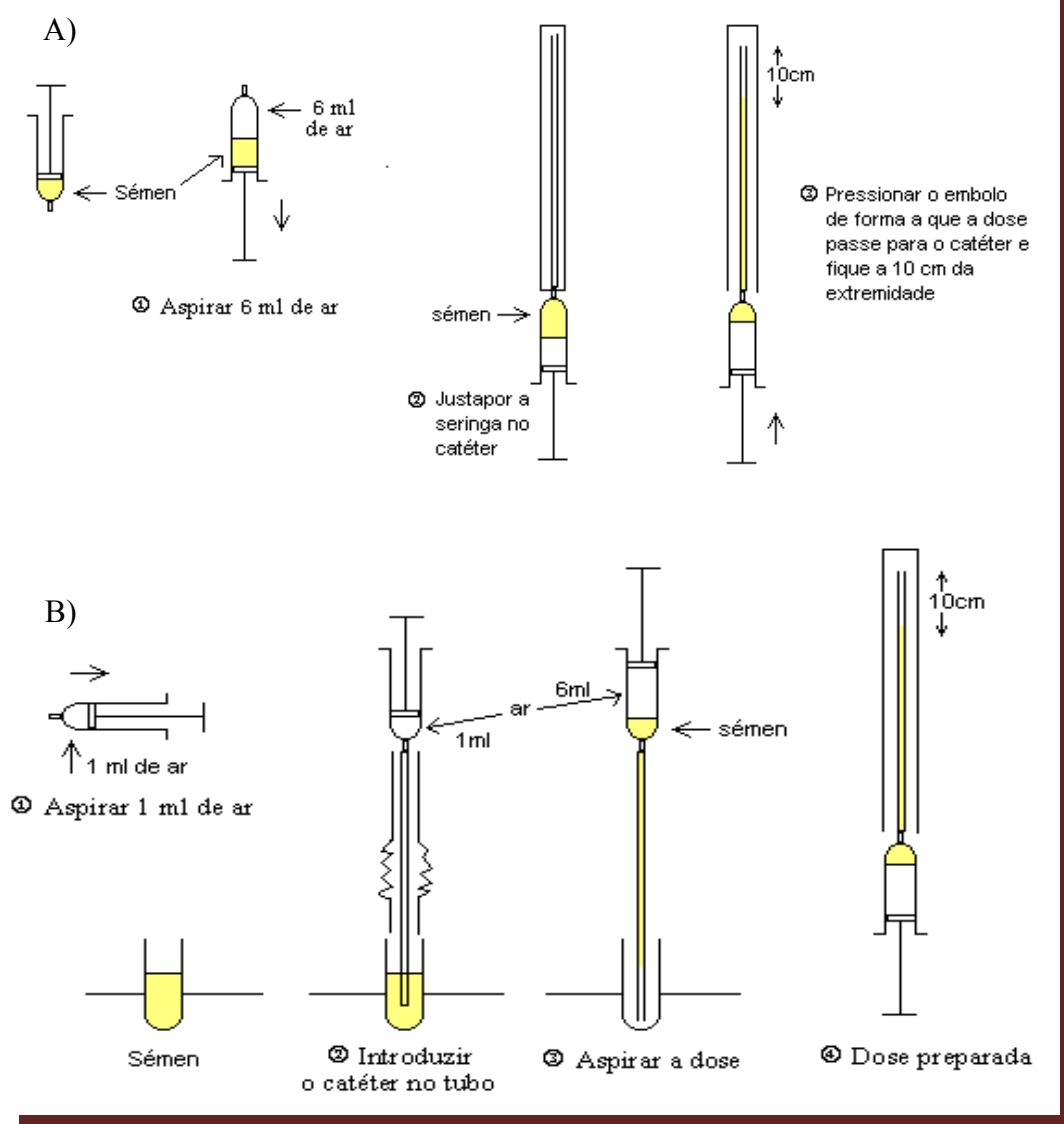


Figura 3.14. Preparação do cateter de inseminação artificial para doses acondicionadas em seringa (A) e em tubos (B).

(Adaptado de MAPA, 1996)

3.5. ÍNDICES REPRODUTIVOS

Para o cálculo dos índices reprodutivos (fertilidade por ciclo -FC- e fertilidade no final da época de reprodução - FER) utilizou-se o método preconizado pelos Serviços Coudélicos Franceses (French National Studies; MAPA, 1996). Relativamente a cada garanhão, registou-se a situação de cada égua assinalando a coluna pertinente constante da tabela 3.2 [diagnóstico de gestação positivo (DG⁺, DG⁺⁺), negativo (DG⁻) ou

desconhecido (DG?), assim como o número de ciclos com DG positivo seguidos de mortalidade embrionária (ME)] e determinou-se: o número total de fêmeas beneficiadas (B+C+D), o número deaios fecundos (P+C), o número de ciclos com resultado conhecido (A-B), o número de éguas prenhes (C) e daquelas cujo resultado de gestão se desconhecia (B).

Tabela 3.2. Grelha de registo para determinação dos índices reprodutivos
(Adaptado de MAPA, 1996)

Nº da Égua ou Nome	Nº do último cio aproveitado	ME	DG?	DG ⁺ DG ⁺⁺	DG ⁻
	A	P	B	C	D
Soma dos nºs de cada linha		Nº de cruces presentes em cada coluna			

Os índices reprodutivos Fertilidade por Cio (FC) e Fertilidade no final da Época de Reprodução (FER) foram calculados por aplicação directa das fórmulas seguintes:

$$FC = [(C+P)/(A-B)] \times 100$$

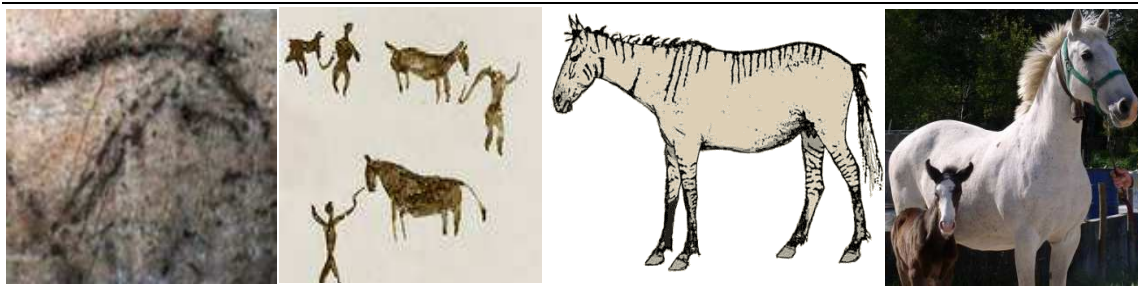
$$FER = [(C + (\%DG? \times FC))/(B+C+D)] \times 100.$$

CAPÍTULO 3

OBTENÇÃO, EXAME, VALORIZAÇÃO, CONSERVAÇÃO E APLICAÇÃO DO ESPERMA

CAPÍTULO 4

CARATERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE GARANHÕES LUSITANOS E SORRAIAS



SUMÁRIO

Neste capítulo é descrito o estudo efectuado sobre as características seminais de garanhões Lusitanos (PSL) e Sorraia. Para os garanhões PSL, compararam-se as características seminais definidas por um só ejaculado com aquelas definidas por múltiplos ejaculados reunindo-se, para o efeito, os dados relativos a 152 espermatozoides obtidos de 152 machos presentes a concurso para admissão ao livro de reprodutores assim como os dados relativos a 371 ejaculados obtidos de 9 garanhões que fizeram épocas reprodutivas no Posto de Cobrição da Escola Superior Agrária de Coimbra. Estas amostras de sémen foram comparadas tanto com 113 ejaculados obtidos de 4 cavalos do Sorraia como com 361 ejaculados obtidos de 7 garanhões de outras raças europeias e avaliadas em termos do seu uso em programas de inseminação artificial e capacidade de conservação. Dos parâmetros seminais avaliados na raça PSL, a mobilidade, morfologia e pH espermáticos após colheita diferem significativamente ($P < 0,05$) entre “colheita única/múltiplos garanhões” e “múltiplas colheitas/garanhão” sem que se tenham observado efeitos da idade sobre os parâmetros avaliados. Na generalidade dos dados é notório o efeito do garanhão ($P < 0,05$) enquanto fator individual de variação sobre as características do espermatozoide. Na raça Lusitana, os parâmetros espermáticos são similares aos descritos para a generalidade das outras raças equinas, contrariamente ao cavalo do Sorraia que apresenta valores marginais e baixos índices reprodutivos. Em termos médios, a fertilidade na raça lusitana rondou os 85% e os parâmetros seminais que revelaram influenciar os índices reprodutivos foram a mobilidade, a vitalidade e o pH espermáticos após colheita.

Infertilidade Equina: múltiplas fragilidades ou um fado do espermatozoide?

Sandra Cristina de Oliveira Pinto Gamboa

Universidade de Coimbra, 2011

De acordo com o nº2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº388/70 foram utilizados na elaboração deste capítulo alguns resultados anteriormente publicados:

(i) Em jornais internacionais com refere

Gamboa S, Machado-Faria M, Ramalho-Santos J. - Seminal traits, suitability for semen preservation and fertility in the native Portuguese horse breeds Puro Sangue Lusitano and Sorraia: Implications for stallion classification and assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**. ISSN: 0378-4320. 113:1-4 (2009), 102-13.

(ii) Em encontros científicos nacionais

Gamboa, S. - Características seminais, capacidade de preservação e fertilidade no Puro Sangue Lusitano: implicações na classificação de garanhões e reprodução assistida. Mesa Redonda: O cavalo Lusitano. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. 17 de Outubro de 2009, Lisboa.

*De todo o conjunto de referências míticas transmitidas pelos autores clássicos,
De todo o conjunto de referências míticas transmitidas pelos autores clássicos,
duas parecem todavia, ser efectivamente ocidentais: o mito da fundação de Habis...
e o mito do vento Zéfiro (ou Favónio) que fecundava as éguas de certa
região da Lusitânia, tornando, por isso, os cavalos dessa zona invulgarmente velozes...”*
Carlos Fabião, História de Portugal, vol I, pp. 79-119

4.1. INTRODUÇÃO

Não sendo do foro desta tese a caracterização detalhada das raças autóctones de Portugal¹ - o cavalo de Puro Sangue Lusitano (PSL), o cavalo do Sorraia e o pônei Garrano - não podemos deixar de fazer uma breve referência à génese dos nossos cavalos, nomeadamente o PSL e o Sorraia, porquanto estas duas constituem objecto deste capítulo e se afigura importante contextualizar no tempo e no espaço o que o passado nos legou.

4.1.1. A RAÇA LUSITANA E O CAVALO DO SORRAIA: UM POUCO DE HISTÓRIA

A história dos cavalos na Península Ibérica perde-se no tempo e funde-se com a história evolutiva dos cavalos em geral e com a história do homem, em particular. O registo fóssil e arqueológico, a par de argumentos filológicos e literários, indicam que o *Equus caballus* persistiu na Península Ibérica desde o Pleistoceno chegando aos nossos dias com as modificações impostas pela domesticação e selecção (natural e humana).

Estudos recentes indicam que não terá sido um único evento de domesticação a dar origem à generalidade dos atuais animais de produção mas sim múltiplos, em áreas geográficas distintas. (*vide* BRUFORD, BRADLEY e LUIKART, 2003, para revisão). O cavalo atual não parece ser excepção conforme sugerem os estudos de VILÀ *et al.* (2001), LISTER *et al.* (1999) e LOPES *et al.* (2005) (*vide* KAVAR e DOVČ, 2008, para revisão). JANSEN *et al.* (2002), ao estudarem as origens do cavalo doméstico com base na análise do ADN mitocondrial, identificaram 17 *clusters* filogenéticos distintos mas só 3 deles com

¹ O leitor interessado encontrará nas obras de alguns autores como ANDRADE (1937), OOM (1992), OOM e SERRANO (2006), PORTAS, LEITE e SOUSA (1998), PORTAS *et al.* (2001), PIO de BRAGANÇA *et al.* (2000), FERREIRA e OOM (1989) e ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE CRIADORES DA RAÇA GARRANA (2001), ASSOCIAÇÃO DE CRIADORES DE EQUINOS DE RAÇA GARRANA (2001, 2006) informação pertinente relativa à evolução e características das raças nacionais.

correspondência a raças e/ou áreas geográficas específicas, a saber: os cavalos Przewalski, os pôneis do norte da Europa² e as raças equinas do norte de África e do sudoeste da Península Ibérica. Estes resultados foram posteriormente confirmados por ROYO *et al.* (2005) e WARMUTH *et al.* (2011).

As raças equinas do sudoeste da Península Ibérica tiveram, até finais da década de 60 do século XX, como representante máximo o então denominado *cavalo peninsular* ou *ibérico* (*Ginete ibérico*, ANDRADE, 1988). As referências a este tipo de cavalo remontam à antiguidade³ e acredita-se que terá sido montado desde o Neolítico para práticas guerreiras (Andrade, 1954, *apud* OOM, 1992) constituindo, assim, o primeiro cavalo de sela do mundo (ANDRADE, 1988). Curiosamente, tanto portugueses como espanhóis reclamam, respectivamente, para o cavalo Lusitano e para o cavalo de Pura Raça Espanhola, o epíteto de “o cavalo que deu origem às raças de sela atuais”.

O cavalo lusitano aparece referenciado como tal a partir da institucionalização do Livro Genealógico Português de Equinos, em 1967. Até então, andaluzes (hoje Pura Raça Espanhola) e lusitanos encontravam-se reunidos sob a mesma designação, o já acima referido cavalo peninsular ou ibérico, apesar de uma separação se ter iniciado no séc. XVIII, no reinado de D. João V, quando o Rei Filipe V de Espanha, proíbe as touradas em território espanhol. Em Portugal, D. João V, quiçá influenciado por sua esposa, D. Mariana, vienense da Casa da Áustria, (COIMBRA, 2005), persiste na manutenção da tradição da tourada a cavalo criando, mesmo, uma Coudelaria Real (em 1748) na Coutada do Arneiro, em Alter-do-Chão⁴, com vista à criação de cavalos para a Picaria Real. A partir de então, criadores portugueses e espanhóis passam a seleccionar os seus animais em função de critérios funcionais distintos: se aos espanhóis interessavam mais os aspectos estéticos, tanto do modelo como dos andamentos (o objectivo era um cavalo de tiro ligeiro e de passeio), já os criadores Lusos primavam

² Representados pelas raças Fjord, Icelandic, Scottish Highland e Exmoor. Esta última, apresenta-se filogeneticamente relacionada com a raça portuguesa Garrano (OOM, 2000), preservada desde 1993 com a constituição do Registo Zootécnico e continuada, a partir de 1996, pelo Livre Genealógico, mantido pela Associação de Criadores de Equinos de Raça Garrano (ACERG) (PORTAS e LEITE, 2000; PORTAS *et al.*, 2001) e atualmente candidata a Património Nacional (IPVC, 2011).

³ Testemunham-no as obras de pensadores romanos e gregos, como Virgílio e Homero, mas também as de autores práticos como Varro, Columela, Xenofonte e Plínio.

⁴ A Coudelaria de Alter-do-Chão é a mais antiga coudelaria do mundo a funcionar no mesmo local, desde a sua fundação.

pela manutenção de características de flexibilidade, elegância e garbo dos movimentos, essenciais não só para proporcionar o gáudio popular nas corridas de touros (BARBOSA e ABREU, 1986; ANDRADE, 1988), mas também para a utilização rural que do cavalo era feita, mormente o maneio do gado.

Sob o ponto de vista zootécnico, o termo Lusitano aplicado a cavalos nascidos e criados em Portugal surge pela mão de Silvestre Bernardo Lima, em 1885, nos seus estudos das raças de animais domésticos em Portugal (PINTO, 2007). Essa designação passa a ser oficialmente adoptada em 1942 para os cavalos nascidos e registados no território nacional que apresentassem características que os permitissem inscrever no, até então, *Stud Book* Português, criado em 1889 e que abrangia, indistintamente, todas as raças de equídeos (ANDRADE, 1988). Curiosamente, esta medida é tomada como consequência da imposição feita, nesse mesmo ano (1942), pelos espanhóis, de denominar os cavalos nascidos e registados em Espanha por Cavalos de Pura-Raça-Espanhola (PRE) (ANDRADE, 1988).

Em 1967, o *Stud Book* evolui para o Registo Genealógico Português de Equinos que passa a apresentar-se organizado em secções, tantas quantas as raças ou grupos étnicos com registos organizados, e a cargo da Associação Portuguesa de Raças Selectas. A partir de 31 de Dezembro de 1989, a preservação e melhoramento do cavalo lusitano com vista ao aperfeiçoamento zootécnico da raça passou para o Livro Genealógico do Cavalo da Raça Lusitana (também designado por *Stud-Book* da Raça Lusitana) atualmente mantido pela Associação Portuguesa de Criadores do Cavalo Puro Sangue Lusitano (APSL).

O padrão racial do cavalo lusitano encontra-se definido pelo *Stud Book* (APCRS, 1989). É reconhecido como um animal sofredor mas de temperamento dócil, nobre, generoso e ardente. Seleccionado como cavalo de raça e de combate ao longo dos séculos, manifesta uma tendência natural para os exercícios da gineta (combate, caça, toureio, maneio de gado) apresentando-se versátil e apropriado para competir em quase todas as modalidades do moderno desporto equestre, sendo também bastante apreciado como montada de lazer (APSL). Atualmente, é a principal raça autóctone de Portugal, representada por cerca de 7000 cabeças, seguida da raça Garrano, com 1500 exemplares

(Fundação Alter Real – FAR) e da raça Sorraia, com cerca de 200 animais (OOM e SERRANO, 2006). No conjunto, o efectivo equino autóctone representa cerca de 24,23% do efectivo equino nacional⁵ e é criado com maior expressão nas regiões de Entre Douro e Minho, Ribatejo e Oeste e Alentejo (*vide* Figura 4.2).

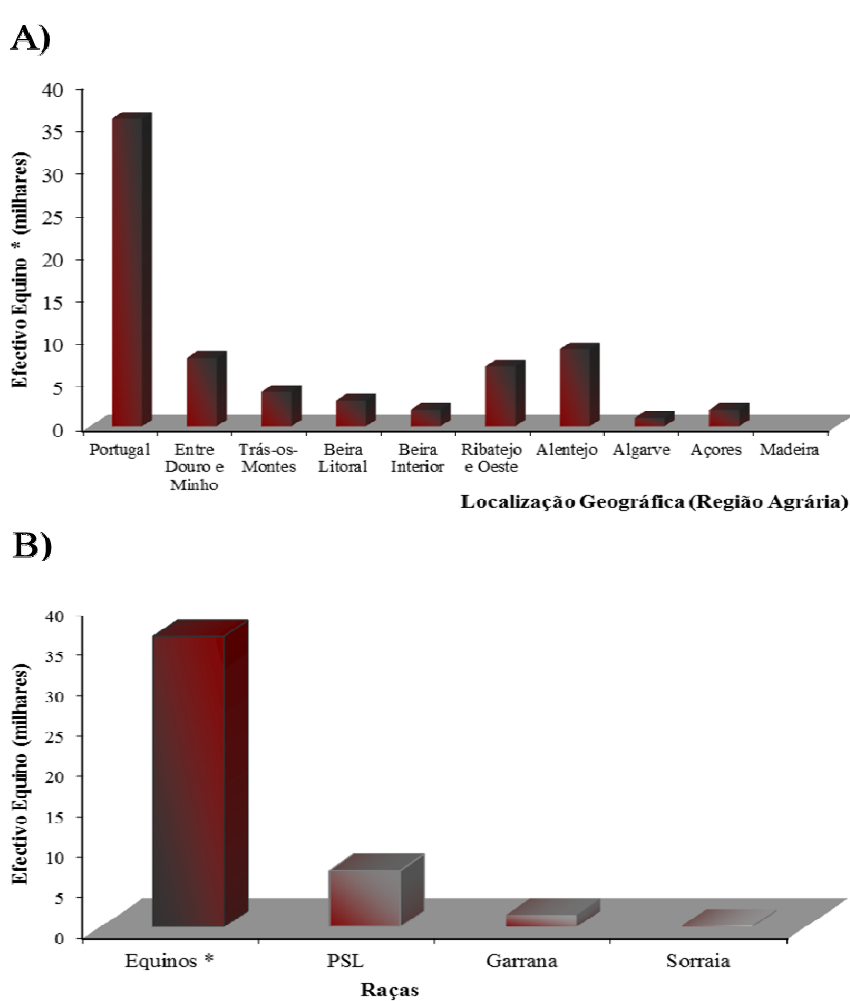


Figura 4.2. Distribuição das raças equinas autóctones em função da localização geográfica (A) e da raça (B)

Fonte: *- Dados do INE relativos ao período de 2009(INE, 2011).

#- Dados da Fundação Alter Real (FAR, 2011)

⁵ Segundo os dados do INE (2011), relativos ao período de referência de 2009, o efectivo equino Nacional é de 35 913 animais.

O cavalo do Sorraia permaneceu “mais ou menos desconhecido” até à década de 20 do século passado, altura em que o Hipólogo Dr. Ruy d’Andrade, o redescobriu na região compreendida entre Mora e a Lezíria de Vila Franca de Xira (ANDRADE, 1937). Ao adquirir, em 1937, um núcleo de 7 fêmeas e 4 machos daquele tipo equino garantiu a sua continuidade (OOM, 1992) uma vez que o restante efectivo, existente até então, desapareceu por completo. Atualmente, designada por raça Sorraia, o efectivo global ronda as duas centenas de animais, dos quais 112 são fêmeas adultas, segundo informação da Associação Internacional de Criadores do Cavalo Ibérico de Tipo Primitivo – Sorraia (abreviadamente designada por AICS), distribuídos por 10 criadores em Portugal Continental, 8 na Alemanha, 1 nos Estados Unidos da América e 1 no Brasil. A AICS encarrega-se de gerir o Livro Genealógico da Raça, oficialmente reconhecido a 12 de Janeiro de 2005. O padrão racial da raça encontra-se também definido no Stud Book (AICS, 2004). Considerado como um cavalo de tipo primitivo, de pelagem baio-pardo ou rato-pardo e evidenciando a presença de lista de mulo e de zebruras nos cabos, apresenta-se, segundo estudos com base no ADN mitocondrial, muito pouco relacionada com as outras raças ibéricas como o PSL e a PRE (JANSEN *et al.*, 2002; ROYO *et al.*, 2005) apesar de existir um fundador comum a PSL e Sorraia (LUÍS *et al.*, 2006).

Numa época em que a preocupação pelo atual estado dos recursos naturais impõe questionar o impacto das populações humanas na conservação dos ecossistemas, os animais domésticos passam a ser reconhecidos como uma parte importante da biodiversidade, enveredando-se esforços no sentido da sua preservação. Planos de conservação e manutenção das nossas raças autóctones têm sido traçados não olvidando que os produtores representam os guardiões desta biodiversidade⁶. Tanto o cavalo do Sorraia como o pônei Garrano são considerados pela FAO⁷ (2000) como raças ameaçadas. A primeira é classificada como mantida de forma crítica e a segunda como mantida em

⁶ A Portaria n.º 229-B/2008 publicada no *Diário da República*, 1.ª série — N.º 47 — 6 de Março de 2008 aprova o Regulamento de Aplicação da Medida n.º 2.2, «Valorização de Modos de Produção», do Subprograma n.º 2 do Programa de Desenvolvimento Rural do Continente (PRODER, que integra a Ação n.º 2.2.2, designada «Protecção da Biodiversidade Doméstica» (CAPÍTULO III). Para efeitos dessa ação, as raças equinas autóctones Sorraia, Garrano e Lusitano são consideradas ameaçadas e classificadas quanto ao grau de risco de extinção, respectivamente como rara (particularmente ameaçada), muito ameaçada e ameaçada (*Artigo 13.º anexo V*).

⁷ The Food and Agriculture Organization of the United Nations

perigo de extinção uma vez que o seu efectivo, que contava com cerca de 2000 animais no início do século XXI (dos quais 1000 e 30 correspondentes, respectivamente, a éguas de ventre e a garanhões, de acordo com PORTAS e LEITE, 2000), tem vindo a diminuir (1800 cabeças, em 2010 – IPVC, 2011), quiçá em virtude da população se encontrar dividida em pequenos grupos (subpopulações), com algum grau de consanguinidade inter-grupo e de afastamento genético entre grupos (OOM, 2001), dispersos pelas regiões do Minho e de Trás-os-Montes e criados em regime de liberdade quase total. Se a predominância do regime não estabulado conferiu a estes animais a sua adaptação às zonas de montanha, menos favorecidas (CACHO, 2001), também os tornou mais vulneráveis ao ataque de predadores, nomeadamente do lobo ibérico, sobre poldros com menos de 3 meses de idade (GOMES e OOM, 2000).

Tanto a ACERG como a AICS têm desenvolvido trabalhos notáveis no sentido da caracterização das raças que representam e defendem. Relativamente ao cavalo do Sorraia, a Prof^ª. Dr^ª. Maria do Mar Oom e o seu grupo caracterizaram a raça sob o ponto de vista genético, demográfico, etológico e morfológico. Tais estudos revelaram uma variabilidade genética reduzida (LUÍS, COTHRAN e OOM, 2007; LUÍS *et al.*, 2007) e níveis elevados de consanguinidade em resultado do efeito fundador, do total isolamento genético da raça desde a sua fundação e dos sistemas de selecção/reprodução adoptados (OOM e SERRANO, 2006). Vários estudos, realizados tanto em populações humanas como em espécies domésticas (WILD *et al.*, 1982; MAXIMINI *et al.*, 2011), incluindo equinos (KLEMETS DAL e JOHNSON, 1989; van EL DIK *et al.*, 2006), e selvagens (WILD *et al.*, 1983; WILD *et al.*, 1987), sugerem que os efeitos da fraca variabilidade genética e da consanguinidade afectam negativamente a eficiência reprodutiva, quer por via da qualidade do esperma (FITZPATRICK e EVANS, 2009;), nomeadamente a condição de teratozoospermia (PUKAZHENTHI *et al.*, 2006), quer por falhas no desenvolvimento do embrião e/ou do neonato (KELLER e WALLER, 2002).

Qualquer processo metodológico conducente a incrementar a fertilidade ou prolificidade de uma dada espécie requer um conhecimento profundo da biologia reprodutiva dessa espécie. Relativamente ao cavalo do Sorraia, e conhecidas que são as particularidades da reprodução nos equinos, falta definir o padrão seminal da raça e a capacidade dos seus espermatozóides suportarem as tecnologias de conservação *ex-situ*.

Quanto ao Puro Sangue Lusitano (PSL), a institucionalização oficial do Stud Book resultou num processo de selecção dos machos que condiciona a sua admissão ao Livro de Reprodutores em função das características morfofuncionais definidas no padrão da raça. Os machos aprovados segundo esses critérios são sujeitos à avaliação de um ejaculado. Contudo, o padrão espermático da raça também não se encontra definido pelo que os espermogramas efetuados são comparados com os valores estabelecidos para outras raças equinas. Apesar de estarem designados valores considerados normais para a espécie, parece-nos extremamente importante caracterizar o padrão espermático na medida em que diferenças significativas entre raças têm sido referidas por diversos autores (DOWSET e PATIE, 1987; PARLEVLIET e COLENBRANDER, 1999; PARLEVLIET, KEMP COLENBRANDER, 1994), nomeadamente quanto ao volume do ejaculado, mobilidade e concentração espermáticas (DOWSET e PATIE, 1982; DOWSET e KNOT, 1996; PACCAMONTI *et al.*, 1999), características estas de grande relevo nos programas de inseminação artificial e de conservação de esperma. Em suma, reveste-se de importância não só avaliar a qualidade de um ejaculado, comparando os valores de cada parâmetro espermático com o padrão da raça, como também avaliar a capacidade de utilização em programas de inseminação artificial.

Os procedimentos a adoptar para aceder ao potencial de fertilidade de um garanhão têm sido alvo de intenso debate não só entre a comunidade científica mas também entre técnicos e equinicultores pois nem sempre o desejável é compatível com o exequível. Se uns advogam a análise de um mínimo de dois ejaculados obtidos consecutivamente com uma hora de intervalo outros há que defendem que, a par da anterior, se deveria ainda recolher um ejaculado por dia, durante 6 a 7 dias. Esta última abordagem provê mais informação e permite inferir a produção diária de espermatozóides e, conseqüentemente, o número de fêmeas que poderão ser beneficiadas (PICKET, 1993b).

O objectivo do trabalho apresentado no presente capítulo foi estudar as características espermáticas de garanhões da raça Lusitana e de cavalos do Sorraia. Com isto pretendemos contribuir para a definição dos parâmetros seminais nestas raças e para a avaliação da aptidão do esperma para a conservação (4°C) e utilização em programas de inseminação artificial.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Neste estudo utilizaram-se os dados relativos às características espermáticas de ejaculados obtidos desde 1993 a 2007 que foram abordados de acordo com a sua proveniência. Assim, considerou-se um conjunto de informação relativa a espermogramas referentes a: um só ejaculado obtido de múltiplos machos PSL que se apresentaram aos concursos de admissão ao Livro de Reprodutores do PSL, durante a estação de defeso (Setembro-Outubro); múltiplos ejaculados obtidos de um número limitado de animais (PSL, Sorraia e outras raças europeias) aprovados como reprodutores pelos respectivos *Stud-Books*, com ou sem historial de fertilidade, que fizeram épocas de reprodução no Posto de Cobrição da ESAC (Coimbra, Portugal-40°12'54,3" N e 00°41'04,6"E).

Os ejaculados foram obtidos pelo método da VA, sobre uma égua em cio (um só ejaculado/múltiplos garanhões) ou sobre um manequim (tronco modelo Hannover) de colheita (múltiplos ejaculados/garanhão) na presença de uma égua em cio. Para os múltiplos ejaculados/garanhão o número de saltos necessários até se obter um ejaculado foi registado.

Caraterísticas espermáticas de garanhões Puro Sangue Lusitanos (PSL) definidas por uma única colheita por garanhão

Os dados relativos às características espermáticas de 152 ejaculados obtidos de 152 garanhões, com idades compreendidas entre os 3 e os 12 anos de idade foram, primeiramente sujeitos a ANOVA para avaliar o efeito do fator *idade* sobre as características seminais. Uma vez que não foram colocadas em evidências diferenças relativamente a este fator, os dados foram organizados em grupos etários tendo em consideração não só os resultados obtidos por AMANN *et al.* (1979), THOMPSON *et al.* (1979a) e SQUIRES, PICKET e AMANN *et al.* (1979) mas também a frequência de utilização recomendada por PICKET (1993a) em função da idade dos animais. Assim, constituíram-

se 5 grupos: jovens (J1- 3 e 4 anos de idade, $n=30$), adultos (A2 - 5 anos, $n=48$; A3 - 6 anos, $n=27$; A4 - 7 e 8 anos, $n=21$) e maduros (M5 - >9 anos, $n=26$).

Caraterísticas espermáticas de garanhões Puro Sangue Lusitanos (PSL) e Sorraia definidas por múltiplas colheitas por garanhão; utilização e conservação do esperma

Os dados analisados comportaram 484 ejaculados assim distribuídos: 9 garanhões Lusitanos (4 a 21 anos de idade), $n=371$ ejaculados (PSL 1, $n=46$; PSL 2, $n=36$; PSL 3, $n=84$; PSL 4, $n=11$; PSL 5, $n=48$; PSL 6, $n=17$; PSL 7, $n=29$; PSL 8, $n=36$; PSL 9, $n=64$) e 4 garanhões Sorraia (4 a 13 anos de idade), $n=113$ ejaculados (Sorraia 1, $n=8$; Sorraia 2, $n=28$; Sorraia 3, $n=64$; Sorraia 4, $n=13$). Adicionalmente, e de forma a constituir-se uma base de referência, consideraram-se ainda ejaculados ($n=361$) obtidos de 7 garanhões (4 a 20 anos de idade) de diferentes raças europeias: Anglo-árabe (AA), $n=131$; Holsteiner 1 (Hol 1), $n=69$; Baden-Wurtenberger (BW), $n=43$; Selle Français (SF), $n=16$; BWP, $n=27$; Holsteiner 2 (Hol 2), $n=60$; Puro Sangue Inglês (PSI), $n=15$).

Os parâmetros sumários do esperma foram avaliados em cada ejaculado conforme descrito no capítulo 3. Para estimar a capacidade do esperma para a conservação (a 4°C), prepararam-se doses de 10mL [20×10^6 PMS/ml de leite UHT meio-gordo, adicionado de Gentamicina (50 mg/L) e Penicilina (50 000 UI/L)] que após acondicionamento, em anaerobiose, conforme descrito no capítulo 3, foram refrigeradas a 4°C, por 24 h. Findo este período a mobilidade espermática foi avaliada após reaquecimento das amostras, em banho-maria a 35°C por 10 minutos.

Amostras de esperma para IA imediata foram também preparadas de igual forma e um total de 197 éguas foram inseminadas na primeira ½ -1 hora após colheita com 300×10^6 PMS. O não retorno de cio, 13-16 dias após a ovulação e a observação, por exame ecográfico, de uma vesícula embrionária no interior do útero, serviram de método para a constatação de prenhez.

Os índices reprodutivos, fertilidade por ciclo (FC) e fertilidade no final da época reprodutiva (FER), foram calculados de acordo com as regras definidas pelos *Haras Nationaux* Franceses (MAPA, 1996) e descritas no capítulo 3.

4.2.2. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados com recurso aos *softwares* Excel (Microsoft), nas situações gráficas, e SPSS (versão 14.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Uma vez que os pressupostos requeridos para a Análise de Variância a um fator Multivariada (MANOVA) não foram violados para a homogeneidade das variâncias-covariâncias dos dados, utilizámos este método para testar a significância das diferenças entre os grupos etários considerados na abordagem “colheita única/múltiplos garanhões”, para testar a significância das diferenças entre as abordagens “colheita única/múltiplos garanhões” e “múltiplas colheitas/garanhão” na raça Lusitana. Considerou-se um nível de significância $\alpha = 0,05$ (MAROCO, 2007).

Para o conjunto de dados relativos às múltiplas colheitas por animal recorreu-se ainda a análise de variância multivariada a dois fatores (MANOVA) para analisar o efeito do *indivíduo* e do *número de saltos* sobre os parâmetros seminais registados em cada raça. No caso de rejeição da hipótese nula “ H_0 =os valores médios são iguais entre garanhões e entre número de saltos”, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado. Uma comparação múltipla de médias das ordens pelo teste de LSD de Fisher (MAROCO, 2007) serviu para comparar indivíduos e número de saltos enquanto o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney foi aplicado para comparar raças. O coeficiente de variação (CV) permitiu expressar a variação dos parâmetros espermáticos intra- e entre garanhões. Um modelo linear (GLM, dados não balanceados) permitiu estudar a influência da interação entre os fatores *indivíduo* e *número de saltos* sobre as características do esperma. Para avaliar a influência do número de fêmeas beneficiadas por garanhão, do número de saltos necessários até se obter um ejaculado e das características seminais nos resultados reprodutivos procedeu-se a uma análise de covariância. Para comparar as mobilidades espermáticas após-colheita (PMS AC), após diluição (PMS AD) e após refrigeração por 24 horas (PMS 24h) o teste não paramétrico de Friedman, seguido de uma comparação múltipla da ordem das médias foi aplicado. Considerou-se um nível de significância $\alpha = 0,05$ (MAROCO, 2007).

4.3. RESULTADOS

Caraterísticas espermáticas de garanhões Puro Sangue Lusitanos (PSL) definidas por uma única colheita por garanhão

De um total de 158 garanhões seleccionados para avaliação espermática no exame de acesso ao livro de reprodutores foi possível obter, com sucesso, um ejaculado de cada um de 152 animais. Aos restantes seis não foi possível recolher esperma pois os animais não conseguiram encabritar-se sobre a égua. Distribuições assimétricas e leptocúrticas ($g_2 > 0$ i.e. uma distribuição pontiaguda) foram observadas para a concentração ($g_1 > 0$, i.e. enviesamento positivo), vitalidade ($g_1 < 0$ i.e. enviesamento negativo) e morfologia ($g_1 < 0$) espermáticas; o volume de filtrado ($g_1 > 0$), o pH ($g_1 > 0$) e a mobilidade ($g_1 < 0$) espermática apresentaram distribuições assimétricas e mesocúrticas ($g_2 \approx 0$ i.e. sem achatamento). As medidas de tendência central, dispersão, enviesamento e achatamento obtidas encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Caraterísticas espermáticas (MMQ's) de garanhões PSL - colheita única por garanhão - de acordo com os grupos etários considerados

Grupo etário	Volume (ml)	Concentração espermática ($\times 10^6$ spz/mL)	PMS AC (%)	Vitalidade espermática (%)	Morfologia espermática (%)				pH
					Normal	Anormal			
						Cabeça	Peça intermédia	Peça principal	
J1	39,83	228,18	35,42	68,87	72,77	6,88	14,04	6,33*	7,41
A2	41,52	237,10	42,63	73,32	76,27	8,62	12,34	3,34*	7,39
A3	39,73	237,07	42,09	61,44	74,09	10,26	10,95	4,48	7,51
A4	38,81	232,10	43,57	68,94	71,31	7,53	14,35	3,37	7,39
M5	48,66	275,81	44,71	69,39	76,13	7,89	11,25	5,13	7,59
Total	41,72	241,26	41,60	69,27	74,52	8,25	12,57	4,39	7,45
g_1	0,48	1,45	-0,06	-0,88	-1,35	3,69	1,98	3,13	0,13
g_2	-0,67	2,01	-0,26	0,63	2,83	23,61	4,93	12,21	-0,13

Notas: g_1 - coeficiente de assimetria; g_2 - coeficiente de achatamento.

* - diferenças significativas ($P < 0,05$) observadas entre grupos etários.

Considerando as principais regiões da célula, a da peça intermédia foi a que apresentou a maior percentagem de alterações (12,57%±9,91) seguida da região da cabeça (8,25%±7,54) e da peça principal (4,39%±5,34). A MANOVA aplicada aos parâmetros seminais revelou não existirem diferenças significativas entre os diferentes grupos etários considerados, com exceção para as anomalias da peça principal entre os animais jovens (J1) e adultos (A2). Para a generalidade dos parâmetros seminais, o grupo 5 (animais com idade ≥ 9 anos) foi o que apresentou melhor qualidade espermática (*vide* Tabela 4.1).

As medidas de associação determinadas pelo coeficiente de correlação de Spearman (r) mostraram correlações significativas entre alguns parâmetros do esperma. Conforme esperado, o volume de filtrado correlacionou-se negativamente com a concentração espermática ($r=-0,49$, $P<0,001$) e a mobilidade espermática correlacionou-se com a vitalidade ($r=0,39$, $P<0,001$) e com a morfologia ($r=0,38$, $P<0,001$).

Caraterísticas espermáticas de garanhões Puro Sangue Lusitanos (PSL) e Sorraia definidas por múltiplas colheitas por garanhão; Aplicação e Conservação do esperma

Quando considerado o uso do sémen equino, tanto em programas de conservação como de IA, vários ejaculados são obtidos do mesmo indivíduo. Para os garanhões Lusitanos, quando comparada esta abordagem (371 ejaculados de 9 garanhões PSL) com a anterior (152 ejaculados de 152 garanhões PSL), e apesar de os parâmetros seminais apresentarem valores médios similares, registaram-se diferenças significativas ($P<0,05$) para a mobilidade espermática após colheita (PMS AC), a percentagem de espermatozóides com morfologia normal (Morf; determinada pelas diferenças na peça intermédia) e o pH do esperma (Figura 4.3).

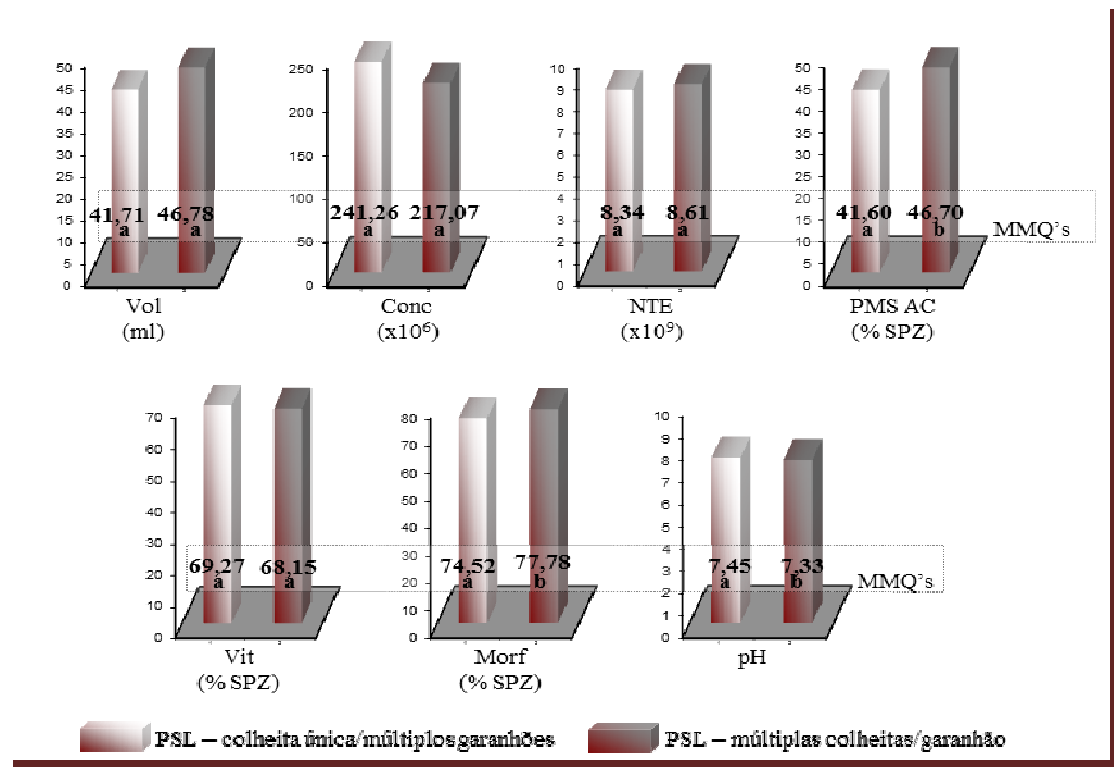


Figura 4.3. Parâmetros espermáticos definidos por uma colheita única por animal e por várias colheitas por garanhão na raça PSL.

As barras representam os valores médios (MMQ's) que se evidenciam no retângulo em destaque; abaixo, em letras minúsculas (a, b) encontra-se o resultado do teste de diferença entre as médias, sendo que letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as estratégias utilizadas. Vol (volume de filtrado); Conc (concentração espermática); NTE (número total de espermatozoides); Vit (vitalidade espermática).

O melhor ajustamento encontrado na modelação do perfil dos diferentes parâmetros seminais ao longo da idade foi produzido por modelos polinomiais (colheita única/múltiplos garanhões) e exponenciais e polinomiais (múltiplas colheitas/garanhão), representados na figura 4.4, e em que X representa a idade. Os coeficientes de determinação (R^2) são muito baixos o que denota a existência de múltiplos fatores, que não a idade, a influenciar os parâmetros em análise.

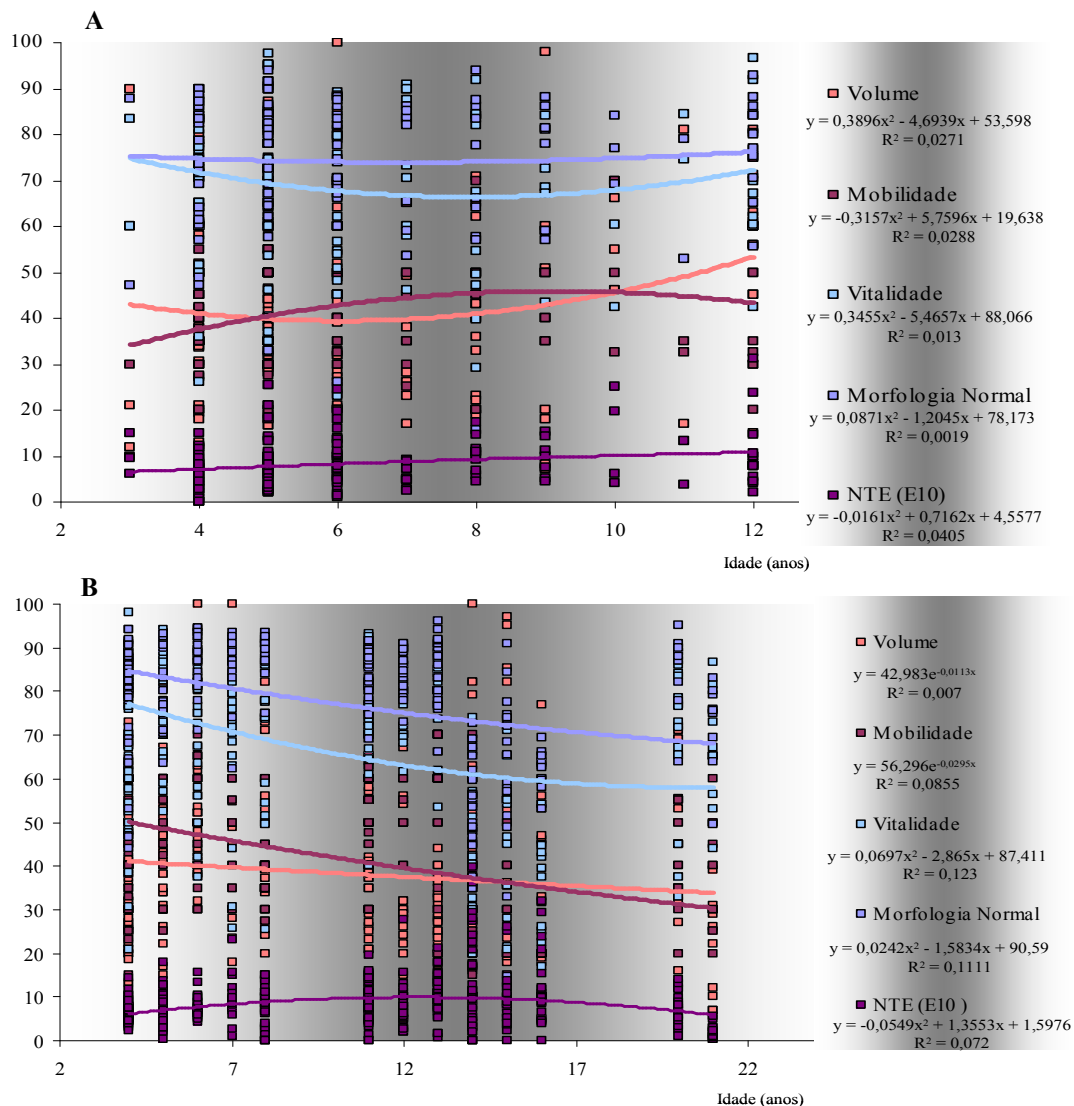


Figura 4.4. Efeito da idade nos parâmetros espermáticos definidos por uma colheita única por animal (A) e por várias colheitas por garanhão (B), na raça PSL.

NTE – número total de espermatozoides.

Quando considerados os dados relativos aos múltiplos ejaculados obtidos por garanhão, verificámos que a generalidade dos animais não apresentou problemas em aceitar o tronco de colheita e a VA. Em média, para a raça Lusitana, os ejaculados foram obtidos aos $1,49 \pm 0,72$ saltos e para o cavalo do Sorraia aos $1,48 \pm 0,75$ saltos. Para os PSL, em 371 casos válidos obtivemos 62,5% dos ejaculados ao 1º salto (232/371) e 27,5% ao 2º (102/371), situação similar à registada para os cavalos do Sorraia [63,7% dos ejaculados obtidos ao 1º salto (72/113) e 28,3% ao 2º (32/113)] mas

significativamente diferente ($P < 0,001$) da observada no grupo constituído por garanhões de raças europeias [40.2% dos ejaculados obtidos ao 1º salto (145/361) e 41.0% ao 2º (148/361)]. No entanto, nos animais PSL (assim como nos garanhões de outras raças europeias), a qualidade dos ejaculados não parece ser significativamente afectada pelo número de saltos necessários para a sua obtenção (*vide* Tabela 4.2), o que já não se verificou nos cavalos do Sorraia ($P < 0,05$). Nestes animais, quando mais do que um salto é requerido para a ejaculação, o volume de filtrado e o pH do esperma aumentam, com a consequente diminuição da concentração espermática, fruto de uma maior atividade das glândulas anexas, em virtude do maior tempo de excitação dos animais. Contudo, apesar do volume e da concentração espermáticas diferirem de acordo com o número de saltos necessários para a ejaculação, o número total de espermatozóides (NTE) no esperma dos cavalos do Sorraia não se altera (*vide* Tabela 4.2), efeito da relação inversa observada entre o volume e a concentração, como veremos abaixo.

Nos PSL, a mobilidade dos espermatozóides não se altera quando um ou dois saltos são necessários para a ejaculação, mas diminui a partir do 3º salto; já nos Sorraias, a mobilidade nos espermas obtidos ao 2º salto diminuiu significativamente mas mantém-se constante quando mais do que dois saltos são necessários. O aumento observado, para os cavalos do Sorraia, na percentagem de espermatozóides com anomalias na cabeça em ejaculados obtidos ao 3º salto ficou a dever-se ao fato de um dos animais só ejacular ao 3º salto e o seu esperma ser caracterizado por uma percentagem bastante elevada de anomalias nessa região do espermatozóide (*vide* Tabela 4.2).

Quando comparadas as raças autóctones portuguesas, os parâmetros espermáticos analisados na raça Sorraia apresentaram diferenças significativas relativamente aos observados nos garanhões PSL, independentemente da estratégia utilizada ($P < 0,05$). A qualidade seminal na raça Sorraia é muito fraca em termos de mobilidade, vitalidade e morfologia espermáticas. Somente para a concentração espermática não se observaram diferenças entre estas duas raças (*vide* Figura 4.5 e Tabela 4.3).

Tabela 4.2. Parâmetros seminais quantitativos e qualitativos (MMQ's) em função do número de saltos necessários para se obter um ejaculado nos grupos considerados

Parâmetros espermáticos quantitativos	Raça	Número de saltos		
		1	2	≥3
Volume (ml)	PSL	45,71 ^{a1}	49,39 ^{a1}	46,29 ^{a1}
	Sorraia	16,69 ^{b1}	28,22 ^{b2}	39,50 ^{b2}
	Outros	33,22 ^{c1}	38,53 ^{a1}	42,17 ^{a1}
Concentração (x10 ⁶ spz/mL)	PSL	211,92 ^{a1}	231,81 ^{a1}	215,54 ^{a1}
	Sorraia	277,78 ^{b1}	163,88 ^{b2}	109,89 ^{b2}
	Outros	210,38 ^{a1}	186,49 ^{a1}	213,25 ^{a1}
NTE (x10 ⁹ spz)	PSL	8,29 ^{a1}	9,38 ^{a1}	8,50 ^{a1}
	Sorraia	4,16 ^{b1}	3,95 ^{b1}	4,17 ^{b1}
	Outros	6,52 ^{c1}	6,74 ^{c1}	8,73 ^{a2}
pH	PSL	7,341 ^{a1}	7,29 ^{a1}	7,37 ^{a1}
	Sorraia	7,41 ^{b1}	7,54 ^{b1}	7,79 ^{b2}
	Outros	7,37 ^{a1}	7,29 ^{a1}	7,43 ^{a1}
Parâmetros espermáticos qualitativos	Raça	Número de saltos		
		1	2	≥3
PMS AC (%)	PSL	46,67 ^{a1}	48,39 ^{a1}	42,23 ^{a1}
	Sorraia	22,49 ^{b1}	17,73 ^{b2}	17,10 ^{b2}
	Outros	46,16 ^{a1}	49,61 ^{a1}	48,57 ^{c2}
Vitalidade (%)	PSL	69,07 ^{a1}	67,13 ^{a1}	64,29 ^{a1}
	Sorraia	38,79 ^{b1}	44,93 ^{b1}	49,39 ^{b1}
	Outros	71,53 ^{a1}	72,41 ^{a1}	71,80 ^{a1}
Anomalias Cabeça (%)	PSL	9,01 ^{a1}	10,21 ^{a1}	13,50 ^{a2}
	Sorraia	18,73 ^{b1}	16,83 ^{b1}	41,13 ^{b2}
	Outros	5,49 ^{a1}	5,79 ^{a1}	5,56 ^{c1}
Anomalias Peça intermédia (%)	PSL	8,39 ^{a1}	7,10 ^{a1}	6,48 ^{a1}
	Sorraia	9,97 ^{a1}	11,46 ^{b1}	7,25 ^{a1}
	Outros	8,59 ^{a1}	7,24 ^{a1}	9,23 ^{b1}
Anomalias Peça principal (%)	PSL	4,73 ^{a1}	3,79 ^{a1}	5,87 ^{a1}
	Sorraia	20,13 ^{b1}	15,72 ^{b2}	14,8 ^{a2}
	Outros	5,06 ^{c1}	5,73 ^{c1}	7,43 ^{a2}

Valores com subscritos diferentes (a-c) diferem significativamente ($P<0,05$) quando comparadas as raças para cada número de saltos; valores com subscritos diferentes (1-2) diferem significativamente ($P<0,05$) quando comparados os números de saltos dentro de cada raça.

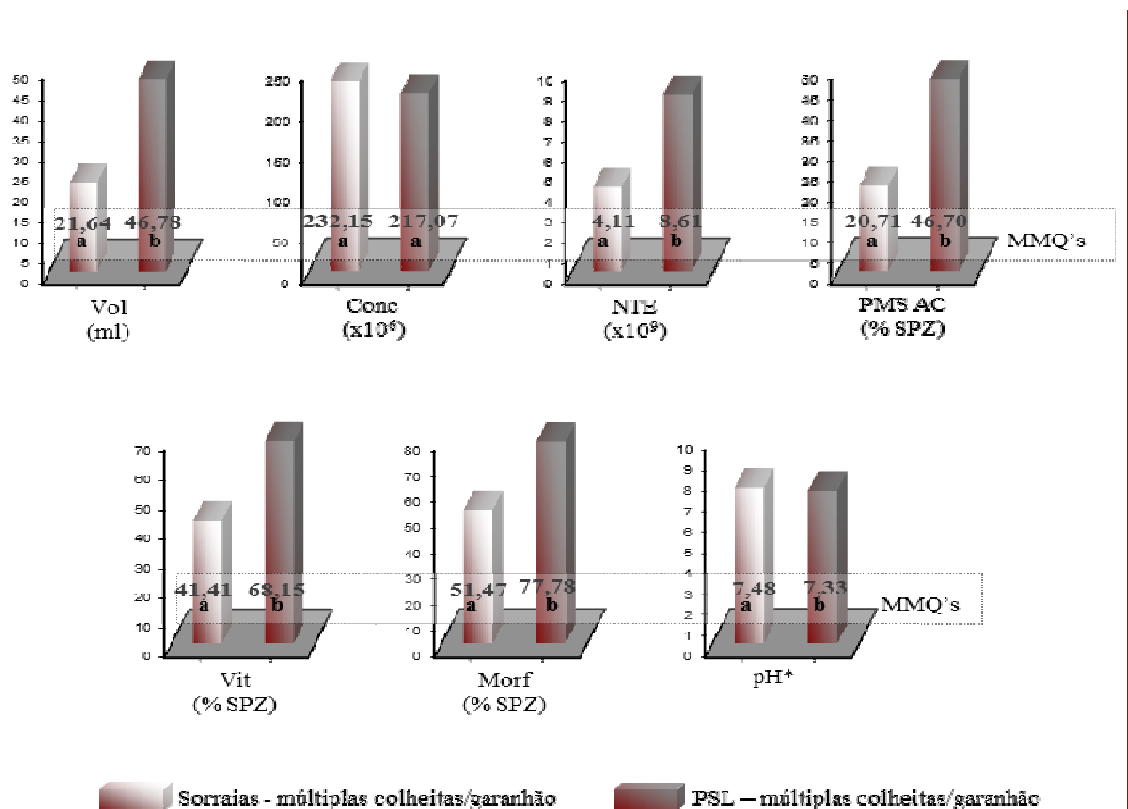


Figura 4.5. Parâmetros espermáticos definidos por múltiplas colheitas por animal nas raças Sorraia e PSL.

As barras representam os valores médios (MMQ's) que se evidenciam no rectângulo em destaque; abaixo, em letras minúsculas (a, b) encontra-se o resultado do teste de diferença entre as médias, sendo que letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as raças. Vol (volume de filtrado); Conc (concentração espermática); NTE (número total de espermatozoides); Vit (vitalidade espermática).

Tabela 4.3. Parâmetros espermáticos (MMQ's) definidos por múltiplas colheitas por animal nos grupos considerados

Raça	Volume (ml)	Concentração espermática ($\times 10^6$ spz/mL)	NTE ($\times 10^9$ spz)	PMS AC (%)	Vitalidade espermática (%)	Morfologia espermática				pH	
						Normal (%)	Anormal				
							Cabeça (%)	Peça intermédia (%)	Peça principal (%)		
PSL	g ₁	1,41	1,45	2,03	-0,13	-0,86	-1,73	2,27	2,93	2,93	0,95
	g ₂	3,11	3,03	6,25	-0,51	-0,09	3,11	5,16	18,53	11,91	0,44
Sorraia	g ₁	21,64 ^b	232,15 ^a	4,11 ^b	20,71 ^b	41,41 ^b	51,47 ^b	19,94 ^b	10,15 ^b	18,43 ^b	7,48 ^b
	g ₂	1,56	1,62	1,09	0,61	0,01	0,14	1,40	0,75	0,30	0,34
Outras	g ₁	2,33	3,54	2,43	1,62	-0,27	-0,58	1,41	0,38	-0,38	-0,74
	g ₂	37,07 ^a	201,13 ^a	7,02 ^a	48,03 ^c	71,51 ^a	80,50 ^a	5,69 ^a	8,24 ^a	5,30 ^c	7,36 ^a
Outras	g ₁	0,98	1,01	1,23	-0,47	-1,12	-1,86	2,18	2,14	7,25	-0,46
	g ₂	2,13	0,79	1,56	-0,02	1,44	7,13	5,99	7,47	85,57	14,84

Notas: g₁- coeficiente de assimetria; g₂- coeficiente de achatamento. Valores com subscritos diferentes (a-c) diferem significativamente ($P < 0,05$) quando comparadas as raças para cada parâmetro espermático.

Relativamente à morfologia espermática, nos cavalos do Sorraia destacaram-se as anomalias na região da cabeça e da peça principal (*vide* Tabela 4.3). Estas últimas eram maioritariamente flagelos enrolados e partidos enquanto as da cabeça se reportaram às dimensões desta, que se apresentou muito heterogénea. A este propósito, importa referir que uma análise morfométrica, realizada posteriormente, sobre ejaculados (n=40, 8 por garanhão) obtidos dos garanhões PSL 8, PSL 9, Sorraia 4 e de mais dois garanhões Sorraia, mostrou não ocorrerem variações entre estas raças autóctones no que concerne às dimensões da peça intermédia e da peça principal. Relativamente à região da cabeça, identificaram-se sete categorias pleomórficas em ambas as raças (*vide* Figura 4.6).

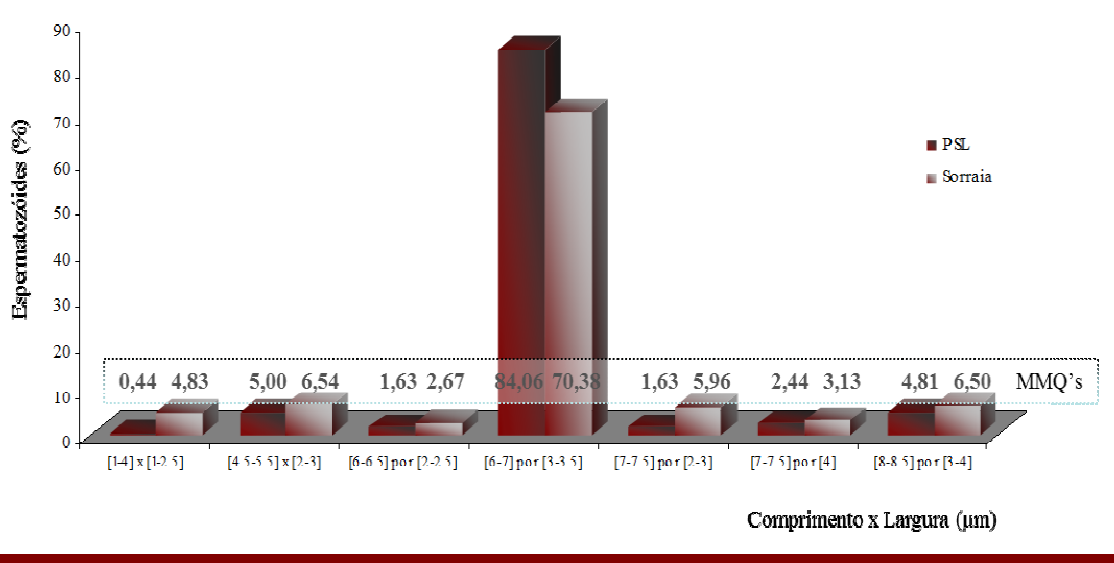


Figura 4.6. Dimensões da região da cabeça observadas em espermatozoides de PSL e Sorraia.

As barras representam os valores médios (MMQ's) que se evidenciam no rectângulo em destaque. As medidas foram tomadas com recurso a uma ocular com micrómetro (ampliação 1000x). Esta última foi calibrada fazendo coincidir o zero da escala de um micrómetro objectivo, com o zero da escala do micrómetro ocular e determinando outro ponto de coincidência entre as duas escalas; uma divisão no micrómetro ocular correspondeu a 1µm. As medidas tomadas foram o comprimento (C) - extensão da cabeça desde o seu ponto mais apical até ao extremo do colo e a largura (L) - distância entre duas linhas teóricas paralelas e tangentes ao perfil mais largo da cabeça e perpendiculares ao eixo longitudinal da célula.

Apesar da dimensão (C vs. L) predominante, tanto em Lusitanos como em Sorraias, se situar no intervalo [6–7] µm de comprimento (C) por [3-3,5] µm de largura (L), com elipticidade (C/L) variando entre 1,71 e 2,33 µm, na raça Sorraia observou-se

maior dispersão de valores dentro desse intervalo morfométrico ($CV_{PSL}=6,04$ e $CV_{Sorraia}=11,64$). Por outro lado, cabeças microcéfalas ($[1-4] \times [1-2,5] \mu\text{m}$), pequenas e estreitas ($[4,5-5,5] \times [2-3] \mu\text{m}$), alongadas ($[7-7,5] \times [2-3] \mu\text{m}$) e gigantes ($[8-8,5] \times [3-4] \mu\text{m}$), ocorrem significativamente ($P<0,05$) em maior extensão nos garanhões Sorraia.

Os coeficientes de correlação de Spearman obtidos para as diferentes características observadas no esperma encontram-se na tabela 4.4. A força e a direcção da relação de tipo linear entre os parâmetros observados em PSL e Sorraias, apresentam-se similares para as variáveis concentração, NTE e PMS AC. Para as restantes, já se observam relações distintas com destaque para as correlações observadas entre o pH do esperma e os parâmetros concentração, PMS AC e vitalidade, nos cavalos do Sorraia.

Tabela 4.4. Coeficiente de Correlação de Spearman entre os parâmetros seminais avaliados no esperma das raças PSL e Sorraia.

Raças	Parâmetro Espermiático	Concentração	NTE	PMS AC	Vitalidade	Morfologia normal	pH
PSL	Volume	-0,49***	0,49***	-0,19***	-0,13**	NS	NS
	Concentração		0,44***	0,23***	NS	NS	NS
	NTE			NS	NS	NS	NS
	PMS AC				0,62***	0,42***	NS
	Vitalidade					0,49***	NS
Sorraia	Volume	-0,45***	0,58***	-0,24*	NS	NS	NS
	Concentração		0,40***	0,36***	-0,25*	NS	-0,31**
	NTE			NS	NS	-0,31**	NS
	PMS AC				NS	NS	-0,25**
	Vitalidade					0,42***	0,23*

Nota: *** ($P<0,001$) altamente significativo; ** ($P<0,01$) bastante significativo; * ($P<0,05$) significativo.

A análise aplicada para ajuizar da relevância dos fatores *indivíduo* e *número de saltos* (necessários para se obter um ejaculado) e da interação entre eles sobre as características do esperma produziu, para todos os parâmetros espermáticos analisados, uma variação inter-indivíduo significativa ($P<0,05$, expressa em termos do CV) e superior à variação intra-indivíduo, tanto nos PSL como nos Sorraia (*vide* Tabela 4.5). Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) denotam a influência dos fatores em

análise sendo evidente a influência do fator individual; este afecta mais fortemente ($P<0,05$) os parâmetros seminais do que o fator número de saltos (*vide* Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Variação intra- e inter-garanhão, expressa em termos de coeficiente de variação, coeficiente de determinação e efeito dos fatores indivíduo e número de saltos e sua interação, observados nos parâmetros seminais de acordo com os grupos considerados.

Raça	Parâmetro espermático	Coeficiente de variação (%)		R^2	Efeito de...(Fatores)		
		Intra-garanhão	Inter-garanhão		Garanhão (%)	Número de saltos (%)	Garanhão x número de saltos (%)
PSL	Volume (ml)	54	62	0,37	19	0,3	9,4
	Concentração ($\times 10^6$ spz/mL)	47	61	0,43	25	2,8	14,1
	NTE ($\times 10^9$ spz)	53	65	0,25	16	0,6	7,0
	Vitalidade (%)	22	29	0,51	34	0,8	3,9
	PMS AC (%)	29	38	0,41	27	1,0	6,2
	Morfologia normal (%)	12	20	0,55	39	0,8	10,9
	pH	5	5	0,23	11	1,0	4,1
Sorraia	Volume (ml)	53	67	0,35	16	5,5	5,9
	Concentração ($\times 10^6$ spz/mL)	41	61	0,34	5	7,3	2,1
	NTE ($\times 10^9$ spz)	53	55	0,22	17	0,6	4,6
	Vitalidade (%)	35	41	0,28	16	3,9	5,1
	PMS AC (%)	43	45	0,37	26	0,3	1,8
	Morfologia normal (%)	27	33	0,43	25	4,6	8,6
	pH	5	5	0,23	13	0,9	5,7
Outros	Volume (ml)	50	59	0,36	23	0,6	5,8
	Concentração ($\times 10^6$ spz/mL)	36	45	0,29	19	0,8	4,9
	NTE ($\times 10^9$ spz)	58	68	0,26	13	1,9	6,0
	Vitalidade (%)	29	34	0,23	15	1,5	6,5
	PMS AC (%)	22	24	0,47	41	2,1	7,0
	Morfologia normal (%)	5	6	0,19	12	0,3	1,4
	pH	10	14	0,34	25	1,9	5,0

Um total de 687 ejaculados foram processados para IA (PSL, $n=268$; Sorraia, $n=55$; Outros, $n=364$) e 429 deles (PSL, $n=184$; Sorraia, $n=14$; Outros, $n=231$) foram ainda sujeitos a refrigeração a 4°C conforme descrito no capítulo 3. Após diluição, a mobilidade espermática nos animais PSL aumentou, em média, 10,06% ($P<0,05$) e nos Sorraia 8,93% ($P<0,05$). Nos animais PSL, a resposta dos espermatozoides à conservação (4°C) variou de acordo com o indivíduo considerado ($P<0,05$) mas, em termos médios, verificou-se uma perda de 25,24% de mobilidade após 24h de refrigeração ($P<0,05$). Na raça Sorraia, a perda observada foi de 17,86% ($P<0,05$) mas este valor é meramente indicativo na medida em que o número de amostras refrigeradas nesta raça foi ínfimo.

Por esta razão, PSL e Sorraias não foram comparados para este parâmetro espermático (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Mobilidade espermática (MMQ's) observada após colheita (PMS AC), após diluição (PMS AD) e após 24 h de conservação a 4°C (PMS 24h) nos diferentes grupos considerados.

Mobilidade espermática	Raça		
	PSL	Sorraia	Outros
PMS AC (%)	46,70 ^{a1}	20,71 ^{a2}	48,67 ^{a1}
PMS AD (%)	56,76 ^{b1}	29,65 ^{b2}	61,10 ^{b3}
PMS 24h (%)	31,52 ^{c1}	11,79 ^(■)	40,98 ^{c2}

Valores com subscritos diferentes (a- c) diferem significativamente ($P<0,05$) quando comparadas as mobilidades dentro de cada raça; valores com subscritos diferentes (1-3) diferem significativamente ($P<0,05$) quando comparadas as raças para cada parâmetro de mobilidade. (■) não considerado na análise face ao reduzido número de observações disponíveis para o sémen refrigerado na raça Sorraia (n=14).

Tanto nos cavalos Lusitanos como nos Sorraias, verificaram-se correlações elevadas e significativas ($P<0,001$) entre a mobilidade do sémen em natureza e o sémen diluído. Nos PSL observaram-se correlações entre as mobilidades, nos diferentes períodos considerados, e os parâmetros vitalidade e morfologia espermáticas. Já na raça Sorraia a PMS AD só apresentou correlação com a concentração espermática (Tabela 4.7).

Tabela 4.7. Coeficientes de Correlação de Spearman entre a mobilidade espermática (PMS AD e PMS 24h) e os restantes parâmetros seminais nas raças autóctones portuguesas.

Grupos raciais		PMS AC	PMS 24h	Concentração	Vitalidade	Morfologia normal
PSL	PMS AD	0,89 ^{***}	0,21 ^{**}	0,23 ^{***}	0,59 ^{***}	0,40 ^{***}
	PMS 24h	NS	----	NS	NS	0,19 [*]
Sorraia	PMS AD	0,80 ^{***}	NS	0,30 [*]	NS	NS
	PMS 24h	(a)	----	(a)	(a)	(a)

Nota: ^{***} ($P<0,001$) altamente significativo; ^{**} ($P<0,01$) bastante significativo; ^{*} ($P<0,05$) significativo.

(a) Não considerado na análise face ao reduzido número de observações disponíveis para o sémen refrigerado na raça Sorraia (n=14).

Índices de Fertilidade

Um total de 197 éguas foi sujeita a inseminação artificial com sémen a fresco, na primeira meia hora após colheita: 178 éguas foram beneficiadas por garanhões PSL e 19 por garanhões Sorraia.

O valor médio da fertilidade por ciclo (FC) e da fertilidade no final da época de reprodução (FER) na raça lusitana foi de, respectivamente $69,73\% \pm 20,39$ e $85,68\% \pm 17,10$. Estes valores diferem significativamente ($P < 0,001$) dos registados para o cavalo do Sorraia (FC = $20,52\% \pm 15,29$ e FER = $34,07\% \pm 23,40$). Em ambas as raças autóctones o indivíduo *per si* exerce influência significativa sobre os índices reprodutivos ($P < 0,001$) o que reforça também a importância do conhecimento individual nos programas de reprodução equina.

O efeito, sobre os índices reprodutivos, do número de éguas beneficiadas por garanhão é evidente para os cavalos do Sorraia (*vide* Tabela 4.8). O número de saltos influenciou os índices reprodutivos em ambas as raças, mas mais parcamente na raça Lusitana ($P < 0,05$) do que na Sorraia ($P < 0,001$). Nesta, dos parâmetros qualitativos e quantitativos do esperma e das características do ejaculado que traduzem a atividade das glândulas anexas, somente a mobilidade espermática e o pH influenciaram os índices reprodutivos. Curiosamente, o volume de esperma e a sua concentração influenciaram a FER nos garanhões Lusitanos mas não nos Sorraias. Por outro lado, nem a mobilidade espermática após diluição do esperma nem a morfologia exerceram influência sobre a FC e FER, quer em Lusitanos quer em Sorraias o que se afigura interessante uma vez que a percentagem de espermatozóides móveis aumenta ligeiramente quando os espermatozóides são misturados nos mênstruos de enriquecimento; interessante também porque, nos cavalos do Sorraia, se registou uma percentagem elevada de alterações morfológicas não observáveis em Lusitanos nem nas outras raças europeias (*vide* Tabela 4.3).

Tabela 4.8. Efeito do nº de éguas por garanhão e das características seminais na fertilidade por ciclo (FC) e na fertilidade no final da época de reprodução (FER) baseada na análise de covariância multifatorial.

Parâmetro	<i>P</i>					
	FC			FER		
	PSL	Sorraia	Outras	PSL	Sorraia	Outras
Número de éguas/garanhão	0,133	0,000	0,189	0,095	0,010	0,064
Número de saltos	0,040	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000
Volume de esperma (ml)	0,693	0,379	0,059	0,015	0,267	0,024
Concentração espermática (x10 ⁶)	0,227	0,298	0,138	0,032	0,202	0,106
PMS AC (%)	0,000	0,027	0,000	0,001	0,067	0,001
PMS AD (%)	0,302	0,248	0,173	0,152	0,483	0,554
Vitalidade espermática (%)	0,012	0,604	0,521	0,001	0,567	0,177
Morfologia normal	0,496	0,689	0,511	0,485	0,540	0,334
pH	0,000	0,002	0,000	0,000	0,001	0,000

4.4. DISCUSSÃO

Como parte dos procedimentos levados a cabo pela APSL para a aprovação de machos ao Livro de Reprodutores, os animais são sujeitos a uma colheita de esperma e o ejaculado obtido submetido a um espermograma sumário. A idade mínima requerida são os 3 anos de idade e garanhões mais velhos são frequentemente avaliados. Contudo, pouco se sabia acerca das características espermáticas na raça Lusitana e da aptidão do esperma para suportar as baixas temperaturas de conservação utilizadas na tecnologia de sêmen refrigerado. Esta última consideração aplica-se, igualmente, ao cavalo do Sorraia, outra raça autóctone portuguesa cujo padrão espermático se desconhecia.

Na espécie equina, a idade à puberdade é atingida entre as 56 e as 97 semanas de vida, sendo as 83 semanas apontadas como a idade mais comum (NADEN, AMANN e SQUIRES, 1990). Já a maturidade sexual é atingida 2 a 4 anos mais tarde (AMANN, 1993a) e apesar de o tamanho testicular e de a produção diária de espermatozóides aumentar ainda depois da puberdade, segundo JOHNSON, VARNER e THOMPSON (1991), a produção diária de espermatozóides permanece, para a maior parte dos garanhões, mais ou menos constante entre os 4 e os 20 anos de idade. Já para LOPATE, LE BLANC e KNOTTENBELT (2003), a produção espermática aumenta com a idade do macho no período pós-púbere até à maturidade sexual, vindo a diminuir em cerca de 35% a partir dos 13 anos de

idade. DOWSETT e PATTIE (1987) também observaram um declínio no número total de espermatozoides (NTE) produzidos concomitantemente com um aumento no número de espermatozoides mortos e na percentagem de células morfológicamente alteradas em animais com 14 anos de idade comparativamente com animais mais jovens (3 a 13 anos).

Contrariamente ao que foi referido por alguns autores (SQUIRES, PICKET e AMANN, 1979; PICKETT, 1993a; DOWSETT e KNOTT, 1996), o nosso estudo não evidenciou um efeito significativo da *idade* sobre a generalidade das características espermáticas analisadas. SQUIRES, PICKET e AMANN (1979) verificaram que a idade do garanhão afecta o volume total do ejaculado, o volume de filtrado e o pH do esperma sem que ocorram variações na mobilidade e na concentração espermáticas. Para estes dois últimos parâmetros, os nossos resultados estão de acordo com o por ele descrito. Observa-se, assim, na literatura falta de unanimidade quanto ao efeito da idade sobre os parâmetros seminais nos equinos. As dissemelhanças serão, naturalmente, resultado dos animais e respectivas raças utilizadas e das condições experimentais, incluindo a latitude onde os trabalhos são desenvolvidos. No entanto, é comumente aceite que o efeito da idade se prende com a ineficiência da espermatogénese ainda durante a puberdade e com a degenerescência testicular associada ao envelhecimento. Interessante verificar que, para a abordagem de um só ejaculado por cada um de múltiplos garanhões, a função polinomial é a que melhor se ajusta a cada uma das características espermáticas avaliadas enquanto para a abordagem de múltiplos ejaculados por garanhão, o volume de esperma e a mobilidade dos espermatozoides são melhor definidas por funções exponenciais. Adicionalmente, verificaram-se diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as duas abordagens para a PMS AC, a percentagem de espermatozoides com morfologia normal (Morf) e o pH.

No conjunto de observações dos machos PSL que se apresentaram a concurso de admissão ao Livro de Reprodutores, verificaram-se relações ($P < 0,001$) entre os parâmetros seminais, já descritas por outros autores (MAPA, 1996): a concentração variou inversamente com o volume, a mobilidade e a vitalidade variaram directamente, assim como a mobilidade e a morfologia. Na abordagem de múltiplos ejaculados por

ganhão, tanto nos cavalos Lusitanos como nos Sorraias, verificaram-se correlações significativas ($P < 0,001$) entre o volume e a concentração espermáticas, entre a vitalidade e a morfologia normal das células e entre a concentração e a mobilidade. Estatisticamente, a análise de correlação linear apenas fornece informação acerca da força e da direcção da relação entre duas variáveis não esclarecendo se essa relação é causal ou meramente associativa. A relação inversa entre o volume e a concentração espermática afigura-se lógica uma vez que a produção total de espermatozoides é constante. A relação directa entre a vitalidade e a morfologia normal das células parece sugerir uma qualidade global da espermatogénese. A relação directa entre a concentração e a mobilidade espermáticas e a relação inversa entre o volume e a mobilidade parecem traduzir meramente a subjectividade intra-observador inerente à avaliação da mobilidade por microscopia. Com efeito, mesmo mantendo constante o volume das gotas a observar, em espermias mais concentrados a mobilidade tende a ser sobrestimada relativamente aos menos concentrados. Contrariamente ao observado nos PSL, nos cavalos do Sorraia não foi evidenciada nenhuma relação de tipo linear entre a mobilidade espermática e os parâmetros vitalidade e morfologia das células. A mobilidade espermática tem sido fortemente correlacionada com a vitalidade ($r = 0,83$; MAPA, 1996) e mais parcamente com a percentagem de espermatozoides morfológicamente anormais [$-0,29 < r < -0,50$ e $r = -0,37$ (FRANCE, 1996)] pelo que os resultados obtidos para os cavalos lusitanos estão de acordo com o que tem sido observado na espécie equina e sugerem uma relação funcional entre estes parâmetros. Curiosamente, somente nos cavalos do Sorraia, onde os volumes de filtrado são significativamente inferiores aos dos PSL, se observou correlação entre o pH do esperma (superior nos Sorraias) e as outras características seminais: a) negativamente com a concentração espermática ($P < 0,01$) - traduzindo uma proporção maior de fluidos do epidídimo (pH ácido, PICKET *et al.*, 1976) em relação às secreções das restantes glândulas acessórias (pH básico, próximo de 8; PICKET *et al.*, 1976) e com a mobilidade, PMS AC ($P < 0,01$) - o que nos parece ser devido à subjectividade inerente ao exame da mobilidade e b) positivamente com a vitalidade espermática ($P < 0,05$) - sugerindo a importância da neutralização da acidez dos fluidos do epidídimo na integridade estrutural do plasmalema. Este último apontamento parece ser corroborado pela relação negativa observada, nesta raça, entre a concentração e a vitalidade espermáticas.

Quando se estudaram os parâmetros espermáticos de múltiplos ejaculados por garanhão, os resultados evidenciaram diferenças significativas entre as características do esperma dos cavalos do Sorraia e as dos cavalos Lusitanos. Referências a variações entre raças equinas para a generalidade dos parâmetros seminais encontram-se nos trabalhos de Pickett e colaboradores (*apud* PICKETT, 1993a), COLENBRANDER *et al.*, (1992) e de DOWSETT e KNOTT (1996). O efeito do *indivíduo* revelou-se significativo para todos os parâmetros em análise observando-se variações não só entre garanhões, mas também entre ejaculados do mesmo garanhão, para cada raça analisada. Similarmente ao que foi referido por SIEME, KATILA e KLUG (2004), o grau de variabilidade intra-garanhão foi inferior ao grau de variabilidade inter-garanhão, nas duas raças autóctones em estudo, sendo que nos cavalos do Sorraia esses coeficientes se apresentaram mais elevados do que nos Lusitanos para os parâmetros vitalidade, mobilidade e morfologia espermáticas. A variabilidade intra-garanhão sugere que um só ejaculado não é suficiente para ajuizar da qualidade seminal do indivíduo, conforme mencionado por PATTIE e DOWSETT (1982). A proporção da variabilidade atribuída ao fator *indivíduo*, assim como o coeficiente de determinação por nós obtidos, foram inferiores aos referidos no estudo de SIEME, KATILA e KLUG (2004). Atente-se, no entanto, que esse estudo se efetuou sobre 6897 ejaculados obtidos de 71 garanhões.

Nos equinos, dados contraditórios têm surgido no que respeita à relação entre a morfologia espermática e a raça nomeadamente porque a magnitude das variações entre indivíduos tem-se mostrado mais elevada do que a entre raças (MALMGREN, 1992; BRITO, 2007). Neste estudo, verificámos uma diferença clara entre a percentagem de espermatozoides com morfologia normal presente nos espermas de garanhões PSL e Sorraias, similarmente ao anteriormente reportado por COLENBRANDER *et al.* (1992) quando estudou as características seminais em cavalos *Warmblood* e *Friesien*, e nos pôneis *Welsh*, *New Forest* e *Shetland*. Curiosamente, van ELDIK *et al.* (2006) ao avaliarem a relação entre os níveis de consanguinidade nos pôneis Shetland e as características dos seus espermas verificaram uma associação entre baixas percentagens de mobilidade e de morfologia normal e os coeficientes de consanguinidade (de Wright, F) acima de 2%. No cavalo do Sorraia, o coeficiente de consanguinidade média, F, é de 36,3% (OOM e SERRANO, 2006) valor este claramente superior ao observado na raça lusitana (9,91%,

para os animais nascidos em 2006 – VICENTE, CAROLINO e GAMA, 2009). Adicionalmente, as alterações morfológicas com maior incidência nos garanhões Sorraia situam-se ao nível da peça principal e da cabeça da célula e traduzem-se na forma e na dimensão desta, claramente distinguível por métodos visuais. Contudo, para a raça Sorraia, não se observou relação entre a morfologia e a mobilidade espermáticas.

As membranas (acrossómica e plasmática) do espermatozóide são sensíveis ao “choque térmico”, termo utilizado para designar uma combinação de danos celulares que afectam a integridade e funcionalidade da célula (AMANN e GRAHAM, 1993). Nos garanhões, a situação é crítica na gama de temperaturas entre os 19°C e os 8°C (MORAN *et al.*, 1992), ocorrendo perda de integridade das membranas plasmática e acrossómica com consequente perda de componentes intra-celulares e redução da mobilidade. Os nossos dados sugerem que, durante a refrigeração, a variabilidade entre garanhões ainda ocorre pois alguns animais parecem ter esperma capaz de suportar melhor do que outros as temperaturas de conservação.

Baseado na análise de covariância multifatorial, o número de éguas beneficiadas por garanhão influi sobre os índices reprodutivos nos cavalos do Sorraia mas não nos PSL. BARBOSA e ABREU (1986) já haviam observado, para o PSL, que um número de até 30 éguas cobertas, por garanhão e por época, não afectava os índices de fertilidade do garanhão, resultados estes similares aos observados por MERKT *et al.* (1979). No entanto, de acordo com SIEME, KATILA e KLUG (2004), os índices reprodutivos de um dado macho aumentam consideravelmente com o aumento do número de éguas beneficiadas pelo que, para os cavalos do Sorraia, um maior número de fêmeas (da mesma raça e de outras de comprovada fertilidade), seria desejável para clarificar se o mesmo se verificaria neste caso. O número de saltos necessários para a obtenção de um ejaculado influenciou os índices reprodutivos medidos para as nossas raças autóctones, mais fortemente no Cavalo do Sorraia ($P < 0,001$) do que na raça PSL ($P < 0,05$). As raças PSL e Sorraia não diferiram quanto ao comportamento reprodutivo, mas maiores variações na qualidade dos ejaculados, de acordo com o número de saltos, foram observadas para os garanhões Sorraia. Sabe-se que o comportamento durante a colheita, inerente a cada garanhão, influencia a composição do esperma (SIEME, KATILA e KLUG

2004). De fato, tentativas falhadas de colheita expõem os animais a maiores tempos de excitação e estes traduzem-se por maiores volumes de sémen sem que o NTE aumente, com consequências sobre os índices reprodutivos (SIEME, KATILA e KLUG, 2004).

Dos parâmetros seminais quantitativos, o pH do esperma foi a variável que maior significância revelou sobre os índices reprodutivos. Muito poucos foram os trabalhos que consultámos onde se encontraram referências a valores do pH do esperma e sua importância na análise da qualidade de um ejaculado. De acordo com PICKET *et al.*, (1970), PICKET, FAULKNER e VOSS (1975) e PICKET, SULLIVAN e SEIDEL Jr (1976), o pH do esperma varia com a estação do ano, a frequência de colheitas e a concentração espermática, sendo que alterações aos valores normais (7,2-7,7) podem indicar uma ejaculação incompleta ou anómala. Os valores médios obtidos para as raças analisadas encontram-se dentro do intervalo acima referido e nenhum dos ejaculados considerados se considerou uro- ou piospérmico. O volume de filtrado e a concentração espermática não exerceram influência sobre a FC nas nossas raças autóctones mas já o fizeram sobre a FER na raça Lusitana. Na preparação das doses de esperma para inseminação artificial imediata procurou sempre manter-se a concentração de 20×10^6 spz móveis por ml da dose, respeitando a relação de 1/3 de esperma para 2/3 de diluidor. Isto implicou que as doses de ejaculados menos concentrados e/ou com menor mobilidade espermática acarretassem um maior volume de plasma seminal do que as correspondentes preparadas com espermatozoides mais concentrados e/ou com melhores mobilidades. Atentando que nos cavalos do Sorraia o número médio de espermatozoides móveis por ml de esperma era de 49×10^6 , para veicular os 200×10^6 spz móveis por dose eram necessários, em média, 4 ml de esperma, o dobro do volume necessário para o caso dos PSL. Volumes elevados de esperma transportam também um maior número, tanto de espermatozoides mortos como de espermatozoides anormais. Nos bovinos, verificou-se que estas sub-populações têm efeitos tóxicos (SHANNON e CURSON, 1972) sobre os espermatozoides viáveis presentes em amostras de sémen diluído. Relativamente aos equinos, os estudos sobre esta matéria são contraditórios: TROKEY e MERILAN (1982) observaram supressão da mobilidade espermática, em amostras adicionadas de mais 50% de espermatozoides mortos, após 1h de incubação, enquanto BRINSKO *et al.* (2003) não observaram qualquer variação. Num estudo anterior, não observámos relação entre

o volume de sémen utilizado por dose de sémen diluído e refrigerado por 24h, 48h e 72h, assim como a % de espermatozóides mortos no volume utilizado e a percentagem de mobilidade progressiva observada nos diferentes tempos de conservação (GAMBOA *et al.*, 2011).

Os resultados da análise de covariância multifatorial mostraram ainda que, de entre as características qualitativas, vitalidade e morfologia espermáticas, só nos PSL se observou influência da vitalidade espermática sobre a FC e a FER. Este resultado contraria o de KIRK, SQUIRES e GRAHAM (2005) mas está de acordo com o de WILHELM, GRAHAM e SQUIRES (1996), DOWSETT e PATTIE (1982) e de LOVE (2011). Apesar dos nossos resultados mostrarem diferenças claras na morfologia espermática de garanhões PSL e Sorraias, assim como na morfometria das cabeças espermáticas, não foi evidenciado que a morfologia influencia os resultados de fertilidade quer no PSL quer no cavalo do Sorraia, contrariamente ao referido por outros autores que sugerem uma relação entre a morfologia dos espermatozóides e a fertilidade (BIELAŃSKI, 1979; GRAVANCE *et al.*, 1996; CASEY *et al.*, 1997; MALMGREN, 1997; LOVE, 2011). No entanto, e segundo CARD (2005), um garanhão pode apresentar até 50% de espermatozóides com alterações morfológicas sem que a fertilidade seja afectada desde que essas alterações sejam compensadas por um número suficiente de espermatozóides normais na dose inseminante. BIELANSKI (1979) também postulou que mais de 30% de alterações secundárias não estarão forçosamente associadas aos índices reprodutivos enquanto mais de 10% de alterações morfológicas primárias são sempre sugestivas de fracas taxas de fertilidade. Nos Sorraias, as alterações morfológicas dominantes situam-se nesta categoria. MORREL *et al.* (2008) verificaram, em equinos, relação entre cabeças piriformes e isoladas e a qualidade do ADN. Já ENCISO *et al.* (2011) encontraram, para o esperma da espécie bovina, relação entre os defeitos maiores do espermatozóide (nomeadamente cabeças pequenas, estreitas e gotas citoplasmáticas proximais) e os danos no ADN.

Os métodos automáticos de análise morfométrica dos espermatozóides, como a ASMA (*Automated Sperm Morphometry Analysis*) e o SCAA (*Sperm Class Analyzer® computer-assisted system*) têm evidenciado diferenças subtis nas dimensões da cabeça dos espermatozóides tanto em esperma de garanhões de fertilidade normal como entre

ganhões férteis e sub-férteis (VOSS, PICKET e SQUIRES, 1981; JASKO, LEIN e FOOTE, 1990; BALL e MOHAMMED, 1995; GRAVANCE *et al.*, 1996; CASEY *et al.*, 1997). CASEY *et al.* (1997), utilizando o sistema ASMA, verificaram que em ganhões sub-férteis as dimensões morfométricas (C e L) da cabeça dos espermatozóides eram significativamente mais elevadas (5,77 μm por 2,89 μm) do que as de ganhões férteis (5,33 μm por 2,75 μm), com uma tendência para a elipticidade ser maior. GRAVANCE *et al.* (1996), utilizando um sistema computadorizado de avaliação, também obtiveram resultados similares (5,81 μm por 2,90 μm em animais sub-férteis e 5,35 μm por 2,79 μm em animais férteis). Ainda num outro estudo, GRAVANCE *et al.* (1997), encontraram valores médios de 6,01 μm por 2,97 μm , valores estes similares aos descritos por DAVIS, GRAVANCE e CASEY (1993) e por BIELANSKI e KACZMARSKI (1979) (5,75 μm por 2,93 μm). As dimensões por nós reportadas para a população espermática prevalecente (6-7 μm x 3-3,5 μm (CxL)) nas raças analisadas diferem das destes autores (5,33-6,01 μm x 2,75-2,97 μm (CxL)) na medida em que a metodologia de avaliação é distinta. Contudo, o coeficiente de variação elevado, observado na população espermática dominante no esperma dos cavalos do Sorraia, confirma uma maior incidência de características morfométricas distintas para estes animais. Comparativamente aos PSL, nos Sorraias, a percentagem superior de espermatozóides com dimensões da cabeça que não a dimensão predominante poderá reflectir uma característica da espermatogénese, inerente à raça.

Embora a relação entre a mobilidade e a fertilidade esteja longe de se encontrar esclarecida (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003), os índices reprodutivos obtidos neste estudo parecem ser influenciados pela PMS AC, mais fortemente nos PSL. Um estudo recente de LOVE (2011) evidenciou correlações significativas entre a mobilidade e a fertilidade na espécie equina. VIDAMENT *et al.* (1999) e SIEME, KATILA e KLUG (2004) já haviam verificado que, em programas de IA com sémen refrigerado, os índices reprodutivos eram fortemente influenciados pela mobilidade do sémen após refrigeração. Estudos conduzidos em esperma sujeito a congelação/descongelação (SAMPER, HELLANDER e CRABO, 1991; WILHELM, GRAHAM e SQUIRES, 1996; KIRK, SQUIRES e GRAHAM, 2005) não evidenciaram correlações significativas entre a fertilidade e a mobilidade do esperma logo após descongelamento, no entanto, após 90 minutos de incubação KIRK, SQUIRES e

GRAHAM (2005) já verificaram correlação significativa ($P < 0,05$) com a fertilidade ao 1º ciclo.

Considerando os valores descritos para algumas raças equinas (*vide* Tabela 4.10), verificámos que os cavalos Lusitanos apresentam características similares às descritas para essas raças. No oposto, posiciona-se o cavalo do Sorraia, com valores marginais de mobilidade, vitalidade e morfologia espermáticas, mas elevados de concentração, sugerindo um mecanismo fisiológico de compensação. Os valores médios encontrados para os garanhões lusitanos são similares aos encontrados por CHAPA (1992) para a Pura Raça Espanhola o que não é surpreendente se se atender a que estas duas raças só diferem pelos critérios recentes de selecção aplicados em Portugal e Espanha (OOM, 1992). De fato, um dos haplogrupos do ADN mitocondrial estudados na raça lusitana, o qual representa metade das linhas maternas, é característico das raças do sul da península Ibérica e do Norte de África (ROYO *et al.*, 2005; LUÍS *et al.*, 2006).

Tabela 4.10. Valores descritos para as características seminais em várias raças equinas

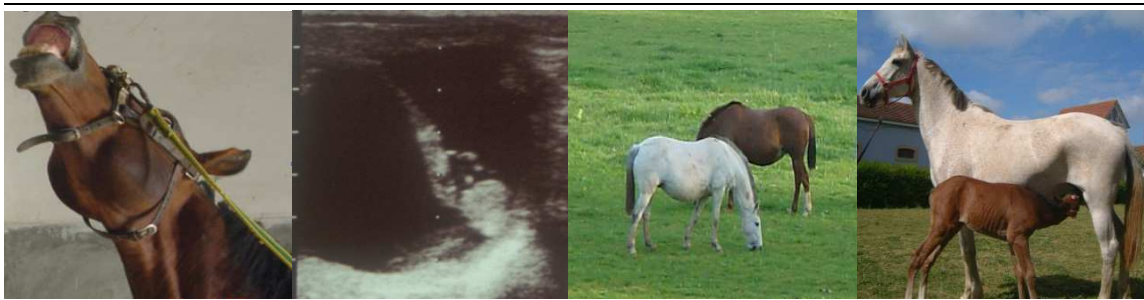
Volume Sêmen	Concentração espermática	PMS AC	Vitalidade	Referência
30-300	30-600	40	65	Equinos em geral (DAVIS-MOREL, 1999)
20-60	≥73	≥55	66-86	Raças Leves de Sela (MAPA, 1992)
33-99	≥28	≥31	--	Raças Pesadas de Tração (MAPA, 1992)
28	114	70-72	78-80	Puro Sangue Inglês (DOWSETT e KNOTT, 1996)
30	97	78-80	84-86	Standardbred Americano (DOWSETT e KNOTT, 1996)
36	286	84-86	89-91	Árabe (DOWSETT e KNOTT, 1996)
40-50	>200	60-70	70-80	Pura Raça Espanhola (CHAPA, 1992)
33	116	77-79	82-84	Stock Horse Australiano (DOWSETT e KNOTT, 1996)
24	171	73-75	75-78	Quarto de Milha (DOWSETT e KNOTT, 1996)
24	138	72-74	78-80	Palomino (DOWSETT e KNOTT, 1996)
21	104	69-71	74-76	Pónei (DOWSETT e KNOTT, 1996)
44	101	69-71	61-63	Póneis Shetland (DOWSETT e KNOTT, 1996)
23	90	72-74	83-86	Appaloosa (DOWSETT e KNOTT, 1996)
23-25	222-245	63-64	--	Cavalos Miniatura (PACCAMONTI <i>et al.</i> , 1999)
31-71	37-375	59-77	51-81	Dutch Warmblood "KWPN" (PARLEVLIET <i>et al.</i> , 1994)

No geral, a qualidade do esperma em garanhões Lusitanos é similar à de outras raças com a Lusitana relacionadas, como a Pura Raça Espanhola (*vide* Tabela 4.10). Tal qualidade é compatível com as técnicas de inseminação artificial a fresco e de refrigeração de sémen. Contudo, é importante manipular o esperma de forma a preservar o seu poder fecundante. Este aspecto assume particular relevo para a raça Sorraia uma vez que a fraca qualidade do sémen a fresco parece traduzir-se por uma fraca propensão para a refrigeração. Curiosamente, nesta raça, cujas características seminais diferem significativamente das observadas para a raça Lusitana, a qualidade seminal não parece explicar os índices reprodutivos alcançados. Fatores ligados à fêmea e outros aspectos relacionados com a composição, estabilidade e funcionalidade de sub-estruturas celulares, que não foram tidos em consideração neste trabalho, poderão permitir aclarar esse aspecto. E isto é particularmente importante no que ao cavalo do Sorraia diz respeito porquanto se trata de uma população extremamente reduzida caracterizada por elevados níveis de consanguinidade.

Em suma, os resultados obtidos neste capítulo evidenciam a influência do fator *indivíduo* sobre os parâmetros seminais, o que reforça a importância do conhecimento individual do garanhão para a correcta aplicação do manejo reprodutivo e da tecnologia que sobre o sémen seja aplicada. As variações observadas entre ejaculados de um mesmo indivíduo realçam a insuficiência da análise de um só ejaculado na avaliação do potencial de fertilidade de um garanhão, fato que deverá ser tido em consideração nos exames de admissão de machos ao Livro de Reprodutores. Lusitanos e Sorraias apresentaram valores médios distintos para a generalidade dos parâmetros espermáticos sendo que um número, teoricamente suficiente, de espermatozóides móveis não consubstancia o sucesso da fertilização de igual forma nas raças estudadas pelo que conduzimos trabalhos complementares, convenientes para avaliar a aptidão (competência) funcional da célula espermática e permitir lançar alguma luz sobre resultados aqui obtidos, como veremos nos capítulos subsequentes.

CAPÍTULO 5

SAZONALIDADE REPRODUTIVA: IMPLICAÇÕES NA QUALIDADE ESPERMÁTICA



SUMÁRIO

Neste capítulo é apresentado o trabalho desenvolvido no estudo das variações sazonais das características espermáticas e da integridade do acrossoma. Amostras de esperma obtidas de garanhões férteis e sub-férteis foram recolhidas entre os meses de Setembro e Julho, inclusive, e analisadas de acordo com 4 períodos: de Setembro a Dezembro, de Janeiro a 21 de Março, de finais de Março a meados de Maio e de meados de Maio a Julho. Os dados foram analisados de forma a avaliar-se o efeito da sazão e do indivíduo sobre os parâmetros espermáticos. Os resultados evidenciaram a influência da sazão na modulação da gametogénese e da actividade das glândulas anexas observando-se, entre Março e Maio, superior qualidade espermática e entre Setembro e Dezembro, os valores de qualidade seminal mais baixos. A análise de múltiplos ejaculados obtidos do mesmo animal evidenciou ainda, nos animais com problemas de fertilidade, que o efeito do indivíduo se sobrepõe ao efeito da sazão. A interpretação de espermogramas efectuados na contra-estação deverá ser feita à luz dos valores característicos dos parâmetros espermáticos nesta altura do ano. De igual forma, e para animais com problemas de fertilidade, a sua utilização no início da época de monta deverá ser equacionada e ajustada.

De acordo com o nº2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº388/70 foram utilizados na elaboração deste capítulo dados anteriormente publicados:

(i) Em jornais internacionais com arbitragem

Gamboa, S, Rodrigues, A.S., Henriques, L., Batista, C., Ramalho-Santos, J. - Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN: 0093-691X. 73:7 (2010), 950-958.

5.1. INTRODUÇÃO

O sucesso na preservação e aplicação do sémen equino depende de uma série de fatores incluindo a qualidade inicial da amostra. Como emerge do capítulo anterior, a qualidade do esperma varia não só entre indivíduos mas também entre ejaculados do mesmo indivíduo não se conhecendo, porém, até que ponto os efeitos específicos da sazão podem confundir esta variabilidade.

Nas espécies de reprodução sazonal, tanto a gametogénese como a atividade das glândulas anexas e a resultante qualidade seminal, parecem ser otimizadas durante a época de reprodução. No hemisfério norte, o período mais favorável para a reprodução nos equinos, parece situar-se entre Abril e Outubro (SHARP e DAVIS, 1993). Todavia, nos países da bacia mediterrânica, as condições climatéricas condicionam os criadores a concentrar os partos das suas éguas ainda antes do início da Primavera, para que, chegada esta, a disponibilidade de alimentos naturais permita a recuperação da condição corporal das reprodutoras e um melhor desenvolvimento das crias. Assim, a maior parte das associações de criadores estabelece a época oficial para a reprodução entre 1 de Fevereiro e 30 de Junho, não se sabendo, contudo, até que ponto a qualidade do esperma recolhido no início e final da estação de reprodução pode afetar os índices reprodutivos.

Os estudos acerca do efeito das variações sazonais sobre a qualidade do esperma na espécie equina indicam que a função endócrina testicular (JOHNSON e THOMPSON, 1983; BYERS, DOWSETT e GLOVER, 1983; HARRIS, IRVINE e EVANS, 1983; CLAY e CLAY, 1992; NAGATA *et al.*, 1998; HOFFMANN e LANDECK, 1999) e a produção de espermatozóides (JOHNSON e THOMPSON, 1983; JOHNSON, 1985; JOHNSON, 1991) aumentam durante a Primavera/Verão. Contudo, quando consideradas as características do esperma ao longo do ano, os resultados obtidos por diferentes autores têm-se mostrado ligeiramente contraditórios (PICKETT *et al.*, 1976; MAGISTRINI, CHANTELOUBE e PALMER, 1987; JASKO, LEIN e FOOTE, 1991; BLOTTNER, HINGST e MEYER, 1995; JANETT *et al.*, 2003a; JANETT *et al.*, 2003b). Tais diferenças poderão ficar a dever-se às raças utilizadas nos diferentes estudos e à localização geográfica dos animais.

Para a generalidade das espécies de reprodução sazonal, a sazonalidade reprodutiva é muito mais marcada para latitudes superiores (Norte da Europa) do que

para as inferiores (países da bacia mediterrânica) (SKALET *et al.*, 1988; MALPAUX, 2006) sendo que nestas, e para algumas raças ovinas, o efeito da nutrição se sobrepõe ao do fotoperíodo (HOTZEL *et al.*, 2003). Nos equinos, FERREIRA-DIAS *et al.*, (2005) verificaram que, no território continental português, as éguas lusitanas mantidas em boa condição corporal não entram em anestro durante o Inverno. Relativamente ao macho, muito pouco se sabe quanto à qualidade do esperma ao longo dos diferentes períodos do ano, nas nossas condições geográficas. Este considerando assume maior expressão quando ponderado o potencial de fertilidade do indivíduo.

Neste trabalho, procurou distinguir-se variações sazonais da qualidade do esperma equino monitorizando os parâmetros seminais básicos durante 5 épocas de reprodução e 4 contra-estações.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. DESENHO EXPERIMENTAL

As amostras de esperma (n=589) consideradas neste trabalho foram obtidas e analisadas conforme descrito no capítulo 3.

De forma a se caracterizar a qualidade do esperma durante o ano consideraram-se dados relativos a 589 ejaculados obtidos de 12 garanhões. Durante o Outono-Inverno (Set-Mar) foram estudadas 195 amostras e durante a Primavera-Verão (Mar-Jul) analisaram-se 394 ejaculados. Estes dados foram distribuídos de acordo com 4 períodos do ano: Setembro a Dezembro (Set-Dez), Janeiro a meados de Março (Jan-Mar), meados de Março a finais de Maio (Mar-Maio) e do final de Maio ao final de Julho (Maio-Jul).

Uma vez que a maioria dos animais utilizados estiveram envolvidos em programas de reprodução durante várias épocas, no Posto de Cobrição da ESAC, foi possível reuni-los, de acordo com o seu historial de fertilidade, em dois grupos: Grupo A, constituído por 3 PSL, 1 cavalo de Sela Francês (SF), 1 Holstein, 1 Belgisch Warmbloedpaard (BWP) e 1 Anglo-Arabe (AA), com índices de fertilidade no final das épocas reprodutivas variando entre 61,11% a 94,12% e Grupo B, constituído por 3 cavalos

do Sorraia e 1 Garrano, com índices de fertilidade entre 0% a 50,00% (Tabela 5.1). Incluiu-se ainda no Grupo A um animal Puro Sangue Inglês (PSI) apesar de só termos registo de uma égua beneficiada. O comportamento da qualidade espermática, ao longo do ano e em cada um destes grupos, foi também analisado.

Tabela 5.1. Índices de fertilidade obtidos para os oito garanhões utilizados em diversas épocas de reprodução

Garanhões (Raça)/Grupo	Nº de éguas inseminadas	Nº de ciclos explorados	Nº de ciclos férteis	Nº de éguas prenhes	FC (%)	FER (%)	Éguas SR (%)
A (Sorraia)/ Grupo B	9	14	4	4	28,57	44,44	0,00
B (AA)/Grupo A	83	105	70	68	66,67	81,97	4,82
C (Garrana)/Grupo B	8	12	4	4	33,33	50,00	0,00
D (Sorraia)/Grupo B	7	18	1	1	5,56	16,67	0,00
E (Sorraia)/Grupo B	6	13	0	0	0,00	0,00	0,00
F (PSL)/Grupo A	42	52	37	37	71,15	89,79	0,00
G (PSL)/Grupo A	19	30	16	16	53,33	84,51	0,00
H (SF)/Grupo A	7	16	7	6	46,67	85,71	14,29
I (Holstein)/Grupo A	11	28	11	11	39,29	61,11	17,65
J (PSI)/ Grupo A	1	1	1	1	100,00	100,00	0,00
P (PSL)/Grupo A	17	22	16	16	72,73	94,12	0,00
Q (BWP)/Grupo A	9	10	7	7	87,50	87,50	11,11

Nota: FC- Fertilidade por Ciclo; FER- Fertilidade no Final da Época de Reprodução; SR- Fêmeas Sem Registo

5.2.2. CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

Os dados relativos às condições climáticas foram obtidos na estação Agrometeorológica da Escola Superior Agrária de Coimbra (40°12'54,3" N e 00°41'04,6" E - meridiano de Lisboa - 16 metros de altitude), área na qual os garanhões permaneceram alojados. Os parâmetros que consideramos relevantes para este estudo foram a temperatura média mensal, a humidade relativa do ar e o fotoperíodo.

5.2.3. ANÁLISE DOS DADOS

Para as situações gráficas utilizou-se o programa Excel (Microsoft) e para a análise estatística dos dados recorreu-se ao programa SPSS (versão 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados foram analisados por ANOVA multivariada (GLM-General Linear Models, para dados não balanceados). As decisões assentaram sempre nos valores F resultantes dos Quadrados-Médios do tipo III. Os efeitos da época do ano e do animal foram analisados por análise múltipla de variância (MANOVA) e por testes múltiplos de comparação (LSD). Considerou-se um nível de significância $\alpha=0,05$ (MAROCO, 2007).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. EFEITO DA ÉPOCA DO ANO SOBRE AS CARATERÍSTICAS ESPERMÁTICAS

Os valores médios obtidos para a temperatura (média e máxima), a humidade relativa assim como as horas de sol registadas nos períodos de tempo considerados encontram-se na tabela 5.2.

Tabela 5.2. Dados do Clima observados entre Setembro-Dezembro (Set-Dez), Janeiro a 20 de Março (Jan-Mar), 21 de Março a meados de Maio (Mar-Maio) e finais de Maio a Julho (Maio-Jul)

Parâmetros	Set-Dez	Jan-Mar	Mar-Maio	Mai-Jul
Temperatura média (°C) ^a	14,82	10,41	14,88	20,25
Temperatura máxima (°C) ^a	21,42	16,96	21,52	27,71
Humidade relativa (%) ^a	77,89	78,18	76,48	70,01
Horas de sol ^b	10,5	10,02	12,74	14,9

(a) Valores medidos na Estação Agro-metereológica da ESAC

(b) Valores tabelados para 40° de Latitude Norte

As variações termopluiométricas são típicas de um clima Mediterrânico. A queda pluviométrica ao longo do ano é baixa, com uma estação seca bem demarcada durante o período de Maio a Setembro. Os meses mais quentes são os de Julho e Agosto.

Dezembro e Janeiro são os meses mais frios e as horas diárias de sol atingem os menores valores entre Dezembro e Janeiro (Figura 5.1).

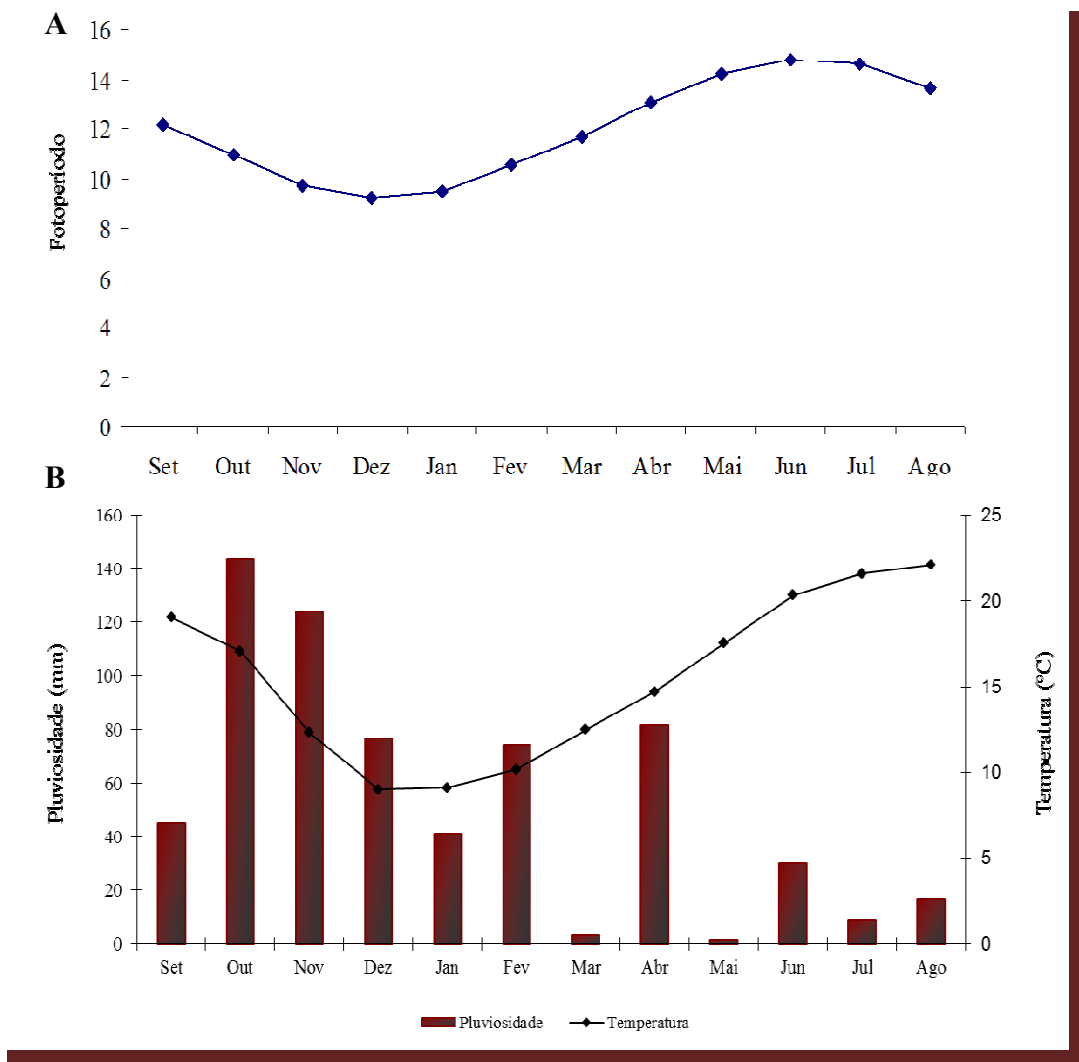


Figura 5.1. Gráfico do fotoperíodo (A) e gráfico termopluiométrico (B)

Os parâmetros espermáticos foram sujeitos a ANOVA multivariada (MANOVA, GLM para dados não balanceados) recorrendo ao modelo fixo teórico

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \gamma_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

em que as variáveis consideradas (parâmetros seminais) dependerão do *período do ano* (α), do *animal* (β) e da interação entre estes dois fatores (γ) adicionado da média geral observada (μ) e do erro aleatório (ϵ) associado a cada observação *ijkl*.

Na tabela 5.3 encontram-se os valores médios (MMQ's) produzidos pelo modelo supramencionado para a globalidade dos dados. Os valores médios mais baixos observados para as características seminais volume de filtrado, PMS, vitalidade e morfologia normal ocorreram entre Setembro e Dezembro, período do ano em que se observa diminuição das temperaturas médias mensais, que atingem o valor mais baixo em Janeiro. Posteriormente, e acompanhando o aumento das temperaturas e do fotoperíodo, a qualidade destas características tende a melhorar, durante a Primavera-Verão. O volume total de filtrado apresentou um valor médio global de 34,89 mL, variando entre o valor mínimo de 27,03 mL, em Set-Dez, e o valor máximo observado de 42,32 mL, em Mar-Maio ($P<0,05$). De Setembro a Julho, a vitalidade e a morfologia aumentaram ($P<0,05$), respectivamente, 36,09% e 31,10%. Já a concentração espermática, com um valor médio global de $250,21 \times 10^6$ spz/mL, apresentou-se superior em Set-Dez diminuindo cerca de 28,71% até finais de Julho.

Tabela 5.3. Características espermáticas (MMQ's) observadas nos ejaculados recolhidos entre Setembro e Dezembro (Set-Dez), Janeiro a 20 de Março (Jan-Mar), 21 de Março a meados de Maio (Mar-Maio) e meados de Maio a Julho (Maio-Jul)

Parâmetros espermáticos	Set-Dez	Jan-Mar	Mar-Maio	Mai-Jul	Todo o ano
Volume filtrado (ml)	27,03 ^a	32,98 ^a	42,32 ^b	33,53 ^a	34,89
Concentração ($\times 10^6$)	250,21 ^a	214,75 ^{ab}	196,32 ^{bc}	178,37 ^c	205,42
NTE ($\times 10^9$)	6,98 ^{ab}	6,40 ^{ab}	7,72 ^a	5,53 ^b	6,70
PMS (%)	30,34 ^a	30,73 ^a	36,95 ^b	32,09 ^a	33,04
Vitalidade (%)	46,16 ^a	55,17 ^b	61,40 ^c	62,82 ^c	58,16
Morfologia Anormal (%)	43,28 ^a	33,14 ^b	32,37 ^b	25,64 ^c	32,06
Cabeça (%)	21,90 ^a	16,99 ^b	15,08 ^b	9,79 ^c	14,95
Peça intermédia (%)	9,06 ^{ab}	6,41 ^c	8,21 ^b	8,45 ^b	7,92
Peça principal (%)	12,32 ^a	9,74 ^b	9,08 ^b	7,40 ^c	9,19
Morfologia Normal (%)	56,72 ^a	66,86 ^b	67,63 ^b	74,36 ^c	67,94
pH	7,48 ^{ab}	7,60 ^b	7,55 ^{ab}	7,46 ^a	7,53

Para cada parâmetro espermático, letras diferentes em subscrito (a, b, c) traduzem diferenças significativas ($P<0,05$) para o teste de diferença entre as médias.

A diminuição da concentração espermática de Setembro a Julho, concomitantemente com o aumento do volume de filtrado até meados de Maio, seguido de declínio, resultou num valor máximo de $7,72 \times 10^9$ para o NTE entre Março e Maio. A mobilidade espermática não apresentou variações significativas de Setembro até ao início da Primavera, mantendo um valor máximo significativamente diferente ($P < 0,05$) até meados de Maio (36,95%) e diminuindo significativamente ($P < 0,05$) até finais de Julho. O pH do esperma, com um valor médio global de 7,53, apresentou-se superior entre Janeiro e Março ($P < 0,05$), com mínimos em Mai-Jul e Set-Dez (*vide* Tabela 5.3).

Da ANOVA efetuada resulta que a *época do ano* influencia os parâmetros do esperma com exceção do pH e das anomalias espermáticas com sede na peça intermédia e na peça principal. Já o fator *indivíduo* apresenta-se significativo ($P < 0,001$) para todos os parâmetros em análise (Tabela 5.4, Tabela 5.5 e Tabela 5.6).

Tabela 5.4. ANOVA dos parâmetros espermáticos quantitativos em função da *época do ano* e do *indivíduo*

Fonte	Variável dependente											
	Volume (mL)			Concentração ($\times 10^6$)			NTE ($\times 10^9$)			pH		
	gl	QM		gl	QM		gl	QM		gl	QM	
Época do ano	3	2526,034	**	3	61974,142	***	3	110649718,044	**	3	0,263	
Animal	11	7847,413	***	11	114632,107	***	11	547230003,491	***	11	0,694	***
Época do ano x Animal	25	836,579	*	25	24196,255	***	25	80082075,253	***	25	0,164	
Erro	444	539,728		444	8059,591		444	26259776,504		444	0,155	
Total	484			484			484			484		

Notas: *** ($P < 0,001$) – altamente significativo; ** ($P < 0,01$) – bastante significativo; * ($P < 0,05$) – significativo

Tabela 5.5. ANOVA dos parâmetros espermáticos qualitativos em função da *época do ano* e do *indivíduo*

Fonte	Variável dependente								
	PMS (%)			Vitalidade (%)			Morfologia Normal (%)		
	gl	QM		gl	QM		gl	QM	
Época do ano	3	783,586	**	3	1345,934	***	3	1276,144	***
Animal	11	4404,668	***	11	6105,614	***	11	6716,377	***
Época do ano x Animal	23	247,458	**	23	582,878	***	23	742,228	***
Erro	415	119,543		415	219,105		415	139,453	
Total	453			453			453		

Notas: *** ($P < 0,001$) – altamente significativo; ** ($P < 0,01$) – bastante significativo

Tabela 5.6. ANOVA da sede das anomalias em função da época do ano e do indivíduo

Fonte	Variável dependente								
	Anomalias Cabeça (%)			Anomalias PI (%)			Anomalias PP (%)		
	gl	QM		gl	QM		gl	QM	
Época do ano	3	1122,809	***	3	36,327		3	54,073	
Animal	11	3750,199	***	11	221,528	***	11	1301,193	***
Época do ano x Animal	23	465,426	***	23	43,513	*	23	81,888	***
Erro	415	90,404		415	24,290		415	24,953	
Total	453			453			453		

Notas: *** ($P < 0,001$) – altamente significativo; * ($P < 0,05$) – significativo

Considerando todo o período de tempo analisado, verificaram-se correlações significativas ($P < 0,001$), entre os diversos parâmetros espermáticos, similares às observadas no capítulo anterior para os garanhões Lusitanos: a concentração espermática variou inversamente com o volume; já a mobilidade e a vitalidade espermáticas apresentaram correlação positiva entre si e ambas se correlacionaram negativamente com as alterações à morfologia das células. Coeficientes de correlação mais baixos e negativos, mas ainda significativos ($P < 0,01$), foram também observados entre o pH do ejaculado e o volume de sémen, o número total de espermatozóides e a mobilidade espermática (Tabela 5.7).

Tabela 5.7. Coeficientes de Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros seminais avaliados de Setembro a Julho

Parâmetros espermáticos	Concentração	NTE	PMS	Vitalidade	Anomalias Cabeça	Anomalias PI	Anomalias PP	Morfologia Normal	pH
Volume	-0,195 ***	0,739 ***	0,146 ***	NS	NS	NS	-0,218 ***	NS	-0,115 *
Concentração		0,349 ***	NS	-0,118 **	0,101 *	NS	0,220 ***	-0,180 ***	NS
NTE			NS	NS	0,183 **	NS	-0,106 **	NS	-0,116 *
PMS				0,483 ***	-0,316 ***	-0,129 **	-0,210 ***	0,360 ***	-0,097 *
Vitalidade					-0,394 ***	-0,167 ***	-0,283 ***	0,463 **	NS
Anomalias da Cabeça						NS	0,225 ***	NS	NS
Anomalias da PI							0,215 **	NS	NS

Nota: *** ($P < 0,001$) altamente significativo; ** ($P < 0,01$) bastante significativo; * ($P < 0,05$) significativo.

As alterações à morfologia espermática com sede na peça principal (PP) apresentaram correlações com as das regiões da cabeça e da peça intermédia, traduzindo tão-somente particularidades inerentes a cada macho uma vez que um dado animal produz um determinado tipo de anomalia espermática enquanto outro, um outro tipo.

Os valores de correlações, entre os diferentes parâmetros estudados, encontrados para os períodos de Setembro-Dezembro e de Janeiro a Julho, encontram-se na Tabela 5.8. O volume e a concentração espermática não se correlacionaram durante a contra-estação, assim como a mobilidade progressiva (PMS) também não se correlacionou com os parâmetros quantitativos (volume, concentração e NTE). A PMS e a vitalidade apresentaram maior homogeneidade de correlações com as alterações à morfologia da célula no período de Janeiro a Julho.

Tabela 5.8. Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os parâmetros seminais observados de Setembro a Dezembro e de Janeiro a Julho

Época	Parâmetro espermático	Concentração	NTE	PMS	Vitalidade	Anomalias Cabeça	Anomalias PI	Anomalias PP	Morfologia Normal	pH
Set-Dez	Volume		0,797	NS	NS	0,402**	NS	NS	NS	NS
	Concentração		0,423	NS	-0,288*	0,486**	NS	0,258*	-0,563**	-0,334**
	NTE			NS	NS	0,590**	-0,242*	NS	-0,428**	-0,244*
	PMS				0,675**	-0,539**	NS	-0,297*	0,647**	NS
	Vitalidade					-0,524**	NS	NS	0,546**	NS
Jan a Jul	Volume	-0,201**	0,782	0,170**	NS	NS	NS	-0,188**	NS	-0,116*
	Concentração		0,332	0,117**	NS	NS	NS	0,161**	NS	NS
	NTE			0,176**	NS	NS	NS	-0,119*	NS	NS
	PMS				0,457**	-0,272**	-0,126**	-0,192**	0,317**	NS
	Vitalidade					-0,356**	-0,166**	-0,273**	0,425**	NS
	Anomalias da Cabeça						NS	0,238**	NS	NS
	Anomalias da PI							0,222**	NS	NS

Nota: *** ($P < 0,001$) altamente significativo; ** ($P < 0,01$) bastante significativo; * ($P < 0,05$) significativo.

5.3.2. CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE GARANHÕES FÉRTEIS (GRUPO A) E SUB-FÉRTEIS (GRUPO B) AO LONGO DO ANO

O estudo dos parâmetros seminais, em cada um dos grupos de animais considerados (Grupo A e Grupo B), por aplicação do modelo matemático teórico acima referido (ponto 5.3.1) mostrou que a melhor qualidade seminal ocorre nos animais férteis (Grupo A) observando-se, ainda, pior qualidade do esperma durante a contra-estação, nos dois grupos de animais (Tabela 5.9). Para as características quantitativas, não se observaram diferenças significativas entre os períodos Jan-Mar e Mar-Maio, excepto para o volume de esperma no Grupo A ($P<0,05$). Já a PMS, não apresentou variações significativas no Grupo B e apresentou-se significativamente superior ($P<0,05$) entre Março e Maio, no Grupo A. A vitalidade e a morfologia espermáticas são significativamente superiores ($P<0,05$) no final da época de reprodução, nos dois grupos considerados.

Tabela 5.9. Parâmetros espermáticas (MMQ's) do Grupo A e do Grupo B, nos diferentes períodos do ano considerados

Parâmetros	Grupos	Época			
		Set-Dez	Jan -Mar	Mar- Maio	Maio-Jul
Volume (ml)	Grupo A	37,38 ^a	39,35 ^a	50,94 ^b	39,68 ^a
	Grupo B	13,22 ^a	23,42 ^b	25,07 ^b	17,15 ^a
Concentração (x10 ⁶)	Grupo A	264,91 ^a	234,16 ^{ab}	212,40 ^{bc}	184,56 ^c
	Grupo B	230,61 ^a	185,64 ^{ab}	164,15 ^b	161,87 ^b
NTE (x10 ⁹)	Grupo A	8,08 ^a	10,00 ^a	9,88 ^{ab}	6,58 ^b
	Grupo B	2,95 ^a	3,89 ^{ab}	3,41 ^{abc}	2,74 ^{ac}
PMS (%)	Grupo A	37,05 ^a	36,49 ^a	43,91 ^b	36,91 ^a
	Grupo B	20,29 ^a	22,11 ^a	23,02 ^a	19,21 ^a
Vitalidade (%)	Grupo A	49,38 ^a	56,62 ^b	67,09 ^c	68,60 ^c
	Grupo B	41,3 ^a	52,98 ^b	50,02 ^b	47,39 ^{ab}
Morfologia Normal (%)	Grupo A	60,54 ^a	77,7 ^b	76,71 ^b	78,38 ^b
	Grupo B	50,99 ^a	50,58 ^a	49,47 ^a	63,65 ^b
pH	Grupo A	7,51 ^a	7,34 ^{ab}	7,54 ^b	7,46 ^{ab}
	Grupo B	7,75 ^{ab}	7,75 ^a	7,58 ^a	7,46 ^b

Para cada grupo de fertilidade, e dentro de cada parâmetro seminal, letras diferentes em subscrito (a, b, c) traduzem diferenças significativas ($P<0,05$) para o teste de diferença entre as médias dos períodos do ano considerados.

Da ANOVA efetuada resultou que a *época do ano* não influencia os parâmetros quantitativos do esperma nos animais do Grupo B, contrariamente ao fator *indivíduo* (Tabela 5.10).

Tabela 5.10. ANOVA dos parâmetros espermáticos quantitativos em função da *época do ano* e do *animal* de acordo com os grupos de fertilidade (Grupo A e Grupo B)

Fonte		Variável dependente									
		Volume (mL)		Concentração (x10 ⁶)		NTE (x10 ⁹)		pH			
		gl	QM	gl	QM	gl	QM	gl	QM		
Época do ano	Grupo A	3	2994,653 **	3	59321,026 ***	3	154676688,153 **	3	0,169		
	Grupo B	3	269,061	3	13579,392	3	5755304,419	3	0,274		
Animal	Grupo A	7	7044,993 ***	7	101771,168 ***	7	526749486,147 ***	7	0,726 ***		
	Grupo B	3	605,354 **	3	144099,595 ***	3	22407004,939 ***	3	0,557 *		
Época do ano x Animal	Grupo A	15	1046,290	15	35167,103 ***	15	118860715,026 ***	15	0,217		
	Grupo B	7	220,741	7	9891,448	7	2432383,687	7	0,074		
Erro	Grupo A	298	744,703	298	8955,601	298	37654684,756	298	0,158		
	Grupo B	146		146		146		146			
Total	Grupo A	324		324		324		324			
	Grupo B	160		160		160		160			

Notas: *** ($P < 0,001$)—altamente significativo; ** ($P < 0,01$)—bastante significativo; * ($P < 0,05$)—significativo

Quanto aos parâmetros qualitativos do esperma, é evidente a influência que a *época do ano* e o *animal* exercem sobre a mobilidade e a morfologia das células espermáticas nos dois grupos de animais. Contrariamente ao Grupo A, no Grupo B, não se observou influência da *época do ano* para o parâmetro vitalidade espermática, apesar de os valores médios observados, entre Janeiro e Maio diferirem significativamente ($P < 0,05$) dos registados nos períodos de Set-Dez e Maio-Jul (*vide* Tabela 5.11).

Tabela 5.11. ANOVA dos parâmetros espermáticos qualitativos em função da *época do ano* e do *animal* de acordo com os grupos de fertilidade (Grupo A e Grupo B)

Fonte		Variável dependente					
		PMS (%)		Vitalidade (%)		Morfologia Normal (%)	
		gl	QM	gl	QM	gl	QM
Época do ano	Grupo A	3	745,352**	3	2118,426***	3	578,276***
	Grupo B	3	259,110**	3	320,151	3	1633,128***
Animal	Grupo A	7	4120,409***	7	6832,403***	7	5569,972***
	Grupo B	3	407,800***	3	1562,456***	3	2363,819***
Época do ano x Animal	Grupo A	14	260,869*	14	578,441***	14	580,476***
	Grupo B	6	280,935***	6	245,126*	6	1008,756***
Erro	Grupo A	283	145,375	283	218,825	283	90,878
	Grupo B	132	64,162	132	219,706	132	243,59
Total	Grupo A	308		308		308	
	Grupo B	145		145		145	

Notas: ***($P < 0,001$) -altamente significativo; **($P < 0,01$) -bastante significativo; *($P < 0,05$) -significativo.

Atente-se que, no que concerne à sede da alteração morfológica, a *época do ano* mostrou-se não significativa sobre as anomalias ao nível das regiões da peça intermédia e da peça principal, nos animais do Grupo A e sobre as anomalias da peça intermédia nos animais do Grupo B (*vide* Tabela 5.12). A incidência de espermatozóides com morfologia normal foi superior de finais de Maio a meados de Julho, nos dois grupos considerados (*vide* Tabela 5.9). Para o Grupo A, a ocorrência de alterações morfológicas, nomeadamente na região da cabeça e da peça principal, durante Set-Dez foi significativamente diferente ($P < 0,05$) da observada durante Jan-Jul sendo que neste período não ocorreram variações significativas (*vide* Figura 2). Pelo contrário, no Grupo B, não se observaram diferenças entre Set-Dez e Jan-Maio, notando-se contudo uma clara melhoria, na morfologia das células, no final da época de reprodução ($P < 0,05$) (*vide* Figura 2). De realçar que os ganhões considerados neste grupo são, maioritariamente, da raça Sorraia.

Tabela 5.12. ANOVA das alterações à morfologia espermática em função da época do ano e do animal de acordo com os grupos de fertilidade (Grupo A e Grupo B)

Fonte		Variável dependente					
		Cabeça (%)		Peça intermédia (%)		Peça principal (%)	
		gl	QM	gl	QM	gl	QM
Época do ano	Grupo A	3	706,697***	3	22,435	3	5,713
	Grupo B	3	1015,760***	3	33,315	3	124,318*
Animal	Grupo A	7	4291,495***	7	229,639**	7	315,888***
	Grupo B	3	1452,254***	3	202,882***	3	2137,338***
Época do ano x Animal	Grupo A	14	461,792***	14	39,027	14	48,249**
	Grupo B	6	471,295**	6	64,155	6	162,835***
Erro	Grupo A	283	50,291	283	26,527	283	18,621
	Grupo B	132	176,405	132	19,493	132	38,528
Total	Grupo A	308		308		308	
	Grupo B	145		145		145	

Notas: ***($P < 0,001$) -altamente significativo; **($P < 0,01$) -bastante significativo; *($P < 0,05$) -significativo.

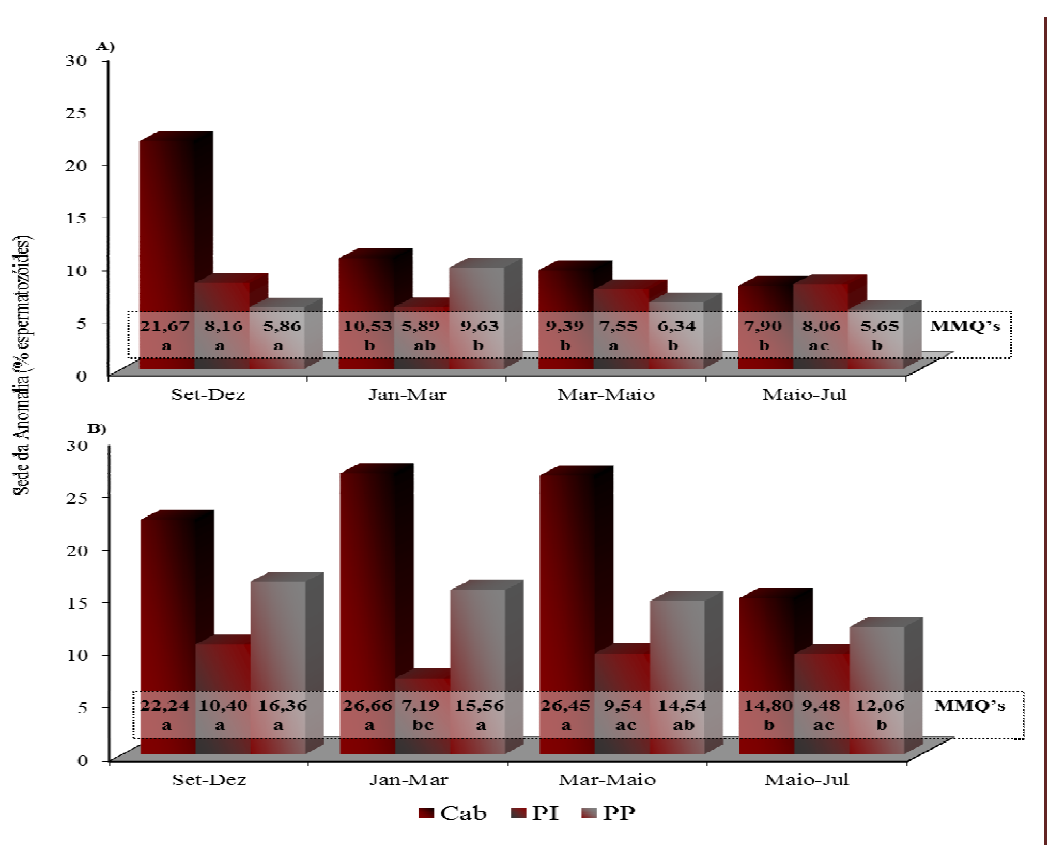


Figura 5.2. Incidência (%) de alterações morfológicas nas diferentes regiões da célula nos ejaculados analisados ao longo do ano e para o Grupo A(A) e o Grupo B (B). As barras representam os valores médios (MMQ's) que se evidenciam no retângulo em destaque; abaixo, em letras minúsculas (a, b, c) encontra-se o resultado do teste de diferença entre as médias das épocas, sendo que letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os diferentes períodos do anos, para cada sede de anomalia (Cab- cabeça; PI- peça intermédia; PP- peça principal)

De forma a modelar-se o perfil de variação dos parâmetros espermáticos básicos ao longo do ano testaram-se diferentes modelos regressivos (SPSS-REG/Curve estimation). O pH do esperma foi o único parâmetro para o qual nenhuma função regressiva apresentou significância. Os resultados encontram-se na figura 5.3 e, como se pode observar, o volume (Vol), a concentração (Conc), a vitalidade (Vit) e a morfologia (Morf) espermáticas são definidas por funções polinomiais de 3ª ordem; já para o NTE e a mobilidade (Mob) resultaram funções polinomiais de 2ª ordem. Os perfis de modelação do NTE e da mobilidade espermática são semelhantes e menos ondulantes do que os restantes parâmetros mas, à semelhança dos outros, parecem distribuir-se em torno de um valor centrado no final de Março. Para o parâmetro morfologia espermática, o perfil de modelação dos animais do Grupo B é quasi-simétrico em relação ao do Grupo A, traduzindo uma melhoria serôdia da morfologia normal das células. Quanto ao perfil de modelação da concentração espermática, bem mais ondulante no Grupo B do que no Grupo A, apresenta-se simétrico em relação aos do volume, da vitalidade e da morfologia. Os perfis destes últimos ondulam de forma semelhante ao fotoperíodo e à curva da temperatura média mensal ao longo do ano. A tabela 5.13 ilustra o grau de significância dos parâmetros regressivos assim como os respectivos coeficientes de determinação ajustados (R^2_{aj}).

Tabela 5.13. Coeficientes de determinação ajustados (R^2_{aj}) e grau de significância dos parâmetros regressivos

Parâmetros espermáticos		Volume	Concentração	NTE	PMS	Vitalidade	Morfologia Normal
R^2_{aj}	Grupo A	0,043	0,067	0,027	0,014	0,035	0,059
	Grupo B	0,093	0,200	0,048	0,059	0,062	0,082
Significância	Grupo A	0,002**	0,001***	0,011*	0,05*	0,008**	0,001***
	Grupo B	0,001***	0,001***	0,019*	0,003**	0,016*	0,003**

Notas: ***($P < 0,001$) – altamente significativo; **($P < 0,01$) – bastante significativo; *($P < 0,05$) – significativo.

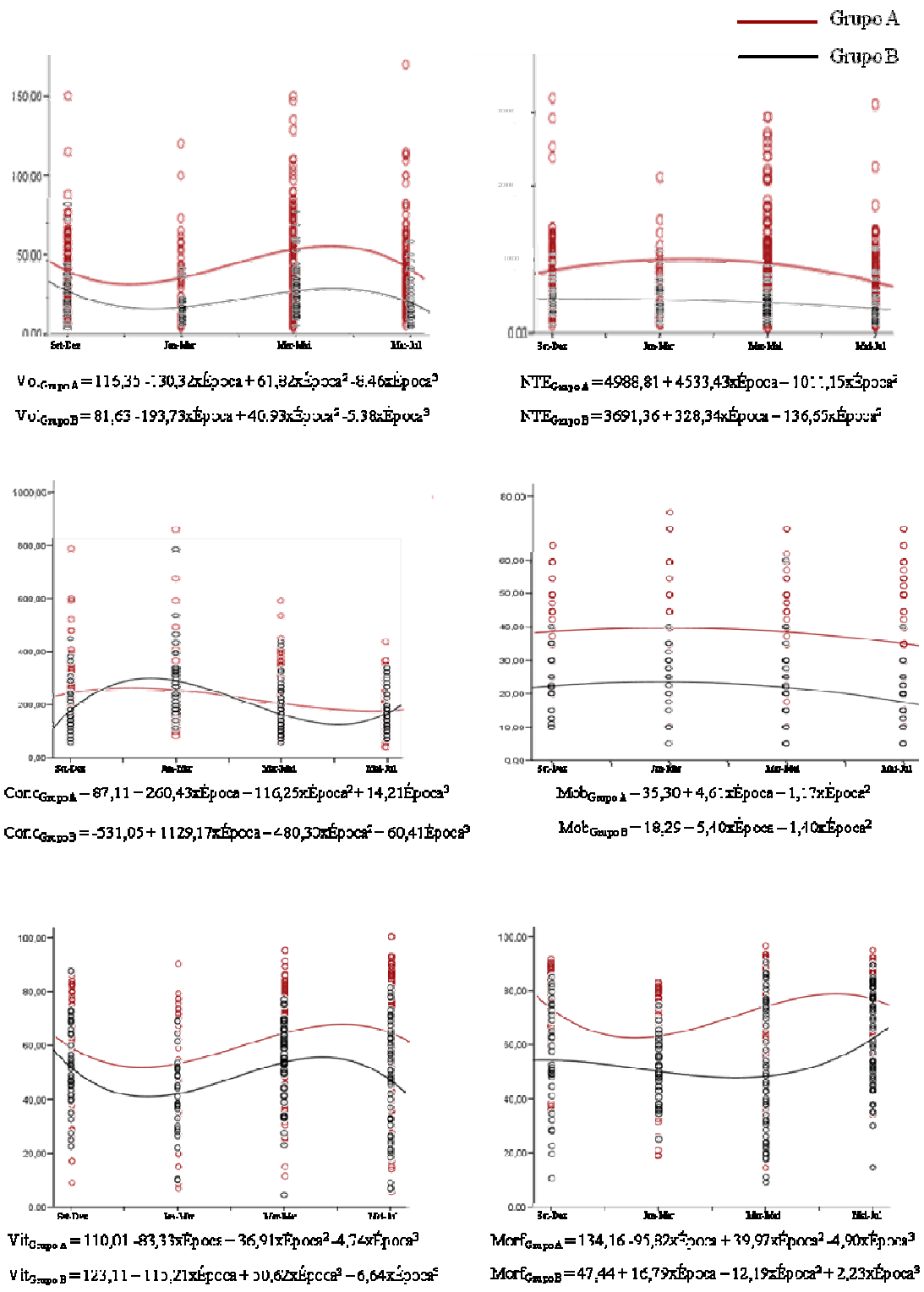


Figura 5.3. Modelação do perfil dos parâmetros espermáticos ao longo do ano de acordo com os dois grupos de animais
(Grupo A-Férteis e Grupo B- Sub-férteis)

Uma proporção (n=231) dos ejaculados considerados neste estudo foi ainda sujeita à avaliação da integridade do acrossoma (PSA-FITC). Os ejaculados dos animais do Grupo A apresentaram superior qualidade acrossomal ($P<0,001$) e, nos dois grupos, é notória a influência dos fatores em análise sendo clara uma melhoria da qualidade dos acrossomas com o avançar da época de reprodução (*vide* Figura 5.4). Contudo, nos períodos de Set-Dez e Jan-Mar não se observaram diferenças significativas entre os grupos para os valores médios (MMQ's).

Para a interidade do acrossoma, também se aplicaram modelos regressivos a cada um dos grupos de fertilidade, enquanto função da época do ano, tendo resultado igualmente funções polinomiais de 3ª ordem com perfis de modelação coincidentes com os da vitalidade espermática (*vide* Figura 5.5) mas com percentagens de espermatozóides com acrossomas íntegros (AI) superiores às percentagens de espermatozóides vivos observados com recurso ao método de exclusão da eosina, associada à nigrosina.

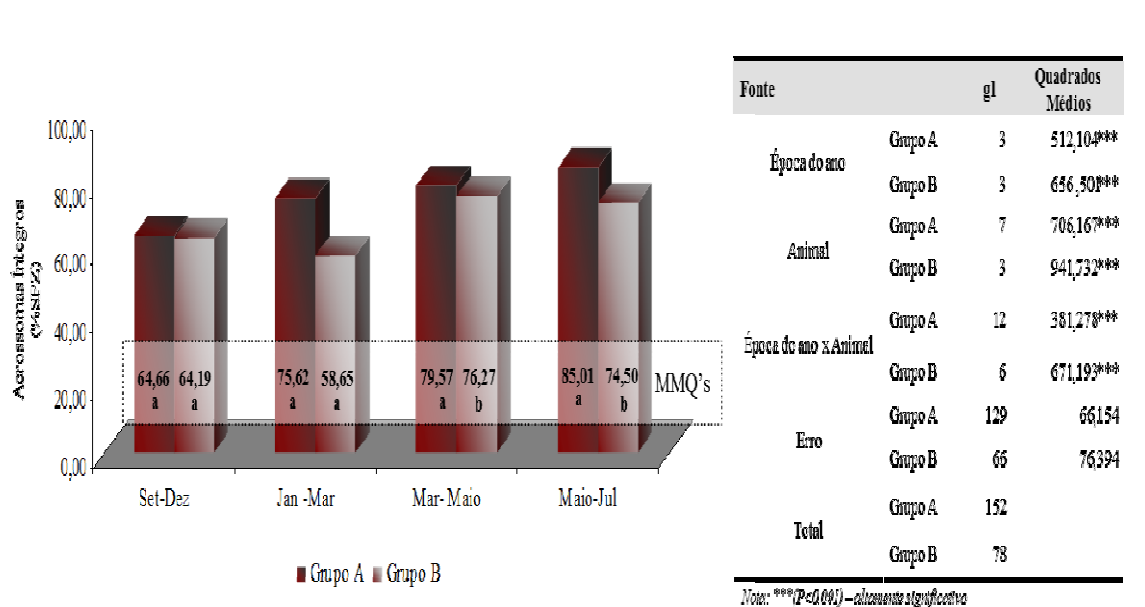


Figura 5.4. Percentagem de espermatozóides com acrossomas intactos nos ejaculados analisados ao longo do ano e para os dois grupos de animais considerados.

As barras representam os valores médios (MMQ's) que se evidenciam no retângulo em destaque; abaixo, encontra-se o resultado do teste de diferença entre as médias dos grupos sendo que valores com letras diferentes (a,b) representam diferenças significativas ($P<0,05$) entre os grupos (Grupo A-Férteis e Grupo B- Sub-férteis). Na tabela consta o resultado da ANOVA.

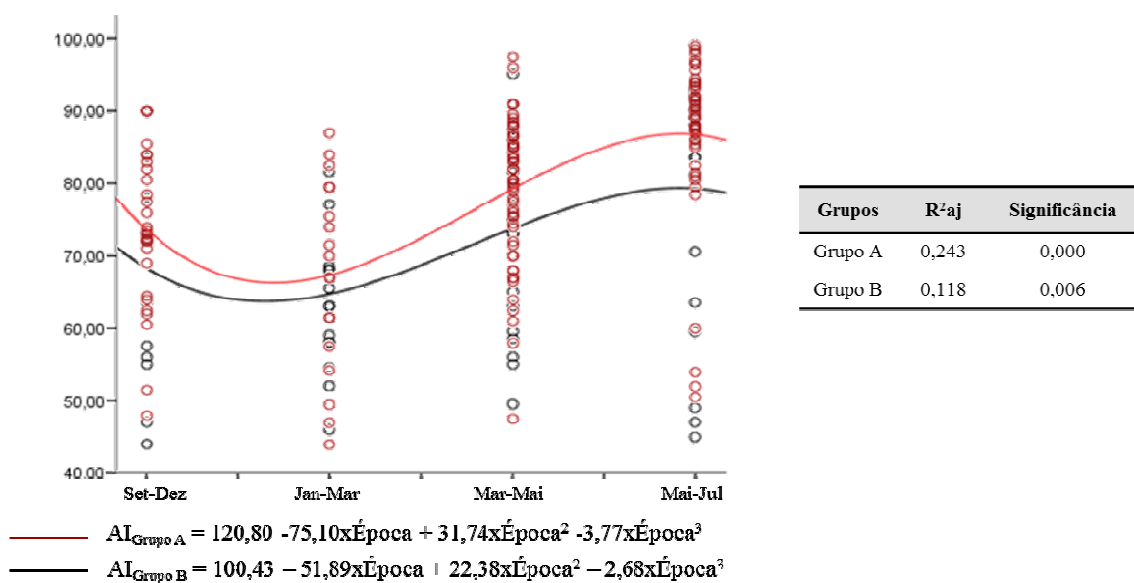


Figura 5.5. Modelação do perfil da integridade do acrossoma (AI) (%) ao longo do ano para os dois grupos de animais.

(Grupo A-Férteis e Grupo B- Sub-férteis)

Na tabela 5.14 encontram-se os valores determinados para a fertilidade de cada garanhão no final da época de reprodução (FER) assim como os valores médios dos parâmetros seminais.

Tabela 5.14. MMQ's dos parâmetros espermáticos e fertilidade de cada garanhão, durante a época de reprodução

Animal	FER (%)	Volume (ml)	Concentração ($\times 10^6$)	NTE ($\times 10^6$)	PMS (%)	Vitalidade (%)	Anomalias Cabeça	Anomalias PI	Anomalias PP	Morfologia Normal (%)	pH	AI (%)
E (Sorraia)/Grupo B	0,00	36,34	107,10	3,45	14,62	42,26	23,31	10,25	10,71	55,72	7,82	74,03
D (Sorraia)/Grupo B	16,67	20,51	155,44	3,03	22,85	62,18	39,08	6,31	14,82	39,79	7,59	74,36
A (Sorraia)/ Grupo B	44,44	19,02	246,35	4,33	19,98	38,88	14,30	13,08	25,96	46,66	7,51	58,45
C (Garrana)/Grupo B	50,00	21,82	124,42	2,61	26,64	52,33	15,59	7,84	3,49	73,09	7,46	80,52
I (Holstein)/Grupo A	61,11	26,05	243,32	5,86	29,54	68,45	4,74	11,44	3,51	80,31	7,73	85,73
B (AA)/Grupo A	81,97	38,21	216,27	7,55	53,95	77,50	6,02	7,93	10,38	75,67	7,47	81,68
G (PSL)/Grupo A	84,51	47,19	191,53	8,17	38,80	68,11	7,85	3,48	3,23	85,44	7,40	83,30
H (SF)/Grupo A	85,71	46,05	232,50	10,13	43,06	75,51	6,63	7,89	4,26	81,24	7,34	83,26
Q (BWP)/Grupo A	87,50	42,99	118,27	4,62	38,82	57,91	10,85	9,01	10,75	69,40	7,09	80,11
F (PSL)/Grupo A	89,79	61,51	213,10	11,99	27,32	41,94	24,65	7,79	9,19	58,37	7,51	73,76
P (PSL)/Grupo A	94,12	63,45	112,50	6,95	48,43	66,65	6,50	5,07	2,21	86,23	7,50	86,75
J (PSI)/Grupo A ¹	100,00	21,42	273,88	5,96	30,75	63,22	7,48	4,67	6,50	81,35	7,65	74,03

Nota: 1- Este animal só tinha registo de cobertura de uma égua.

Para modelar a relação funcional entre a FER e os parâmetros espermáticos analisados, independentemente de existir ou não uma relação de causa-e-efeito, os dados relativos à época de reprodução foram sujeitos a análise de regressão linear (SPSS/REGRESSION/Stepwise), produzindo-se as equações [1], [2] e [3], respectivamente para o conjunto dos animais, para o Grupo A e para o Grupo B.

$$FER = 53,56 + 0,62xMob + 0,63xMorf + 0,02xNTE - 0,25x Vit - 0,84xpH \quad [1]$$

$$FER_{\text{Grupo A}} = 81,52 + 0,14xMob + 0,25xAn.Cab - 0,072xVit \quad [2]$$

$$FER_{\text{Grupo B}} = 17,62 + 0,81xMob - 0,53xAn.Cab + 0,86xAn.PI \quad [3]$$

Os coeficientes de determinação ajustados (R^2_{aj}) assim como a significância de cada um dos parâmetros na respectiva função encontram-se na tabela que se segue (Tabela 5.15). A mobilidade espermática apresentou-se significativa, mais acentuadamente nos animais com problemas de fertilidade. As alterações à morfologia da região da cabeça evidenciaram-se quando a análise incidiu sobre cada um dos grupos.

Tabela 5.15. Coeficientes de determinação e significância dos parâmetros espermáticos das funções de regressão

Função	R^2_{aj}	Significância				
FER [1]	0,478	Mobilidade ***	Morfologia Normal ***	NTE ***	Vitalidade ***	pH *
FER _{Grupo A} [2]	0,124	Mobilidade **	Anomalias Cabeça ***	Vitalidade *		
FER _{Grupo B} [3]	0,364	Mobilidade ***	Anomalias Cabeça ***	Anomalias PI **		

Notas: *** ($P < 0,001$) – altamente significativo; ** ($P < 0,01$) – bastante significativo; * ($P < 0,05$) – significativo.

O modelo produzido para o Grupo B explica cerca de 36% das variações da FER observadas neste grupo enquanto para o Grupo A a proporção da variabilidade da FER que é atribuível à dependência da fertilidade da mobilidade, anomalias da cabeça e vitalidade se fica pelos 12%.

5.4. DISCUSSÃO

Nos ganhões, a capacidade reprodutiva máxima ocorre durante a época do ano em que o fotoperíodo aumenta (CLAY e CLAY, 1992) o que, no Hemisfério Norte, corresponde ao período entre o equinócio de Março e o solstício de Junho. Na contra estação, para além da libido, parece haver redução do tamanho testicular e da sua capacidade de produzir espermatozóides (THOMPSON *et al.*, 1977; BERNDTSON, SQUIRES, e THOMPSON, 1983; JOHNSON e THOMPSON, 1983; CLAY *et al.*, 1987).

Neste estudo confirma-se que, para a nossa latitude, as condições ambientais modulam a actividade das gónadas e das glândulas anexas ao aparelho reprodutor. Variações específicas nas características espermáticas devidas à sazão têm também sido referidas por alguns autores (PICKETT *et al.*, 1976; MAGISTRINI, CHANTELOUBE, e PALMER, 1987; JASKO, LEIN e FOOTE, 1990; BLOTTNER *et al.*, 2001; JANETT *et al.*, 2003a; JANETT *et al.*, 2003b) apesar de alguma distinção entre resultados ser evidente. Tais dissemelhanças podem resultar de os estudos serem feitos em latitudes diferentes e sobre raças distintas, conforme referido para outras espécies (CHEMINEAU *et al.*, 2008).

A similaridade dos resultados obtidos nesta pesquisa com outros trabalhos desenvolvidos na Europa (MAGISTRINI, CHANTELOUBE, e PALMER, 1987; JANETT *et al.*, 2003a, 2003b) e nos EUA (PICKETT *et al.*, 1976; JASKO, LEIN e FOOTE, 1990) depende do parâmetro espermático que esteja a ser considerado. Atentando ao volume de filtrado, os valores mais elevados registaram-se na Primavera e os mais baixos entre Setembro e Dezembro, o que está de acordo com o obtido por MAGISTRINI, CHANTELOUBE, e PALMER (1987) mas contrasta com o obtido por PICKETT *et al.* (1976). Os valores mais baixos de concentração, NTE e pH foram observados entre finais de Maio e Julho. Estes resultados contrastam com os obtidos por MAGISTRINI, CHANTELOUBE, e PALMER (1987) e PICKETT *et al.* (1976) mas vão de encontro aos obtidos por JANETT *et al.* (2003a; 2003b). A mobilidade e

a vitalidade espermáticas apresentaram-se superiores nos períodos de Mar-Maio e Maio-Jul, respectivamente, e inferiores em Set-Dez, o que contrasta com o trabalho de PICKETT *et al.* (1976), que não observou variações sazonais para o parâmetro mobilidade, mas está de acordo com os resultados de MAGISTRINI, CHANTELOUBE, e PALMER (1987), JANETT *et al.* (2003a; 2003b) e JASKO, LEIN e FOOTE (1990), que também observaram menores mobilidades durante o Inverno. Uma fraca influência da sazão na modulação da mobilidade espermática ao longo do ano foi ainda observada por CLAY *et al.* (1987). Relativamente à morfologia espermática, registámos diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a Primavera-Verão e o Outono-Inverno, resultados estes que contrariam os obtidos por WRENCH *et al.* (2010). JANETT *et al.* (2003a) observaram cerca de 30% de espermatozóides com morfologia normal na época de cobrição, valor esse considerado como problemático (CARD, 2005) e claramente distinto do registado neste estudo (acima de 60%, para a globalidade dos dados). Só para animais sub-férteis é que se observaram valores inferiores a 50% de espermatozóides normais, sendo que nos férteis os valores observados se situaram acima dos 70%, resultado este que está de acordo com o obtido por HURTGEN (1992), que verificou mais de 60% de espermatozóides com morfologia normal em ejaculados de garanhões com índices de fertilidade elevados. Referências à existência de uma relação entre a percentagem de espermatozóides com defeitos maiores e a fertilidade nos garanhões emergem ainda nos trabalhos de JASKO, LEIN e FOOTE (1990), GRAVANCE *et al.*, (1996) e LOVE, VARNER e THOMPSON (2000). Noutras espécies, essa relação também já foi estabelecida (AZIZ *et al.*, 1998; HIRAI *et al.*, 2001; HIDALGO, RODRÍGUEZ e DORADO *et al.*, 2008) nomeadamente quando analisadas as alterações à morfologia normal da cabeça da célula espermática.

Globalmente, a qualidade espermática tende a melhorar a partir da Primavera, no entanto, considerando a generalidade dos animais, os resultados obtidos neste estudo mostraram que os parâmetros espermáticos concentração, vitalidade e morfologia são mais fortemente influenciados pela sazão ($P < 0,001$) do que o volume, o NTE e a mobilidade ($P < 0,01$). O pH do esperma não mostrou ser influenciado pela *época do ano*, contrastando com um estudo anterior realizado sobre um menor número de animais (GAMBOA *et al.*, 2011). Estes resultados evidenciam a influência da sazão na qualidade da espermatogénese. Sendo a concentração espermática função do volume de esperma, o NTE estará mais dependente do indivíduo do que da época do ano; o volume de esperma é

constituído maioritariamente pelas secreções das glândulas anexas e apesar da actividade destas ser modulada pelos estímulos do fotoperíodo, o comportamento do garanhão durante a colheita, determinado por uma variedade de factores externos tais como o grau de excitação sexual, a temperatura da vagina artificial e agentes condicionantes da distração dos animais pode ter contribuído para que o efeito do *indivíduo* fosse mais marcado do que o da *sazon* sobre o volume de filtrado e o respectivo pH, conforme observado anteriormente por outros autores (PICKET *et al.*, 1976).

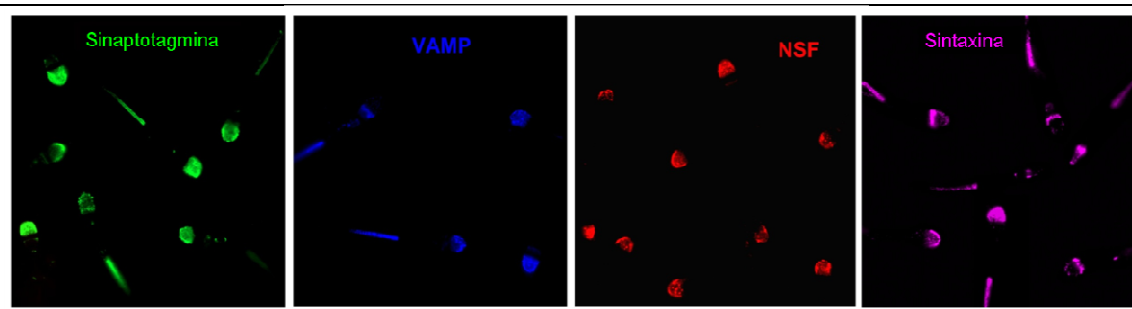
Quando considerados os grupos de acordo com a fertilidade dos animais, os resultados da ANOVA aplicada sugerem ainda uma forte influência do *indivíduo* sobre os parâmetros analisados, principalmente no Grupo B. Variações individuais foram já observadas no estudo anterior e têm sido ainda referidas por outros autores (GEBAUER *et al.*, 1976; SAMPER, HELLANDER e CRABO, 1991; VIDAMENT *et al.* 1997; BATELLIER *et al.*, 2001; BLOTTNER *et al.*, 2001) sendo que o estudo de ROSER e HUGHES (1992) evidenciou ainda uma alteração ao funcionamento do eixo hipotálamico-pituitário-gonadal em garanhões com problemas de fertilidade.

As funções regressivas encontradas, para os dois grupos de animais considerados, seguem um perfil similar aos perfis da temperatura média e do fotoperíodo ao longo do ano, no caso da vitalidade, da morfologia, do volume e da integridade do acrossoma; para a concentração espermática, o perfil é simétrico, e mais ondulante no Grupo B. Como resultado da relação inversa entre o volume de esperma e a sua concentração, o NTE apresenta um perfil quasi-parabólico (mais acentuado nos animais do Grupo B) de concavidade negativa cujo vértice se situa entre o início da primavera e o início do verão. A morfologia espermática começa a melhorar a partir de meados de Março (com o advento da primavera), no Grupo A, enquanto no Grupo B essa melhoria é mais tardia, entre finais de Maio a Julho. A qualidade dos acrossomas também é melhor nesta altura do ano, nos dois grupos de animais, no entanto, os valores médios registados são sempre superiores nos animais do Grupo A. A mobilidade espermática, também superior no Grupo A, apresentou perfis menos ondulantes nos dois grupos. Este resultado, aliado ao da ANOVA, sugere que esta característica estará mais dependente do *indivíduo* em si mesmo enquanto factor individual de variação.

Em suma, tanto para garanhões de fertilidade comprovada como para os que apresentam problemas de fertilidade, os ejaculados exibiram superior qualidade espermática a partir de Março registando-se, entre Setembro e Dezembro, os valores de qualidade seminal mais baixos. Este aspecto deverá ser tido em consideração na interpretação dos espermogramas efetuados na contra-estação, nos concursos de admissão de machos ao Livro de Reprodutores e poderá ter algumas implicações quanto à recolha de sémen em diferentes alturas do ano para criopreservação e posterior utilização em inseminação artificial. De igual forma, a opção de colocar as éguas à reprodução logo no início do ano (Janeiro, Fevereiro) deverá ser ponderada na generalidade, mas especialmente se se tratar de animais da raça Sorraia, uma vez que a FER no Grupo B é fortemente influenciada pela mobilidade e pelos parâmetros morfológicos da célula, parâmetros estes que se mostraram significativamente influenciados pela sazão (respectivamente, $P < 0,01$ e $P < 0,001$), sendo superiores no final da época de reprodução. Este considerando assume ainda mais importância quando atentado que o efeito do fator *indivíduo* sobre a qualidade do esperma se sobrepõe ao efeito da *época do ano* nos animais do Grupo B, maioritariamente garanhões Sorraia. Assim, a avaliação da qualidade seminal dos machos envolvidos em programas de IA é preponderante sendo recomendada a prática de um espermograma completo antes da sua utilização, conforme procedimento por nós adoptado e referido no capítulo 3. Essa avaliação prévia, mais do que procurar inferir do potencial de fertilidade do indivíduo, permite caracterizar o seu padrão espermático e ajustar o programa de manejo reprodutivo de forma a potenciarem-se os índices reprodutivos.

CAPÍTULO 6

MICRODOMÍNIOS LIPÍDICOS, PROTEÍNAS SNARE E UBIQUITINAÇÃO DIFERENCIAL EM ESPERMATOZÓIDES EQUINOS: POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA FERTILIDADE



SUMÁRIO

Neste capítulo descreve-se o trabalho realizado para avaliar a presença, nos espermatozoides equinos, de proteínas relacionadas com a hipótese SNARE de fusão de membranas em espermatozoides obtidos de ganhanhos com e sem problemas de fertilidade. Estas proteínas incluem a R-SNARE sintaxina, a Q-SNARE sinaptobrevina/VAMP, o sensor de cálcio sinaptotagmina, a GTPase Rab3a e a NSF ATPase. A análise imunocitoquímica revelou a presença destas proteínas na região acrossómica dos espermatozoides equinos assim como a presença de caveolina-1, proteína envolvida na organização de microdomínios lipídicos (“lipid rafts”). Estes foram também observados nos espermatozoides por marcação do gangliósido GM1 com a subunidade β da toxina da cólera. Os ganhanhos com problemas de fertilidade apresentaram, nos seus ejaculados, uma percentagem de espermatozoides marcados para SNARES e Caveolina significativamente inferior ($P < 0,001$) ao observado nos animais de fertilidade comprovada. A ubiquitinação à superfície das células foi também investigada e um problema associado ao macho foi confirmado quando as éguas previamente inseminadas com sêmen de um macho com problemas de fertilidade foram beneficiadas com sucesso por um macho de fertilidade comprovada. Os resultados sugerem que a utilização destes marcadores moleculares pode ser útil na avaliação de casos de infertilidade idiopática em ganhanhos.

De acordo com o nº2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº388/70 foram utilizados na elaboração deste capítulo alguns resultados parcialmente publicados anteriormente:

(i) Em jornais internacionais com arbitragem

Gamboa, S. e Ramalho-Santos, J. - SNAREs proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. **Theriogenology**. ISSN: 0093-691X. 64 (2005), 275–291.

6.1. INTRODUÇÃO

Nos atuais sistemas de criação cavalar, os critérios morfofuncionais determinam a aceitação/rejeição dos machos como futuros reprodutores, apesar de as provas seletivas compreenderem a avaliação da qualidade de um ejaculado. Os parâmetros seminais utilizados na rotina laboratorial para aceder à fertilidade potencial de um garanhão têm um valor preditivo limitado na medida em que falham na detecção de casos de sub-fertilidade ou mesmo infertilidade. Com efeito, reconhece-se que animais sub-férteis ou mesmo inférteis podem apresentar perfis espermáticos considerados normais assim como garanhões férteis, características seminais típicas de animais sub-férteis (MAGISTRINI *et al.*, 1996). Uma explicação possível para o exposto pode residir no fato de os parâmetros observados num espermograma terem subjacente o conceito de integridade estrutural da célula olvidando componentes moleculares importantes para que o espermatozóide possa desempenhar com sucesso o seu papel, isto é, a fecundação de um oócito. No cerne dos eventos espermáticos que culminam na fertilização estão a membrana plasmática e as membranas acrossómicas, interna e externa. A distribuição espacial de lípidos e proteínas nestas membranas parece ter um papel preponderante na sequência desses eventos, marcadamente caracterizados por alterações à topologia do plasmalema e sua fusão com a membrana acrossómica externa.

Os espermatozoides dos mamíferos exibem domínios de membrana altamente regionalizados tanto sob o ponto de vista dos seus componentes (BEARER e FRIEND, 1982) como do da difusão lateral (WOLF e VOGLMAYR, 1984; MYLES, PRIMAKOFF e KOPPEL, 1984; LADHA *et al.*, 1997). Os “lipid rafts” (TREVIÑO *et al.*, 2001), ricos em caveolina (TRAVIS *et al.*, 2001), parecem ter um papel importante no recrutamento de proteínas envolvidas em mecanismos de sinalização celular (SIMONS e IKONEN, 1997; RIETVELD e SIMONS, 1998) assim como no de proteínas SNARE (CHAMBERLAIN, BURGOYNE e GOULD, 2001). O gangliósido GM1 apresenta-se como um marcador destes microdomínios lipídicos nos espermatozoides de mamíferos (TREVIÑO *et al.*, 2001; BUTTKE *et al.*, 2006; SELVARAJ *et al.*, 2009; JONES *et al.*, 2010).

Os estudos conduzidos até à data sugerem que as células espermáticas usam a mesma maquinaria de fusão e os mesmos componentes reguladores caracterizados para outros eventos secretórios (TOMES *et al.*, 2002 e referências aí citadas). Proteínas da família das *Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) Attachment protein Receptor* (SNARE) são amplamente consideradas como fundamentais nos processos de fusão de membranas biológicas mediados pelo íon cálcio (Ca^{2+}) (CHEN e SCHELLER, 2001; JAHN e SCHELLER, 2006; VERHAGE e TOONEN, 2007). Algumas dessas proteínas foram já identificadas no acrossoma dos espermatozóides de algumas espécies de mamíferos (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2000; KATAFUCHI *et al.*, 2000; YUNES *et al.*, 2000; MICHAUT *et al.*, 2000; TOMES *et al.*, 2002). Elas modulam a secreção durante a reação acrossômica, processo este dependente do íon cálcio. Sensores de cálcio da família das sinaptotagminas foram também já identificados na região da cabeça dos espermatozóides (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2000; MICHAUT *et al.*, 2001; HUTT *et al.*, 2002).

Se, por um lado, a presença de proteínas mediadoras de processos de fusão de membranas se pode associar à funcionalidade espermática, a ubiquitinação à superfície das células tem sido descrita como um fenómeno que marca espermatozóides mal formados, quer essa má formação seja óbvia a nível morfológico ou não (SUTOVSKY *et al.*, 2001, 2002 e 2003). Assim, neste trabalho, objectivamos examinar a ubiquitinação dos espermatozóides equinos como ferramenta de apreciação de espermatozóides anormais a par da avaliação funcional das células investigando a presença de caveolina-1 e de proteínas associadas à hipótese SNARE de fusão de membranas.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. ANTICORPOS E FLUOROCROMOS

Para a avaliação de microdomínios lipídicos (lipid rafts) utilizou-se o *Vybrant*® *Lipid Raft Labeling Kit* (V34403, *Molecular Probes Inc.*, Eugene, OR, USA). O anticorpo primário para a caveolina 1 foi adquirido à *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA, USA). O anticorpo secundário conjugado com o isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi fornecido pela *Zymed* (San Francisco, CA, USA). Os anticorpos específicos

para a syntaxina 1 (formas neuronais 1A e 1B), VAMP/sinaptobrevina, NSF, Rab3a e o anticorpo monoclonal sinaptotagmina I foram adquiridos à *Synaptic Systems* (Gottingen, Germany). Os anticorpos secundários para syntaxina, VAMP, NSF e Rab3a, conjugados com o isotiocianato de fluoresceína (FITC), foram adquiridos à Zymed (San Francisco, CA, USA). O anticorpo anti-sinaptotagmina I foi uma oferta do Prof. Dr. Gary Wessel (Brown University) ao Prof. Dr. João Ramalho-Santos. A anti-ubiquitina (clone KM691, Kamiya Biomedical, USA) e o PSA-FITC foram fornecidos pela Sigma (St. Louis, MO, USA) e o Iodeto de Propídio (IP) proveio da Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

6.2.2. COLHEITAS, AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO DO ESPERMA

Para avaliar a ocorrência e distribuição de microdomínios lipídicos, de proteínas relacionadas com a hipótese SNARE de fusão de membranas e da ubiquitinação diferencial dos espermatozóides utilizaram-se um total de 53 amostras de esperma, recolhidas de 16 garanhões (7 PSL, 5 Sorraias, 1 Anglo-Árabe, 2 Hanoverianos e 1 Garrano) envolvidos, ou não, em programas de inseminação artificial no Posto de Cobrição da ESAC durante várias épocas de reprodução. Conhecido que era o historial de fertilidade destes animais, foi possível agrupá-los em dois grupos: férteis e in(sub)-férteis.

As amostras de esperma foram obtidas durante a época de reprodução (de Fevereiro a Julho) sendo que, no início da época, os animais foram sujeitos a um espermograma completo constituído pela análise de 4 ejaculados, de uma série de 5, obtidos em dias consecutivos, de forma a padronizar-se a produção espermática. A recolha dos ejaculados, a sua análise sumária e o acesso à integridade dos acrossomas, a preparação de doses de sémen e a sua aplicação decorreu conforme descrito no capítulo 3.

Nas avaliações envolvendo microscopia de fluorescência, as amostras, depois de tratadas conforme se descreve abaixo, foram montadas em meio de montagem VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e 100 a 200 células por lâmina foram visualizadas com um microscópio de fluorescência HUND H 600 AFL (filtro de fluoresceína $\lambda_{\text{excitação}}=494$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=520$ nm).

6.2.3. IMUNOCITOQUÍMICA

6.2.3.1. MICRODOMÍNIOS LIPÍDICOS (LIPID RAFTS) E CAVEOLINA-1

Para a avaliação da presença e localização de “lipid rafts” foi preparada, de acordo com as instruções do fabricante e armazenada a -20°C , uma solução *stock* (1mg/ml) da subunidade β da toxina da cólera (recombinante) marcada com a Alexa Flúor 488 (componente A do kit; CT-B). A subunidade β da toxina da cólera liga à cadeia pentassacarídea do gangliósido M1 (GM1), um marcador específico de “lipid rafts” (MERRITT *et al.*, 1994; JANES, LEY E MAGEE, 1999). Para cada sessão de trabalho, e imediatamente antes do seu uso preparou-se, a partir da solução *stock*, uma solução de CT-B a 1 $\mu\text{g/ml}$. O anticorpo anti-CT-B (soro de coelho, componente B do kit) foi diluído em PBS (1:200) imediatamente antes do seu uso. Amostras de sémen foram diluídas em PBS (1x10⁶spz/ml) e centrifugadas. O sedimento foi novamente lavado em PBS e as células marcadas com a solução de CT-B a 1 $\mu\text{g/ml}$ por 10 minutos, a 4 $^{\circ}\text{C}$, findo o qual foram lavadas em PBS e ressuspensas na solução diluída (1:200) de anti-CT-B, a frio. Após um período de incubação de 15 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$ as células foram lavadas em PBS e as amostras montadas entre lâmina e lamela, com meio de montagem e visualizadas por microscopia de fluorescência.

Para a pesquisa da Caveolina procedeu-se à adesão dos espermatozóides (10x 10⁶ spz em PBS) a lamelas revestidas de poli-lisina. As células foram fixadas, por 2 horas, em PBS a 2% de formaldeído e permeabilizadas com uma solução de Triton X-100 (1%) em PBS por 30 minutos. As reações não-específicas foram bloqueadas por incubação, durante 1 hora, em PBS contendo BSA (1%) e glicina (400mM) (solução de bloqueio). A marcação com o anticorpo primário (diluição 1:50 em solução de bloqueio) decorreu durante a noite, a 37 $^{\circ}\text{C}$, sendo depois as amostras lavadas em PBS com 0,1% Triton X-100 e incubadas com o anticorpo secundário (diluição de 1:200) durante 1 hora. Controles negativos foram preparados só com o anticorpo secundário.

6.2.3.2. PROTEÍNAS SNARE

A pesquisa das proteínas envolvidas na hipótese SNARE compreendeu também a adesão dos espermatozóides a lamelas revestidas de poli-lisina e posterior fixação e permeabilização conforme descrito acima. A marcação com os anticorpos primários (diluição 1:50 em solução de bloqueio) decorreu durante a noite sendo depois as amostras lavadas em PBS com 0,1% Triton X-100 e incubadas com os anticorpos secundários apropriados (diluição de 1:200) durante 1 hora, a 37°C. Controlos negativos foram executados omitindo-se o anticorpo primário.

6.2.3.3. UBIQUITINAÇÃO DIFERENCIAL DOS ESPERMATOZÓIDES

A adesão das células a lamelas recobertas com poli-lisina e posterior fixação decorreu conforme descrito acima. As reações não-específicas foram bloqueadas por incubação em solução de bloqueio (PBS contendo 1% BSA e 400mM glicina), durante 1 hora. A marcação com o anticorpo primário (diluição 1:50 em solução de bloqueio, clone KM691, Kamiya Biomedical, USA) decorreu durante a noite findo a qual as amostras foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo secundário (1:200 em solução de bloqueio, IgM apropriada de ratinho) por 60 minutos a 37°C; 10 minutos antes do final da incubação foi adicionado iodeto de propídio. O controlo negativo foi realizado incubando as células somente com o anticorpo secundário.

6.2.4. ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística dos dados foi efectuada com recurso ao software SPSS (versão 14.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Para as situações gráficas recorreu-se ao software Excel (Microsoft).

Os parâmetros em estudo foram sujeitos a anova multivariada (MANOVA) e os seus valores médios (MMQ's) calculados recorrendo-se ao modelo fixo teórico

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

em que as variáveis consideradas dependerão do grupo (α , fértil/in(sub)fértil, como fator fixo), do animal em si mesmo (β , como covariável), adicionado da média geral amostral (μ) e do erro aleatório (ϵ) associado a cada observação ij . Quando detectados efeitos estatisticamente significativos, procedeu-se à ANOVA univariada, seguida do teste *post-hoc* HSD de Tukey. Considerou-se um nível de significância $\alpha=0.05$.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. MICRODOMÍNIOS LIPÍDICOS (“LIPID RAFTS”) E CAVEOLINA 1

O tratamento de algumas amostras de esperma com o Vybrant® Alexa Fluor® 488 Lipid Raft Labeling Kit permitiu avaliar, qualitativamente, a presença de microdomínios lipídicos ricos em colesterol e esfingolípido nas células espermáticas. Os padrões de marcação, visualizadas por microscopia de fluorescência, reportaram-se às regiões da cabeça e da peça intermédia sendo que as marcações na região da cabeça não se cingiram só às porções apical e equatorial do acrossoma aparecendo também marcação na região pós-equatorial.

Ao investigarmos a presença de caveolina-1 nos espermatozóides de 32 amostras de sémen obtidas de 10 garanhões (5 sorraias, 3 PSL, 1 Hanoveriano, 1 AA), verificámos padrões de marcação ao nível do acrossoma da célula padrões esses que iam desde um forte halo na região mais apical do acrossoma, acompanhada de marcação ponteadada na zona pré-equatorial, até marcação forte em toda a região apical e pré-equatorial ou somente na região equatorial (*vide* Figura 6.1.A).

Nos ejaculados dos animais com índices reprodutivos elevados, a percentagem de espermatozóides marcados com o anticorpo anti-caveolina-1 (56,28%) foi significativamente superior ($QM=3806,358$; $P=0,001$) à observada nos dos garanhões com problemas de fertilidade (30,17%). Quando comparadas, nos dois grupos de animais, as regiões do acrossoma marcadas verificamos que nos animais férteis a marcação restrita ao segmento equatorial sobrepõe-se às restantes enquanto nos animais com problemas de fertilidade é a marcação ao nível da região mais apical e pré-

equatorial (que designaremos somente por apical) do acrossoma que predomina (*vide* Figura 6.1.B). Já o fator individual apresentou-se, dentro de cada grupo, possivelmente significativo sobre a proporção de espermatozóides marcados para a caveolina (QM=842,013; $P=0,076$).

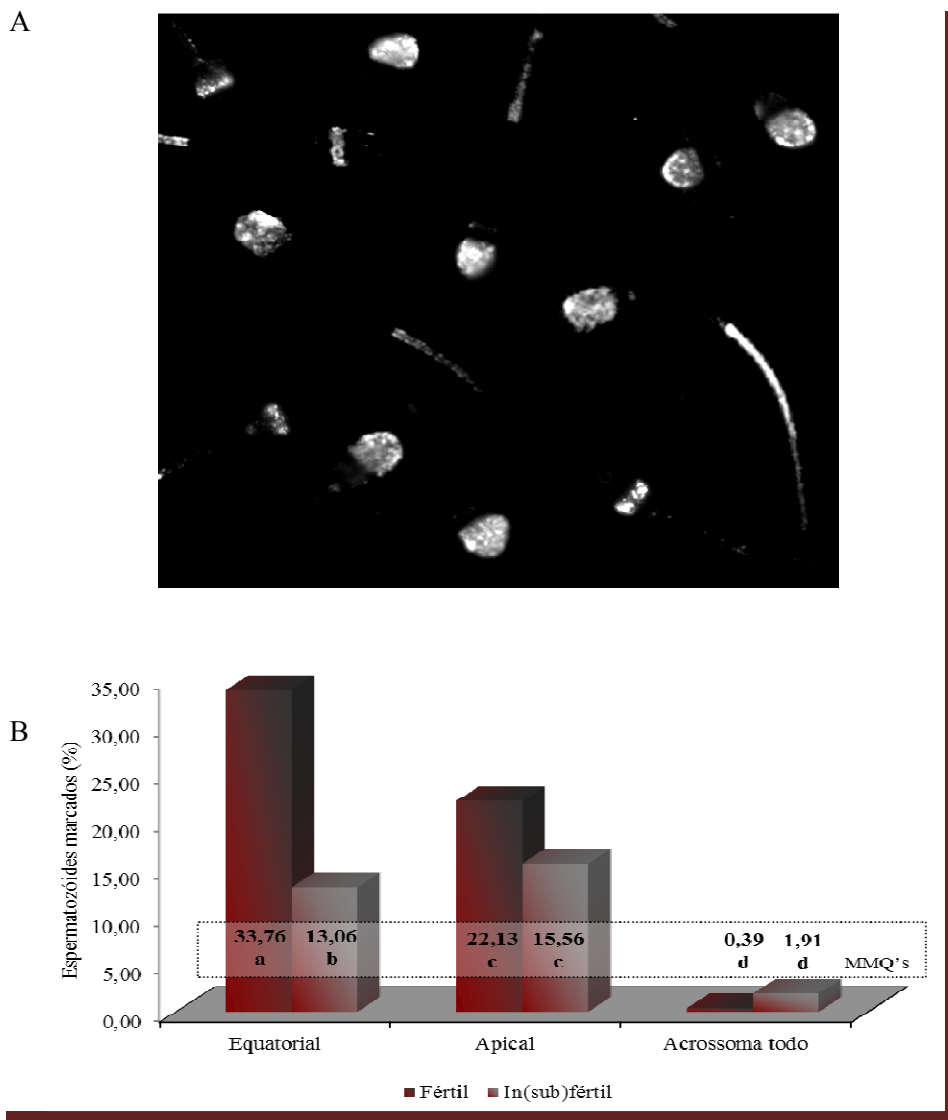


Figura 6.1. Marcação dos espermatozóides com anticorpo anti-caveolina-1

A) Padrões de marcação observados. Ampliação 1000x. B) Percentagem de células marcadas, com anticorpo anti-caveolina-1, no acrossoma dos espermatozóides. As barras representam os valores médios (MMQ's) que se evidenciam no retângulo em destaque; abaixo, em letras minúsculas (a, b, c, d), encontra-se o resultado do teste de diferenças entre as médias dos grupos sendo que médias a que correspondem letras diferentes, diferem entre si ($P<0,05$).

6.3.2. PROTEÍNAS SNARE

A presença de homólogos das proteínas SNARES foi avaliada em 39 ejaculados obtidos de 11 gananhões. A syntaxina, a VAMP/sinaptobrevina, a NSF, o sensor de cálcio sinaptotagmina e a Rab3a foram todas identificadas nos espermatozóides, por imunocitoquímica. Os padrões de marcação predominantes foram os mesmos já descritos para a caveolina. No caso da syntaxina e da NSF, o padrão de marcação preponderante caracterizou-se por um forte halo na periferia da porção apical do acrossoma acompanhado de um ponteadado fluorescente sobre a região acrossômica. Já a sinaptotagmina e a VAMP/sinaptobrevina apresentaram marcação mais homogênea ao longo do acrossoma. Quando os espermatozóides foram marcados com os anticorpos específicos para a Rab3a observou-se também marcação ponteadada ao nível da porção apical do acrossoma e marcação intensa na região pós-equatorial e ao longo de todo o flagelo (*vide* Figura 6.2).

Com o conjunto das observações obtidos constitui-se uma base de dados composta pelos indivíduos para os quais se possuía informação relativa a, pelo menos, dois ejaculados. Assim, 8 gananhões (n=36 amostras de esperma) foram agrupados de acordo com o seu historial de fertilidade em Férteis e In(sub)férteis com o objectivo de se fazer uma comparação entre os grupos relativamente ao percentual de espermatozóides marcados para cada homólogo das SNARES.

Verificou-se que o fator *grupo* influi sobre os valores encontrados excepto para a syntaxina e Rab3a; já o fator individual, dentro de cada grupo, não se apresenta significativo ($P > 0,05$) para o homólogo da sinaptotagmina (*vide* Tabela 6.1). Na generalidade, nos ejaculados dos animais com índices de fertilidade elevados observou-se uma percentagem de células espermáticas marcadas com os anticorpos das proteínas SNARE-relacionadas superior à registada nos ejaculados dos machos com problemas de fertilidade. Nos dois grupos de animais, os ejaculados caracterizaram-se também por apresentarem uma percentagem de espermatozóides marcados com o anti-corpo anti-sinaptotagmina superior à das restantes proteínas analisadas (*vide* Figura 6.3). Diferenças significativas entre as médias (MMQ's) foram observadas para a

sinaptotagmina, VAMP/sinaptobrevina e NSF. Esta ATPase, surge numa percentagem de células muito baixa nos animais com problemas de fertilidade (Figura 6.3).

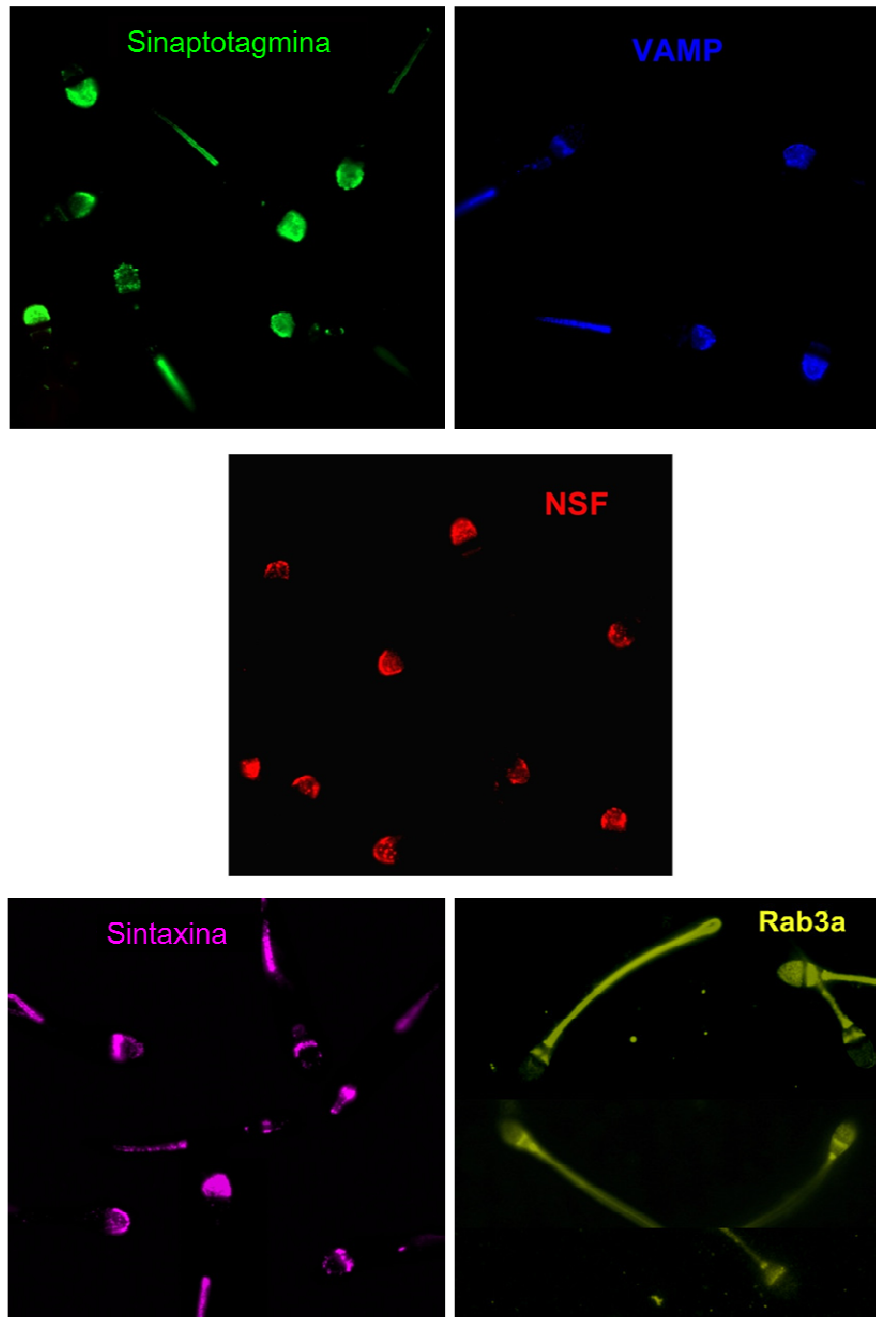


Figura 6.2. Proteínas relacionadas com hipótese SNARE de fusão de membranas nos espermatozoides equinos.

Sinaptotagmina, VAMP/sinaptobrevina, NSF e Sintaxina foram detectadas na região acrossómica. A Rab3a apresentou marcação preferencial na região pós-equatorial e peça intermédia. Ampliação 1000x.

Tabela 6.1. ANOVA das proteínas relacionadas com a hipótese SNARE em função do grupo de fertilidade e do indivíduo

Fonte	Variável dependente									
	Sinaptotagmina		VAMP/ Sinaptobrevina		Syntaxina		NSF		Rab3A	
	gl	QM	gl	QM	gl	QM	gl	QM	gl	QM
Grupo	3382,452***		3757,160**		1074,030		10448,221***		1220,513	
Animal	24,987		5737,149**		2826,717*		1983,148**		1865,962*	
Erro	33	161,321	33	632,281	33	559,137	25	174,544	13	282,827
Total	36		36		36		28		16	

Notas:***($P<0,001$)- altamente significativo; **($P<0,01$)- bastante significativo; *($P<0,05$)- significativo.

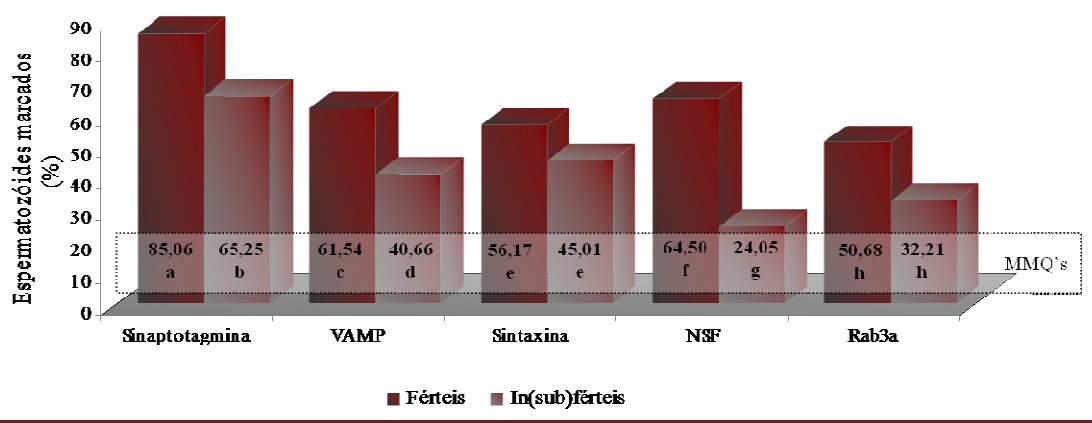


Figura 6.3. Percentagem de espermatozoides marcados para as proteínas SNARE-relacionadas de acordo com os grupos de fertilidade.

As barras representam os valores médios que se evidenciam no retângulo em destaque; abaixo, em letras minúsculas (a-h), encontra-se o resultado do teste de diferenças entre as médias dos grupos sendo que médias a que correspondem letras diferentes, diferem entre si ($P<0,05$).

Para a generalidade das proteínas analisadas, as proporções de espermatozoides com marcações na região apical do acrossoma apresentaram-se significativamente ($P<0,05$) superiores às do acrossoma todo e às da região equatorial contudo, nos animais com problemas de fertilidade, as marcações ao nível da região equatorial surgem numa percentagem de células inferior à dos animais férteis ($P<0,1$ para sinaptotagmina e VAMP; $P<0,01$ para NSF) (vide Figura 6.4).

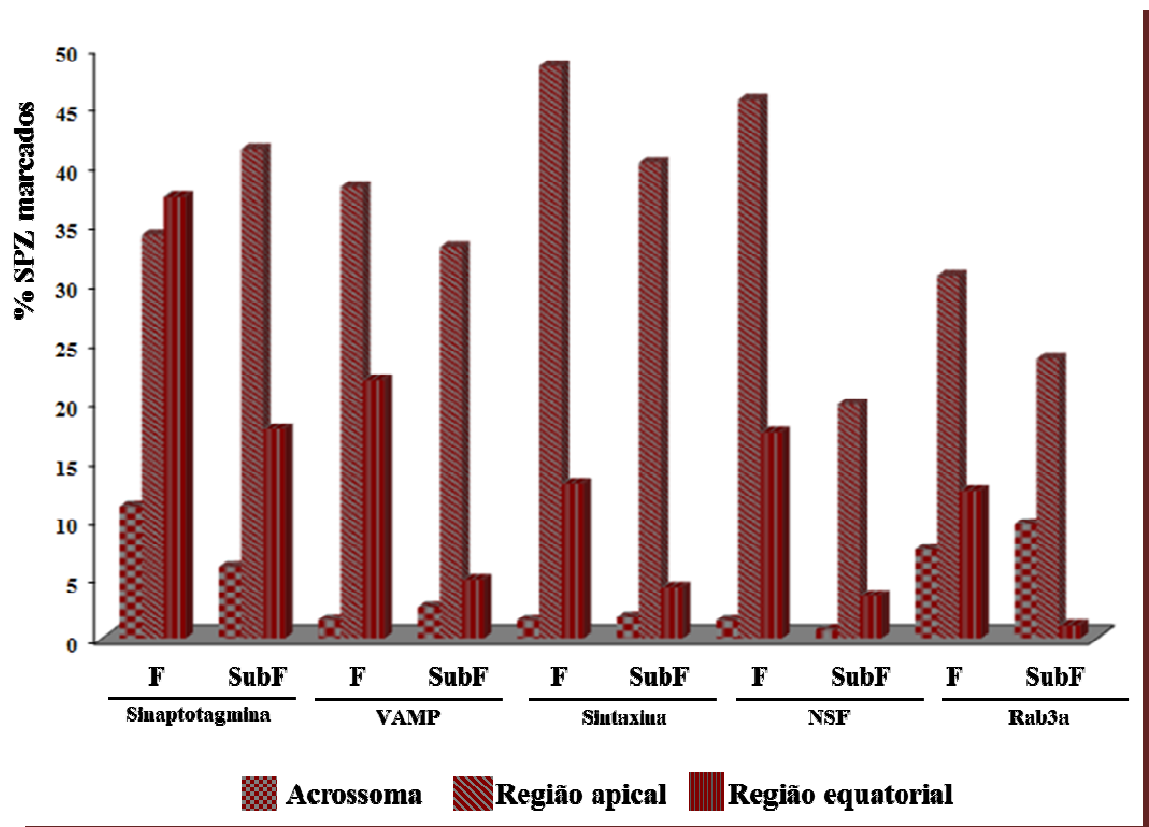


Figura 6.4. Percentagem de espermatozoides marcados para as proteínas SNARE-relacionadas de acordo com as regiões do acrossoma nos diferentes grupos de fertilidade (F- férteis e SubF- in(sub)férteis).

As barras representam os valores médios.

Para um melhor entendimento da relação entre estes marcadores celulares e a fertilidade dos machos consideraram-se os dados relativos a 4 dos 8 animais avaliados. Estes animais foram seleccionados por ter sido possível avaliar ejaculados utilizados na inseminação artificial (IA) de algumas éguas, o que nos permitiu ajuizar do poder fecundante dos respectivos espermatozoides e por reunirem um maior número de observações relativas aos homólogos da sinaptotagmina, VAMP/sinaptobrevina, syntaxina e NSF. Para efeitos de escrita atribuíram-se a estes animais as designações de A a D sendo que: A - Anglo-Árabe, 16 anos de idade; B - PSL, 20 anos de idade; C - Sorraia, 4 anos; D - Hanoveriano, 19 anos, com historial de fertilidade mas apresentando problemas em emprenhar as éguas no ano de utilização anterior ao deste estudo.

Da utilização dos garanhões A e B resultaram índices reprodutivos elevados e contrastantes com os obtidos para os garanhões C e D (Tabela 6.2).

Tabela 6.2. Índices de fertilidade obtidos nos quatro garanhões

Garanhão	Éguas	FC (%)	FER (%)	Total de ciclos explorados	Ciclos explorados/Égua	Ciclos explorados/Gestação	Observações
A	20	79	95	24	1,20	1,26	Fértil
B	6	100	100	6	1,00	1,00	Fértil
C	4	40	50	5	1,25	2,50	Sub-fértil
D	7	0.0	0.0	14	2,00	---	Infértil

Nota: FC-Fertilidade por ciclo; FER-Fertilidade no final da época de reprodução

O animal C, exemplar da raça Sorraia, apresentou parâmetros espermáticos da mesma ordem de grandeza aos encontrados no estudo do capítulo 4, e que diferem significativamente dos relativos aos outros animais, incluindo o animal D (*vide* Tabela 6.3). Neste último foi constatado um problema de fertilidade no ano anterior ao deste estudo, problema esse que foi por nós confirmado uma vez que as éguas inseminadas (n=7) com esperma deste animal ficaram todas vazias vindo depois a emprenhar por inseminação com esperma do garanhão A.

Tabela 6.3. Parâmetros espermáticos (MMQ's) observados nos quatro garanhões

Garanhão	NTE (x10 ⁹)	Vitalidade (%)	PMS (%)	Morfologia anormal (%)	Volume (ml)	pH
A	8,06 ^a	73,19 ^a	51,14 ^a	16,09 ^a	46,18 ^a	7,15 ^{ab}
B	7,8 ^a	74,83 ^a	45,18 ^b	11,33 ^b	47,25 ^a	7,00 ^b
C	4,6 ^b	31,53 ^b	30,00 ^c	55,82 ^c	14,77 ^b	7,00 ^b
D	4,7 ^b	52,36 ^c	40,38 ^b	27,55 ^d	29,72 ^c	7,30 ^a

Dentro de cada coluna, as letras em subscripto (a-d) representam o resultado do teste de diferença entre as médias, sendo que médias a que correspondam letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$)

Calculados que foram os valores médios da percentagem de células marcadas com os anti-corpos para as proteínas SNARE-relacionadas, neste conjunto de 4 animais, verificámos que o animal D apresentava uma percentagem de espermatozóides marcados para a NSF significativamente inferior à registada para as outras proteínas (*vide* Figura 6.5). De fato, a observação da representação escalar dos valores médios

mostra que a percentagem de células marcadas para VAMP e syntaxina, nos animais A, B e C (respectivamente 74,47% e 72,68%, 34,80% e 43,62%, 19,17% e 25,95%, para VAMP e Syntaxina em cada um dos animais A, B e C) apresentam-se dentro da mesma ordem de grandeza da NSF (66,46%, 48,60%, 32,00%, respectivamente para os animais A, B e C) contrariamente ao que se observa no animal D. Neste, os ejaculados exibiram uma percentagem elevada de espermatozóides marcados para os homólogos do complexo de fusão (60,59% e 68,75% de células marcadas para VAMP e syntaxina, respectivamente) e contrastante com o valor de 19,33% de espermatozóides marcados para NSF. Resultados similares foram também observados num outro garanhão de raça Sorraia (17,10%) cujos ejaculados, utilizados na beneficiação de 2 éguas (2,5 ciclos explorados/égua), não produziram nenhuma prenhez. Relativamente ao sensor de cálcio sinaptotagmina, os valores médios obtidos foram de 85,43%, 82,83%, 56,20% e 71,50% respectivamente para os animais A, B, C e D.

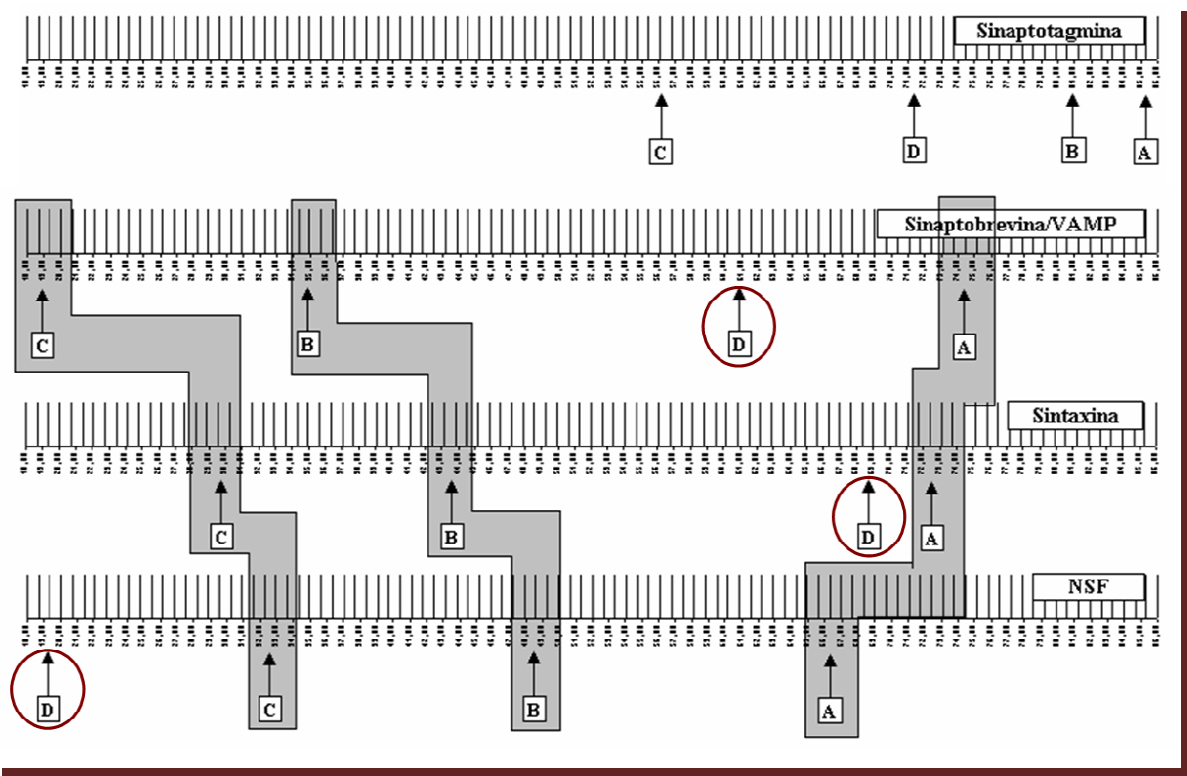


Figura 6.5. Representação escalar, com a alocação do valor das médias por cada garanhão, da percentagem de espermatozóides marcados com os anti-corpos anti-Sinaptotagmina, anti-Sinaptobrevina/VAMP, anti-Syntaxina e anti-NSF nos 4 garanhões considerados (A, B, C e D).

6.3.3. INTEGRIDADE DO ACROSSOMA

A integridade do acrossoma foi avaliada em 44 ejaculados dos animais A a D. Os ejaculados dos animais férteis apresentaram 90,04% de espermatozóides com acrossoma íntegro (marcação simultânea na região apical e equatorial ou marcação somente na região apical), valor este significativamente superior ($P<0,001$) ao registrado para os animais com problemas de fertilidade (63,13%) (Figura 6.6). Neste grupo de animais, tanto a percentagem de espermatozóides com acrossoma reagido (8,12%, marcação somente na região equatorial;) como a proporção de células sem acrossoma (28,75%, ausência de marcação) é significativamente superior à observada no grupo fértil (2,31% e 8,29%).

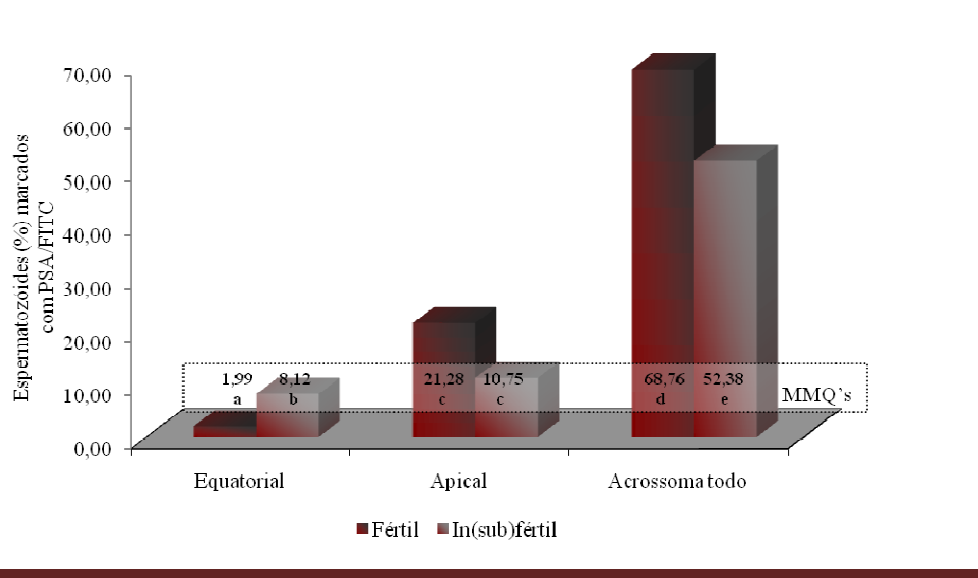


Figura 6.6. Padrões de marcação do acrossoma (PSA/FITC) observados nos espermatozóides dos ejaculados analisados.

As barras representam os valores médios (MMQ's) que se evidenciam no retângulo em destaque e abaixo, em letras minúsculas (a-e) encontra-se o resultado do teste de diferenças entre as médias sendo que médias a que correspondem letras diferentes diferem entre si ($P<0,001$).

Da análise aplicada resultou uma clara influência do grupo sobre a integridade do acrossoma (Tabela 6.4), tendo-se observado diferenças significativas ($P<0,05$) para os valores médios (MMQ's) entre os ganhões A (92,15) e C (58,67%), A e D (62,00%),

assim como entre os animais B (87,47%) e C e B e D. Estes resultados mostraram a pior qualidade dos acrossomas nos animais com problemas de fertilidade.

Tabela 6.4. ANOVA da marcação das várias regiões do acrossoma em função do grupo de fertilidade e do indivíduo

Fonte	Variável dependente							
	Sem Acrossoma		Equatorial		Apical		Acrossoma todo	
	gl	QM	gl	QM	gl	QM	gl	QM
Grupo	4249,247***		371,461***		1095,318+		2650,206**	
Animal	22,722		41,788		203,292		158,865	
Erro	43	138,749	43	19,561	43	272,952	43	422,964
Total	46		46		46		46	

Notas:***($P<0,001$)—altamente significativo;**($P<0,01$)—bastante significativo; +($P<0,1$)— possivelmente significativo

6.3.4. UBIQUITINAÇÃO DIFERENCIAL DOS ESPERMATOZÓIDES

Neste estudo, 29 ejaculados obtidos dos garanhões A a D foram utilizados para avaliar até que ponto a ubiquitinação à superfície celular pode ser relacionada com a qualidade morfológica das células espermáticas e com a fertilidade dos animais (Figura 6.7).

No conjunto dos ejaculados dos garanhões A e B registou-se uma média (MMQ's) de 11,70% de espermatozóides marcados com o anti-corpo anti-ubiquitina, valor este significativamente ($P<0,001$) inferior ao observado para os garanhões C e D (34,49%). Nestes, a percentagem de espermatozóides marcados com o anticorpo anti-ubiquitina na região da peça intermédia (PI) e da peça principal (PP) apresentou-se significativamente superior (PI, $P<0,01$; PP, $P<0,001$) à dos animais A e B não se tendo registado qualquer diferença entre os grupos para a região acrossómica (*vide* Tabela 6.5). Já a análise da morfologia espermática com a tinta-da-china não evidenciou diferenças entre os grupos para as anomalias na região da PI mas foi colocada em evidência uma diferença entre grupos para as anomalias morfológicas na região da cabeça e da PP (*vide* Tabela 6.5). Esta diferença resulta dos valores registados no animal C, exemplar da raça Sorraia (*vide* Figura 6.8).

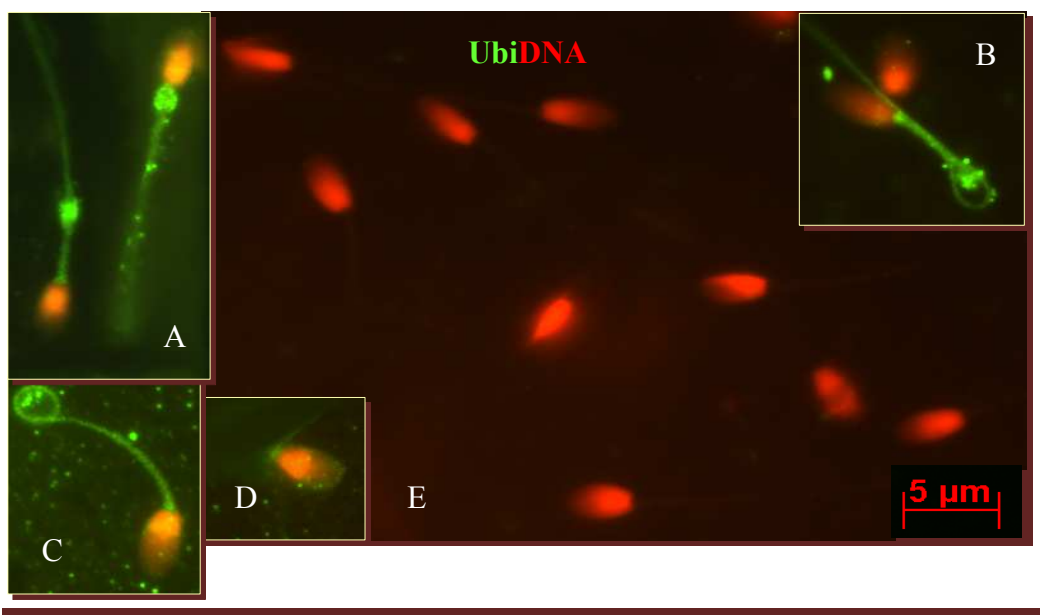


Figura 6.7. Ubiquitinação superficial (fluorescência verde) dos espermatozoides ejaculados.

(A) gotas citoplasmáticas, distal e proximal (B) peça principal em nó simples e (C) peça principal enrolada na extremidade (D) acrossoma marcado. (E) No controlo negativo omitiu-se o anticorpo primário e não se observou qualquer padrão de marcação; o DNA marcado com o IP fluoresce vermelho.

Tabela 6.5. Valores médios (MMQ's) da ubiquitinação diferencial dos espermatozoides e das alterações morfológicas observadas com recurso ao método da tinta-da-china

Grupos	Ubiquitina							Coloração negativa			
	Colo	PI	PP	Acrossoma			Total	Cabeça	PI	PP	Total
				Equatorial	Apical	Todo					
Fértil	1,90 ^a	2,92 ^a	3,19 ^a	1,33 ^a	1,44 ^a	0,93 ^a	11,71 ^a	4,68 ^a	7,91 ^a	2,63 ^a	15,22 ^a
In(sub)fértil	0,88 ^a	7,53 ^b	20,06 ^b	0,15 ^a	5,61 ^a	0,27 ^a	34,49 ^b	21,99 ^b	8,30 ^a	14,47 ^b	44,75 ^b

Dentro de cada coluna, as letras em subscripto (a,b) representam o resultado do teste de diferença entre as médias dos grupos, sendo que médias a que correspondam letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$)

Da análise efectuada ficou patente a influência do fator *grupo*, tanto na variação da ubiquitinação diferencial dos espermatozoides ao nível da PI e da PP (Tabela 6.6) como na totalidade de espermatozoides marcados (QM=3332,606, $P=0,001$),

contrariamente ao fator *individuo* (QM=62,543, $P=0,422$). Relativamente à região acrosssômica, nenhum dos fatores em análise exerce influência na variação encontrada (Tabela 6.6).

Tabela 6.6. ANOVA da ubiquitinação das várias regiões do espermatozóide em função do *grupo de fertilidade* e do *individuo*

Fonte	Variável dependente											
	Colo		PI		PP		Acrossoma					
	gl	QM	gl	QM	gl	QM	Equatorial		Apical		Todo	
	gl	QM	gl	QM	gl	QM	gl	QM	gl	QM	gl	QM
Grupo		6,655		136,382**		1826,195***		9,066		111,729		2,766
Animal		22,929*		2,472		0,993		0,898		0,367		4,851
Erro	26	5,174	26	14,747	26	72,302		8,309		45,719	26	2,722
Total	29		29		29		29		29		29	

Notas: *** ($P<0,001$) – altamente significativo; ** ($P<0,01$) – bastante significativo;

Relativamente às alterações à morfologia espermática, avaliada com a tinta-da-china, da análise resultou que o fator *grupo* influenciou a proporção de espermatozóides mal formados (tabela 6.7).

Tabela 6.7. ANOVA da morfologia espermática anormal, avaliada pelo método da tinta-da-china, em função do *grupo de fertilidade* e do *individuo*

Fonte	Variável dependente							
	Cabeça		PI		PP		Total	
	gl	QM	gl	QM	gl	QM	gl	QM
Grupo		1922,580**		0,937		899,837***		5596,919***
Animal		19,433		30,022		6,661		53,385
Erro	26	91,335	26	35,085	26	12,270	26	162,042
Total	29		29		29		29	

Notas: *** ($P<0,001$) – altamente significativo

Interessante verificar que o animal D apresentou um nível de ubiquitinação na região apical do acrosssoma significativamente superior ao dos restantes animais. Nos garanhões C e D, os níveis de ubiquitinação nas regiões da PI e da PP também se apresentaram elevados, destacando-se os do animal C (*vide* Figura 6.8).

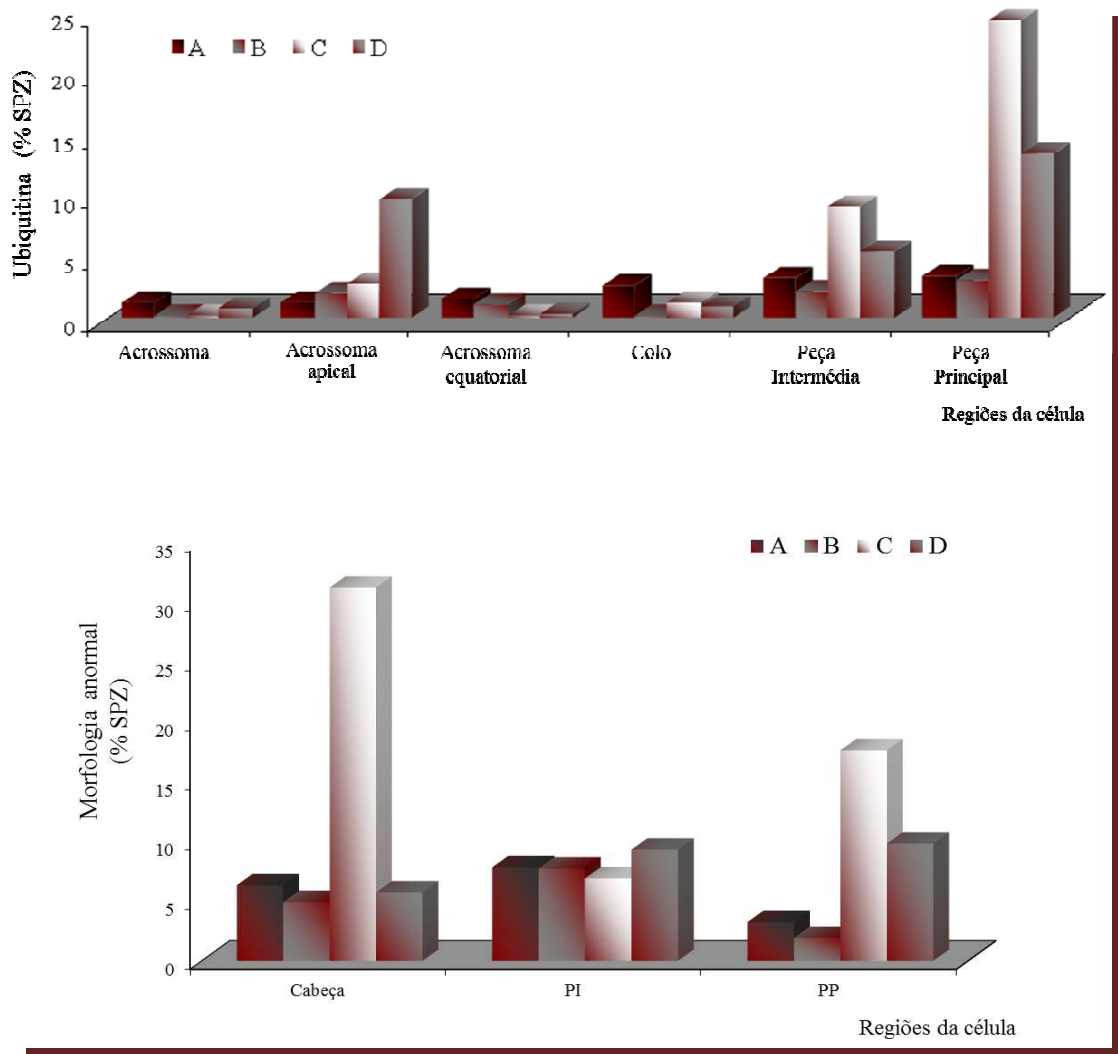


Figura 6.8. Ubiquitinação diferencial dos espermatozóides (A) e morfologia espermática avaliada pelo método da tinta-da-china (B) nos quatro garanhões avaliados (A, B, C e D). As barras representam os valores médios

Para a comparação das metodologias recorreu-se a análise de variância fatorial considerando-se o efeito fixo do fator *método de avaliação* (método da tinta-da-china e ubiquitinação) e o efeito do *grupo de fertilidade* e do *indivíduo* como covariáveis. Recorreu-se ao modelo matemático

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta + C + \varepsilon_{ij}$$

em que o valor da variável dependente Y dependerá do método de avaliação (α_i), da fertilidade (β) e do indivíduo (C), adicionado da média geral observada (μ) e do erro aleatório (ϵ) associado a cada observação ij .

Com base no modelo analítico aplicado, determinaram-se as MMQ's para a totalidade de anomalias espermáticas registadas em cada um dos métodos de avaliação. Os valores obtidos para a ubiquitinação diferencial (19,56%) não parecem diferir ($P=0,054$) dos da morfologia determinada pelo método da tinta-da-china (25,40%). No entanto, uma observação atenta da figura 6.8 permite concluir que o método da ubiquitina põe em evidência espermatozóides com alterações não observáveis morfologicamente pelo método da tinta-da-china, nomeadamente nos animais que apresentaram problemas de fertilidade como nos casos do animal D - no que concerne à ubiquitinação da porção apical do acrossoma e da PP - e do animal C, relativamente à marcação com a ubiquitina ao nível da PI e da PP.

6.3.5. RELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS

A intensidade e a direcção da associação entre as variáveis foram avaliadas com recurso ao coeficiente de correlação de Pearson. Os resultados mais expressivos obtidos encontram-se nas tabelas 6.8, 6.9, 6.10 e 6.11.

Tabela 6.8. Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre a caveolina-1 e os homólogos das proteínas SNARE

	Sinaptotagmina	VAMP	NSF	Sintaxina
Caveolina-1 - total de spz marcados	0,666 ^{***}	0,708 ^{***}	0,568 ^{**}	0,687 ^{***}
Marcação na região equatorial	0,518 ^{**}	0,626 ^{**}	0,681 ^{***}	0,607 ^{**}
Sinaptotagmina		0,461 ^{**}	0,569 ^{**}	0,481 ^{**}
VAMP			NS	0,797 ^{***}
NSF				0,423 [*]

Notas:***($P<0,001$)—altamente significativo;**($P<0,01$)—bastante significativo;*($P<0,05$)—significativo.

A marcação com a caveolina correlacionou-se significativamente com as proteínas SNARE relacionadas assim como as SNARE apresentaram correlações entre si, com exceção da VAMP com a NSF. O coeficiente de correlação (r) mais elevado observou-se entre a syntaxina e a VAMP (Tabela 6.8). Estes resultados afiguram-se coerentes dado o modelo molecular proposto para a exocitose vesicular (CHEN e SCHELLER, 2001).

Apesar de, na generalidade dos animais analisados, a caveolina-1 marcar preferencialmente na região equatorial do acrossoma e de os homólogos das SNARES marcarem, preferencialmente na região apical, a marcação com o PSA/FITC ao longo de todo o acrossoma apresentou correlação positiva significativa com a caveolina e a sinaptotagmina mas não se correlacionou significativamente com a syntaxina. Já para a NSF, correlações significativas, positiva ($P < 0,05$) e negativa ($P < 0,01$), foram observadas com a marcação do PSA/FITC, respectivamente, na região apical e na região equatorial do acrossoma (Tabela 6.9).

Tabela 6.9. Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os diferentes padrões de marcação dos acrossomas (PSA/FITC) e a percentagem de espermatozóides marcados para os homólogos das proteínas SNARE

	Caveolina-1	Sinaptotagmina	VAMP	NSF	
PSA/FITC	Total de marcados	0,502**	0,639***	0,329 ⁺	0,481**
	AI; Marcação em todo o acrossoma	0,426*	0,448*	NS	NS
	AI; Marcação na região apical	NS	NS	NS	0,439*
	AR; Marcação na região equatorial	NS	NS	NS	-0,539**

Notas: AI-acrossoma íntegro; AR- acrossoma reagido;

***($P < 0,001$)-altamente significativo; **($P < 0,01$)-bastante significativo; *($P < 0,05$)-significativo; + ($P < 0,1$)-possivelmente significativo.

Já a ubiquitinação das células ao nível do acrossoma só apresentou relação com a VAMP. Considerando a integridade acrossómica, a marcação com a ubiquitina na região apical do acrossoma correlacionou-se directamente com a percentagem de células com acrossoma reagido e negativamente com a percentagem de células com acrossoma íntegro (Tabela 6.10).

Tabela 6.10. Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre a ubiquitina e os homólogos das proteínas SNARE e a marcação do acrossoma (PSA/FITC)

		VAMP	PSA/FITC	
			Equatorial (AR)	Todo (AI)
Ubiquitina	Marcação em todo o acrossoma	0,432*	NS	NS
	Marcação na região apical	NS	0,471**	-0,411*

Notas: AI-acrossoma íntegro; AR- acrossoma reagido;

***($P < 0,001$)-altamente significativo; **($P < 0,01$)-bastante significativo; *($P < 0,05$)-significativo

Espermatozóides marcados com a ubiquitina, independentemente da região da célula, apresentaram ainda correlação com os parâmetros espermáticos clássicos (Tabela 6.11).

Tabela 6.11. Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre a ubiquitina e os parâmetros seminais

	Volume	Concentração	PMS AC	Vitalidade	Alterações Morfológicas		
					Cabeça	PP	PP
Ubiquitina	-0,514**	0,409*	-0,636***	-0,516**	0,530**	0,807***	0,672***

Notas:***($P < 0,001$)-altamente significativo; **($P < 0,01$)-bastante significativo; *($P < 0,05$)- significativo.

Os resultados mostraram que as variáveis consideradas não eram tendencialmente ortogonais. Assim, precedendo a análise de regressão linear múltipla para modelação das relações funcionais entre o índice de fertilidade dos machos e as características analisadas nos ejaculados, procedeu-se ao diagnóstico de colinearidade (*VIF*, *Variance Inflation Factor*).

Quando considerados os parâmetros seminais, a ubiquitina e o PSA/FITC, eliminaram-se as variáveis volume (Vol), NTE e mobilidade (Mob) por se apresentarem fortemente colineares com as restantes variáveis presentes no modelo ($VIF_{Vol}=11,872$; $VIF_{NTE}= 10,276$; $VIF_{Mob}=12,665$). A regressão com selecção de variáveis *stepwise* foi utilizada para obter um modelo parcimonioso que permitisse prever a fertilidade dos machos em função das variáveis independentes vitalidade, anomalias espermáticas (TC e Ubiquitina), pH e PSA/FITC. A regressão linear múltipla permitiu identificar somente as

variáveis vitalidade (Vit, $\beta=0,443$; $t_{(28)}=2,639$; $P<0,05$) e integridade do acrossoma (PSA/FITC, $\beta=0,385$; $t_{(28)}=2,294$; $P<0,05$) como preditores significativos ($F_{(2,28)}=19,172$; $P<0,001$; $R^2_{aj}=0,548$) da fertilidade. Considerando estas duas variáveis e introduzindo a caveolina e as homólogas das SNARES no modelo, a análise de regressão linear múltipla com selecção de variáveis *stepwise*, por um lado e *backward* por outro, identificou as variáveis vitalidade, caveolina, NSF e syntaxina como responsáveis pela proporção da variabilidade (82%) observada nos índices de fertilidade. A variável caveolina é apenas marginalmente significativa ($P=0,068$), mas face às limitações da amostragem e à reduzida dimensão da amostra ($n=32$), optou-se por incluir esta variável no modelo. O modelo final ajustado resultante

$$FFER = 8,550 + 0,765Vit + 0,388Caveolina + 1,035NSF - 0,952Syntaxina$$

é altamente significativo ($F_{(4,28)}=38,581$; $P<0,001$; $R^2_{aj}=0,824$).

6.4. DISCUSSÃO

Nos mamíferos a fertilização de um oócito pelo espermatozóide é precedida por uma série de eventos altamente regulados, que têm lugar em diferentes regiões da célula, destacando-se a capacitação, a ligação do espermatozóide à zona pelúcida do oócito, a reacção acrossómica e a ligação ao oolema. Tanto a reacção acrossómica como a interacção do espermatozóide com o oolema se caracterizam pela fusão de membranas. Na reacção acrossómica, a membrana plasmática (MP) funde com a membrana acrossómica externa (MAE), ao nível da região apical, libertando o conteúdo do acrossoma, mantendo-se intatas estas membranas ao nível da região equatorial. É através desta região que o espermatozóide estabelece ligação com a membrana plasmática do oócito. Dos modelos propostos para explicar a fusão de membranas durante a reacção acrossómica e a interacção do espermatozóide com o oolema, o da hipótese SNARE é apoiada por vários estudos que têm identificado estas proteínas nos espermatozóides de várias espécies de mamíferos, e mesmo demonstrado que as SNARES podem modular a secreção do acrossoma (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2000; KATAFUCHI *et al.*, 2000; YUNES *et al.*, 2000; MICHAUT *et al.*, 2000; TOMES *et al.*, 2002; RAMALHO-SANTOS, SCHATTEN e MORENO,

2002). Adicionalmente, membros da família das sinaptotagminas, sensores de cálcio ativos na exocitose regulada, foram também descritos nos espermatozóides de mamíferos (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2000; MICHAUT *et al.*, 2001; HUTT *et al.*, 2002).

Neste estudo, alargámos a um maior número de animais uma investigação prévia efectuada sobre ejaculados de quatro garanhões (GAMBOA e RAMALHO-SANTOS, 2005) de fertilidade variada (desde o infértil ao fértil, passando pelo sub-fértil) e onde confirmámos a presença, nos espermatozóides da espécie equina, de proteínas relacionadas com a hipótese SNARE de fusão de membranas assim como da caveolina-1. Contudo, sabendo que as sondas utilizadas reagem com vários membros das famílias destas proteínas (RAMALHO-SANTOS, SCHATTEN e MORENO, 2002), não podemos estar certos relativamente a que isoformas de syntaxina, VAMP, NSF ou sinaptotagmina estarão presentes neste modelo animal.

Tanto as SNARES como a caveolina-1 foram identificadas na região da cabeça do espermatozóide, co-localizadas no acrossoma, com padrões de marcação similares aos descritos por outros autores, em outras espécies de mamíferos (van GESTEL *et al.*, 2005; TSAI *et al.*, 2007). Também foram reconhecidos “lipid rafts” na cabeça e na peça intermédia, por marcação com a toxina β da cólera (CT β), a qual liga a gangliósido GM1, um marcador de “rafts” (BROWN e LONDON, 1998). A identificação de “lipid rafts” em regiões distintas do espermatozóide é importante na medida em que estes microdomínios, ricos em colesterol e glicoesfingolípidos e resistentes à extração por ação de detergentes, constituem locais de compartimentalização de proteínas envolvidas em vias de sinalização celular ou locais para onde essas proteínas são recrutadas após ligação a ligandos (SIMONS e TOOMRE, 2000). De fato, a célula espermática é altamente regionalizada (FRIEND, 1982), quer estrutural quer funcionalmente, sendo que as vias de sinalização e metabólicas envolvidas no reconhecimento da zona pelúcida do oócito e da iniciação da reação do acrossoma deverão estar organizadas nas membranas acrossómica e plasmática enquanto as envolvidas na hiperativação deverão dispor-se no flagelo (TRAVIS e KOPE, 2002). TRAVIS *et al.* (2001), reconheceram a presença de “lipid rafts” enriquecidos em caveolina-1 nos espermatozóides de camundongo (*Mus musculus*) e porquinho da guiné (*Cavia porcellus*). Gadella e colaboradores (*vide* GADELLA *et al.*, 2008, para revisão) identificaram microdomínios equivalentes a “lipid

rafts” na porção mais apical do acrossoma correspondente à região que liga à zona pelúcida. A presença de “lipid rafts” na região pós-acrossômica e na peça intermédia vai de encontro a diversos estudos que evidenciam uma função biológica destes microdomínios lipídicos na reprodução de várias espécies de mamíferos (TRAVIS *et al.*, 2001; TRAVIS e KOPF, 2002). Os microdomínios lipídicos ordenados (SIMONS e IKONEN, 1997) parecem jogar aqui um papel importante ao manterem a heterogeneidade lateral da membrana na região da cabeça do espermatozóide, nomeadamente na sua porção apical, até que os eventos que levam à fertilização tenham lugar. De fato, durante a capacitação ocorre uma reorganização da distribuição dos lípidos e das proteínas que possibilitam a ligação do espermatozóide à zona pelúcida do oócito e, conseqüentemente, a reação do acrossoma, que se restringe à sua porção apical (*vide* GADELLA *et al.*, 2008, para revisão). SELVARAJ *et al.* (2009) demonstraram que o gangliósido GM1 apresenta redistribuição na cabeça de espermatozoides humanos após a morte das células e que essa redistribuição ocorre ainda independentemente da perda do acrossoma, sugerindo a ocorrência de uma transferência de lípidos entre a membrana acrossômica externa (MAE) e a MP.

A capacitação, evento essencial que precede a reação acrossômica, envolve a remoção de colesterol do plasmalema, fenómeno que se encontra ligado a mecanismos de transdução de sinal (FLESCHE e GADELLA, 2000). A perda de colesterol implica alterações à ordem e fluidez dos fosfolípidos da membrana (VIST e DAVIS, 1990) e modula a ocorrência e a estrutura de domínios lipídicos (LEWIS e MCELHANEY, 1992; WILLIAMS, 1998), afectando também a sua integridade (KELLER e SIMONS, 1998). A caveolina tem sido descrita como um marcador de “lipid rafts”. Neste trabalho detectou-se a caveolina-1 nas mesmas regiões da célula onde localizámos as proteínas SNARE, ou seja, nas regiões apical e equatorial do acrossoma, regiões estas ricas em colesterol (FRIEND, 1982), e com padrões de marcação semelhantes aos descritos por van GESTEL *et al.* (2005), em espermatozoides porcinos. Contudo, não foi observada marcação para a caveolina na peça intermédia conforme referido por TRAVIS *et al.* (2001). Algumas células marcaram na peça principal (assim como no caso dos homólogos das SNARES) mas esta marcação é inespecífica. Tomadas em conjunto, as observações obtidas neste estudo para os “lipid rafts” e caveolina sugerem a existência de dois tipos de microdomínios lipídicos na MP do espermatozóide, uns similares aos caveoleos, logo ricos em caveolina-1, e importantes para a reação acrossômica, e outros, desprovidos de

caveolina e com possível envolvimento na hiperativação e capacitação. Adicionalmente, a percentagem de células marcadas para caveolina apresentou distinção entre animais férteis e in(sub)-férteis. Alguns autores sugerem que a localização e/ou organização de vias de sinalização específicas nos espermatozóides podem ser mediadas pelos microdomínios lipídicos ricos em caveolina (TRAVIS *et al.*, 2001) e é possível que a fraca incidência de caveolina nos espermatozóides dos garanhões com problemas de fertilidade possa comprometer a fertilidade dos animais ao afectar essas vias de sinalização.

A reacção do acrossoma é um evento de secreção regulado dependente de cálcio (Ca^{2+}), em que a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossómica interna implica, num primeiro passo, a aproximação dessas membranas seguida da ativação da sinaptotagmina mediada pelo Ca^{2+} e da formação dos complexos *trans*-SNARE. A justaposição da MP e da MAE parece depender da atividade da Rab3a (MICHAUT *et al.*, 2000; BELMONTE *et al.*, 2005) que se julga estar também envolvida na ativação da sinaptotagmina mediada por Ca^{2+} (YUNES *et al.*, 2000; MAYORGA, TOMES e BELMONTE, 2007; LOPEZ *et al.*, 2007) assim como na dissociação dos complexos *cis*-SNARE, em ambas as membranas, mediada pela NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) e pela α -SNAP (*soluble NSF attachment protein*) (TOMES *et al.*, 2005).

Os dois grupos de animais considerados (férteis e in(sub)férteis) apresentaram variabilidade quanto à percentagem de espermatozóides marcados para os homólogos da sinaptotagmina, da VAMP e da NSF, contrariamente à syntaxina que só pareceu depender do *indivíduo*. Na generalidade, a percentagem de espermatozóides que apresentaram marcação em todo o acrossoma foi significativamente inferior à percentagem de células com marcação nas regiões apical e equatorial. Isto afigura-se coerente com a compartimentalização regionalizada de componentes proteicos e lipídicos (HOLT, 1984) em macrodomínios na região da cabeça que se mantém estáveis (organizados) até à capacitação. Relativamente à syntaxina e à VAMP, TSAI *et al.* (2007) não verificaram a sua presença na região equatorial do acrossoma, contrariamente aos nossos resultados. Esses autores observaram que tanto a syntaxina (presente na MP) como a VAMP 1 (presente na MAE) se redistribuem pela região mais apical do acrossoma após indução da capacitação *in vitro*, sendo recuperadas na fração lipídica resistente à extração por detergentes, característica dos “lipid rafts”.

No contexto do modelo atual da hipótese SNARE de fusão de membranas, múltiplas cópias de R- e Q-SNARES são necessárias para desencadear a fusão estando, à Rab3a, reservado o papel de aproximar as duas membranas (WEBER *et al.*, 1998; JAHN e GRUBMULLER, 2002). Estudos nas sinapses neuronais e em vacúolos isolados sugerem que a NSF e a α -SNAP permitem o ancoramento por dissociação do complexo estável previamente formado entre Q- e R-SNARES (UNGERMANN *et al.*, 1998). A dissociação do complexo *cis*-SNARE pela NSF disponibiliza SNARES monoméricas livres para formarem novos complexos *trans* em novos eventos de fusão (De BLAS *et al.*, 2005). Neste estudo, também se identificou a NSF nos espermatozóides equinos e as diferenças encontradas entre ganhões parecem relacionar-se com a fertilidade dos mesmos. Nos ganhões com problemas de fertilidade, a percentagem de células marcadas para os homólogos da VAMP, syntaxina e sinptotagmina contrastou com os valores mais baixos obtidos para as marcadas com a NSF, proteína considerada fundamental para desenlaçar os domínios helicoidais entre as proteínas SNARE emparelhadas. Esta observação sugere que a dissociação de complexos *cis*-SNARE pré-existentes ficaria comprometida e, como consequência, a maioria das células não seria, provavelmente, competente para desencadear a reação acrossômica na sua plenitude. É interessante notar que a percentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro (90,04% e 63,13, respectivamente para os animais férteis e para os in(sub)férteis) se mostrou superior à percentagem de células marcadas para os homólogos das proteínas caveolina-1 e SNARES sendo que a destas últimas manifesta-se maioritariamente na região apical do acrossoma. Estes resultados sugerem que a baixa percentagem de espermatozóides marcados para NSF nos animais com problemas de fertilidade não se fica a dever à ausência de acrossoma. Adicionalmente, nos animais com problemas de fertilidade, as marcações para os homólogos das SNARES ao nível da região equatorial surgem numa percentagem de células inferior à observada nos animais férteis sugerindo que nestes a interação do espermatozóide com o oolema poderia estar comprometida. Quanto à sinptotagmina, nos ganhões férteis observou-se uma percentagem de células marcadas significativamente superior ($P < 0,0001$) à registada nos ganhões com problemas de fertilidade. Isto poderá significar que a afinidade ao cálcio nos espermatozóides destes animais se encontrará prejudicada num elevado número de células.

Neste estudo encontraram-se, ainda, diferenças significativas entre ganhões para a ubiquitinação à superfície das células, o que está de acordo com resultados anteriormente alcançados por SUTOVSKY *et al.* (2003). A ubiquitina ocorre universalmente em eucariotas e constitui uma via não-lisossomal de degradação proteica regulando assim, os níveis de uma variedade de proteínas essenciais para o normal funcionamento das células. Ao nível da função espermática, o sistema proteolítico dependente da ubiquitina encontra-se nos testículos, sendo a atividade do 26S proteosoma mais elevada durante a espermiogénese (*vide* HERMO *et al.*, 2001, e as referências aí citadas, para revisão). As observações deste trabalho, de que o método da ubiquitina põe em evidência, no animal infértil, um maior número de espermatozóides anormais, comparativamente ao método tradicional de avaliação com a tinta-da-china, parece suportar a ideia de que a ubiquitinação ocorre também em células morfológicamente normais (SUTOVSKY *et al.*, 2001), por razões que ainda se desconhecem. Sutovski e colaboradores, utilizando a citometria de fluxo, têm descrito relações negativas entre a ubiquitinação dos espermatozóides e a morfologia espermática normal (SUTOVSKY, TERADA e SCHATTEN, 2001; SUTOVSKY, HAUSER e SUTOVSKY, 2004) mas, curiosamente, MURATORI *et al.* (2005), verificaram que essa relação negativa se deve à presença de corpos residuais semelhantes, em tamanho, forma e densidade, a cabeças espermáticas, presentes em ejaculados humanos oligoastenoteratozoospermicos, corpos esses que marcam com a merocianina 540 (M540) e com a ubiquitina e que são similares a corpos apoptóticos encontrados em esperma de homens sub-férteis. Neste trabalho foi evidenciada uma relação positiva entre a ubiquitinação dos espermatozóides e os parâmetros seminais concentração espermática e alterações morfológicas, assim como relação negativa com a mobilidade e a vitalidade espermáticas, resultados estes que estão em desacordo com o obtido por MURATORI *et al.* (2005), VARUM *et al.* (2007) e PURDY (2008) que indicam que a presença de ubiquitina nos espermatozóides não é, necessariamente, um indicador de fraca qualidade do esperma. Contudo, não será de excluir a possibilidade de as diferenças encontradas se ficarem a dever à diferença entre os métodos de avaliação e o número de espermatozóides avaliados.

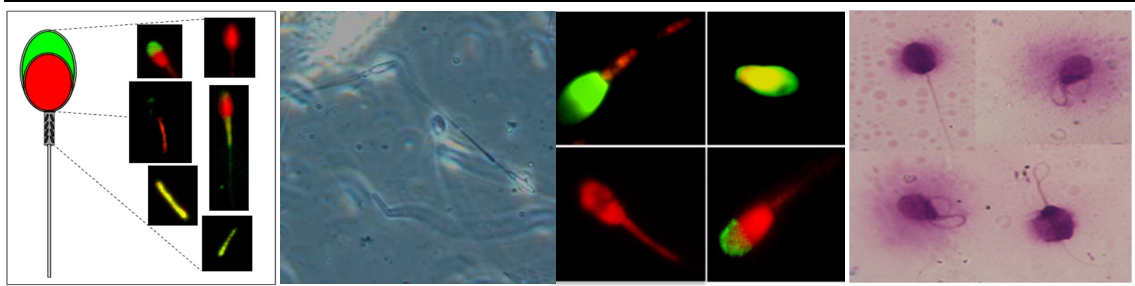
Como referido anteriormente, alguns estudos têm colocado em evidência a relação entre a morfologia espermática e a fertilidade nos equinos. Nos estudos

descritos nos capítulos anteriores essa relação não foi evidenciada e apesar de não se ter encontrado, neste estudo, diferenças significativas entre os dois métodos de avaliação, os resultados sugerem que a marcação com a ubiquitina pode explicar casos de sub-fertilidade independentemente do mecanismo pelo qual os espermatozóides, aparentemente normais (mas possivelmente defeituosos) são ubiquitinados. De acordo com a classificação proposta por SAACKE *et al.* (2000), as anomalias compensadas acabam por não se reflectir na fertilidade dos indivíduos. Aparentemente, e tomando as observações registadas até aqui, os resultados sugerem que mesmo num ejaculado com elevada percentagem de anomalias morfológicas visíveis existe uma população de células normal e suficiente, capazes de compensar a população anormal.

Ao alargarmos o nosso estudo inicial (GAMBOA e RAMALHO-SANTOS, 2005) a um maior número de animais, confirmámos que a modelação das relações funcionais entre o índice de fertilidade dos machos e as características analisadas nos ejaculados é melhor definida pela vitalidade espermática e pelas NSF, caveolina e syntaxina, contrastando com o resultado preliminar em que a sinaptotagmina era inserida no modelo em vez da syntaxina. Tal revela a importância de um maior número de unidades experimentais em estudos desta natureza.

Em resumo, este estudo descreve a presença de proteínas relacionadas com a hipótese SNARE de fusão de membranas nos espermatozóides equinos e fornece provas preliminares de que os componentes principais da maquinaria de fusão descrita para os fenómenos de secreção regulada noutros tipos celulares podem ser úteis na avaliação de problemas de fertilidade idiopática nos machos. Com base nos resultados obtidos, que naturalmente requerem validação adicional, utilizando-se um maior número de animais, parece existir uma relação entre a fertilidade na espécie equina e a presença de um número elevado de células capazes de marcar para a sinaptotagmina, a syntaxina, a NSF e a caveolina. A relevância funcional destas observações em termos da fisiologia da célula continua por determinar até porque nuns sistemas celulares a deficiência em syntaxina reduz a ligação entre as membranas (de WIT *et al.*, 2006) enquanto noutros a ligação não é afectada (BROADIE *et al.*, 1995; de WIT, *et al.*, 2006). A ligação com um padrão fisiológico normal também já foi observado em ratinho que não contém VAMP2 (BORISOVSKA *et al.*, 2005).

INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE ESPERMÁTICA



SUMÁRIO

Neste capítulo descreve-se o estudo efectuado na avaliação da funcionalidade dos espermatozóides equinos. Avaliou-se a qualidade do ADN nuclear, das mitocôndrias, do acrossoma e do plasmalema recorrendo-se, para o efeito, a testes específicos para a integridade do ADN (TUNEL), funcionalidade das mitocôndrias (JC-1), integridade do acrossoma (PSA-FITC), estabilidade e oxidação dos fosfolípidos de membrana (M540 e BODIPY_{C11}) e funcionalidade do plasmalema (teste HOS). O *stress* oxidativo, medido pelo método dos TBARS, foi também avaliado e relacionado com os parâmetros acima referidos assim como com a atividade antioxidante total não-enzimática (TEAC) e com a integridade do ADN, avaliada, neste caso, pelo teste de dispersão da cromatina (SCDT). Com as metodologias aplicadas observámos diferenças significativas entre os espermatozóides de animais férteis (Grupo F) e in(sub)férteis (Grupo SubF), confirmando-se a melhor qualidade seminal das amostras recolhidas na época de reprodução. Independentemente destes factores, cada ejaculado caracteriza-se por uma diversidade de populações espermáticas, conforme atestado pela marcação Tripla (IP/PSA-FITC/JC-1). No conjunto das observações, a análise estatística dos dados revelou que os parâmetros PMS, vitalidade, morfologia, AI e integridade/estabilidade do ADN são modulados por alguns dos parâmetros funcionais como TBARS, $\Delta\Psi_{mit}$, M540. A coexistência de um elevado nível de peroxidação lipídica e elevada actividade antioxidante no plasma seminal, assim como um elevado número de células expressando dispersão da cromatina, foi observada no esperma dos garanhões Sorraia, sugerindo não uma falha nos mecanismos antioxidantes não enzimáticos mas uma sobre produção de ROS. Os resultados sugerem, ainda, alguma disfunção nos espermatozóides da raça Sorraia, para além da observável ao nível morfológico e insinua que a produção de ATP, nestas células, assenta sobre a via glicolítica.

Infertilidade Equina: múltiplas fragilidades ou um fado do espermatozóide?

Sandra Cristina de Oliveira Pinto Gamboa

Universidade de Coimbra, 2011

De acordo com o nº2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº388/70 foram utilizados na elaboração deste capítulo alguns dados usados em artigos previamente publicados:

(i) Em jornais internacionais com refere

Gamboa, S., Rodrigues, A.S., Henriques, L., Batista, C., Ramalho-Santos, J. - Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 73:7 (2010), 950-958.

Gamboa, S., Rodrigues, M.S., Cortez, P., Rebordão, R., Ramalho-Santos, J. - Application of fluorescence microscopy in the routine analysis of equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 107:3-4 (2008), 323-324.

Morte, M.I., Rodrigues, A.M., Soares, D., Rodrigues, A.S., Gamboa, S., Ramalho-Santos, J. - The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 106:1-2 (2008), 36-47.

(ii) Em encontros científicos internacionais

Gamboa, S., Ramalho-Santos, J. - Functional characterization of equine sperm: a molecular evaluation of stallion fertility. EAAP Meeting, Barcelona, Spain, (2009).

Gamboa, S., Rodrigues, M.S., Cortez, P., Rebordão, R., Ramalho-Santos, J. - Application of fluorescence microscopy in the routine analysis of equine spermatozoa. 5th International Symposium on Stallion Reproduction. Gramado, Brasil, (2008).

7.1. INTRODUÇÃO

Nos capítulos precedentes (4 e 5) foi evidenciada a influência da época do ano e do indivíduo sobre os parâmetros sumários do esperma sem que os mesmos mostrassem uma forte relação com a fertilidade dos animais. Dentre os parâmetros que devem ser monitorados no esperma, a mobilidade e a morfologia espermática são os mais referidos como indicadores da fertilidade potencial masculina. Não obstante a mobilidade espermática dar indicação da integridade do axonema e estruturas associadas, assim como do metabolismo celular, e a morfologia da célula ser um reflexo da qualidade da espermatogénese, verificámos (no capítulo 6) uma dissociação entre o avaliado *à priori* e a fecundidade *à posteriori*. Assim, quando se pretende inferir do potencial de fertilidade de um determinado indivíduo, o exame sumário do esperma tem um valor limitado, possivelmente por os parâmetros observados terem subjacente o conceito de integridade estrutural da célula olvidando a sua integridade funcional. Assim, testes que permitam ajuizar do estado funcional da célula, complementando o espermograma, serão úteis na medida em que o SPZ, para fertilizar o oócito, tem de possuir uma série de atributos que não são acessíveis nos exames tradicionais.

É sabido, e os resultados que temos vindo a obter até aqui com o teste de vitalidade (eosina-nigrosina) são disso um indicador, de que os espermatozóides imóveis observados numa amostra de esperma podem não estar necessariamente mortos. Essa imobilidade pode ser fruto, entre outros fatores, de defeitos ultra-estruturais, somente diagnosticáveis por microscopia electrónica, ou de falhas no metabolismo celular, mormente nos processos de obtenção de energia. A atividade metabólica das células eucarióticas assenta num conjunto de reacções químicas maioritariamente não-espontâneas que requerem energia livre. O ATP (adenosina trifosfato) é a molécula que armazena e liberta energia quando ela é necessária para o normal decurso de uma reacção. A produção mais significativa de ATP por células eucariotas ocorre na mitocôndria por fosforilação oxidativa (respiração aeróbia). A imensa coreografia que caracteriza a capacitação, a reacção do acrossoma e a interacção com o oócito requer uma produção eficiente de ATP. Em equinos, os SPZ enveredam, quer pela via glicolítica quer pela oxidação fosforilativa, dependendo da disponibilidade de O₂ e do tipo de substratos presentes no meio envolvente. Qual destas vias mais

contribui para as necessidades energéticas da célula é uma questão para a qual a ciência ainda não tem resposta. Como a cadeia transportadora de eletrões, acoplada à síntese de ATP, contribui para a manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mit}$) a sua análise suscita interesse na medida em que a presença de mitocôndrias íntegras e funcionais no SPZ tem sido relacionada com a mobilidade espermática e com fertilidade. Acresce que, à mitocôndria, são atribuídas funções para além das da produção energética, tais como a síntese de proteínas, o desencadear de apoptose celular e a produção de ROS presumindo-se, ainda, o seu envolvimento em vias de sinalização desencadeadas pelo ião Ca^{2+} , uma vez que ela se apresenta como um reservatório deste catião (*vide* RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2009, e as referências aí citadas, para revisão).

O efeito hidrofóbico impõe constrangimentos à interacção entre membranas e assume-se que alguma destabilização inicial dos fosfolípidos é necessária para o processo de fusão. Quimiossensores cromogéneos, como a Merocianina 540 (M540), permitem aceder à instabilidade dos fosfolípidos da MP. Estudos indicam que baixas concentrações de ROS, resultantes do metabolismo aeróbio, contribuem para a fusão de membranas na medida em que reagem facilmente com os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) de cadeia carbonada longa característicos das células espermáticas, promovendo a sua peroxidação e facilitando o efluxo de colesterol e a redistribuição de complexos moleculares pelas diferentes regiões do plasmalema (AITKEN, 1995 e 2003; BAUMBER *et al.* 2003b). Contudo, níveis elevados de ROS podem afectar a mobilidade e a integridade/funcionalidade das membranas plasmática e acrossómica assim como do ADN do espermatozóide (AITKEN, *et al.* 1998; BILODEAU *et al.*, 2002; MARCHETTI *et al.*, 2002), parecendo haver uma relação entre os danos no ADN e a fertilidade em humanos (*vide* COCUZZA *et al.*, 2008, para revisão).

A fraca função mitocondrial nos SPZ, detectada por diminuição no $\Delta\Psi_{mit}$, tem sido também associada a níveis elevados de ROS, em humanos (WANG *et al.*, 2003). O reduzido volume de citoplasma da célula espermática determina uma capacidade antioxidante endógena limitada (AITKEN e FISHER, 1994) que parece ser compensada pelo potente sistema antioxidante, enzimático e não-enzimático, presente no plasma seminal. A nível intra- e extracelular reconhecem-se mecanismos antioxidantes não enzimáticos [α -tocoferol e ácido ascórbico (AITKEN, 1995); ácido ascórbico, ácido úrico, albumina,

taurina, hipotaurina e vitamina E (ZINI, GARRELS, e PHANG *et al.*, 2000)] que contribuem para o equilíbrio entre os níveis de ROS e a integridade estrutural e funcional da célula.

Neste capítulo, visou-se relacionar aspectos estruturais como a integridade do plasmalema, do acrossoma e do ADN nuclear, com a funcionalidade das células espermáticas equinas, nomeadamente a função mitocondrial, a estabilidade e funcionalidade da MP, a mobilidade e a capacidade antioxidante total não enzimática. Por outro lado, a avaliação simultânea de múltiplas características do esperma em espermatozóides individuais fornecerá mais informação acerca dos atributos que a célula tem de possuir para fertilizar um oócito. Assim, visámos também implementar uma técnica de marcação múltipla dos spz, aplicando sobre a mesma amostra quimiossensores fluorescentes capazes de fornecer informação acerca do estado das membranas plasmática e acrossómica e da funcionalidade das mitocôndrias.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

A proveniência dos ejaculados utilizados neste trabalho encontram-se particularizados na Análise dos Dados e nos Resultados, e a observação de parâmetros seminais e cálculo da fertilidade dos ganhões foi realizada conforme explicitado em capítulos anteriores. De igual modo, e conhecidos os índices reprodutivos dos animais, consideraram-se dois grupos: Férteis (Grupo F) e In(sub)férteis (Grupo subF). Nas metodologias descritas abaixo e onde se monitorizaram parâmetros, quer na fração líquida quer na fração figurada do esperma, procedeu-se à centrifugação (600 x g, 10 min) de uma porção do ejaculado de forma a separarem-se os espermatozóides do plasma seminal. A fração espermática foi lavada com solução de sais de Hank com Heppes 10mM (HH) (600 x g, 10 min) e o sedimento ressuspendido em HH perfazendo-se igual volume do plasma seminal. As amostras foram mantidas no frio até à sua utilização. A maior parte dos reagentes utilizados foram adquiridos à Sigma-Aldrich. (St. Louis, USA). Casos em contrário são indicados no texto.

7.2.1. AVALIAÇÃO DO TEOR EM AÇÚCARES REDUTORES (EM TERMOS DE D-GLICOSE) NO PLASMA SEMINAL

O teor de açúcares redutores (em termos de D-glicose) no plasma seminal (n=186) foi avaliado por espectrofotometria com recurso ao método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), quantificando-se a sua redução, em meio alcalino e a quente, por reacção com os grupos carbonilo livres característicos dos açúcares redutores (MILLER, 1959) (Figura 7.1).

Antecedendo a leitura das amostras, foi padronizada uma curva constituída a partir de concentrações crescentes de glicose, de 0,0-1,00 mg/L, que se fizeram reagir com 1ml de DNS (0,044M de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 0,04M de NaOH e 1,064M de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), em meio aquoso (4 ml de volume final) e à temperatura de ebulição, por 5 minutos, seguidas de arrefecimento. As determinações foram feitas em duplicado utilizando-se para o efeito 1ml de plasma seminal. A absorvância foi lida num espectrofotómetro *Jasco M7800*, a um comprimento de onda de 540nm.

7.2.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS MITOCÔNDRIAS

7.2.2.1. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{\text{mit}}$) foi examinado com recurso ao fluorocromo catiónico iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). O esperma foi diluído (20×10^6 spz/ml HH) e os espermatozóides marcados com JC-1 (previamente diluído em DMSO, 1,53mM) a uma concentração de $2\mu\text{M}$ (GRAVANCE *et al.*, 2000), e incubadas a 35°C por 30 minutos. Aliquotas (5,5 μl) de cada amostra foram montadas entre lâmina e lamela e 200 espermatozóides por amostra foram observados por microscopia de fluorescência (filtro de fluoresceína - $\lambda_{\text{excitação}}=494$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=520$ nm).

7.2.3. STRESSE OXIDATIVO

7.2.3.1. OXIDAÇÃO DE LÍPIDOS DE MEMBRANA E DO PLASMA SEMINAL

i. O MÉTODO DOS TBARS (ou do MDA)

Os produtos primários da peroxidação dos lípidos, tradutora de *stresse* oxidativo, são peróxidos lipídicos que originam compostos carbonilo como o aldeído malónico (MDA). Este forma um composto rosado estável ao reagir com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 7.1) donde a reatividade do TBA com meios biológicos complexos pode ser considerada como um índice da sua peroxidação lipídica (GUTTERIDGE, 1982).

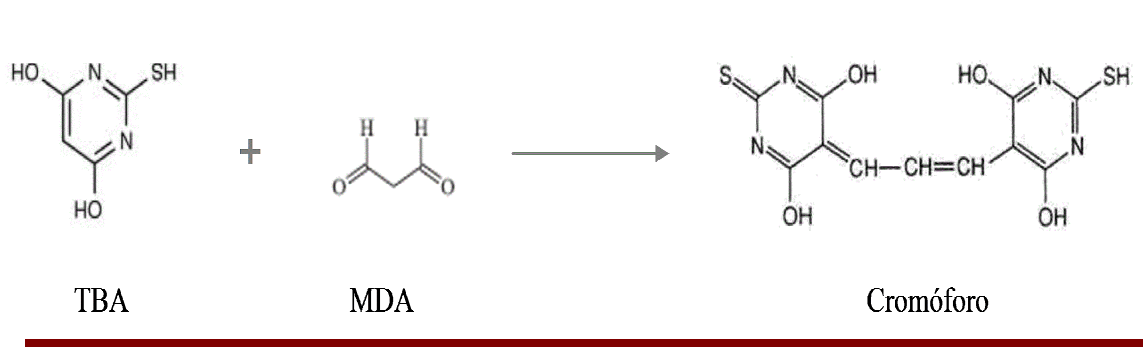


Figura 7.1. Reacção do ácido tiobarbitúrico com o malonaldeído.

Tanto nos espermatozóides como no plasma seminal, a extensão da lipoperoxidação foi avaliada com base na quantificação de Substâncias Reactivas ao Ácido TioBarbitúrico (TBARS), expressa em MDA (ERNSTER e NORDENBRAND, 1967; BUEGE e AUST, 1978). As determinações foram feitas em triplicado utilizando-se, para o efeito, 450 μ L de cada uma das fracções do sémen que se fizeram reagir, durante 10 minutos a 100°C, com 2 mL de reagente TTH (TBA 0,375% (m/v) - TCA 40% - HCl 0.25N). Após o seu arrefecimento em gelo e centrifugação (600 x g, 10'), o sobrenadante foi recolhido e a sua densidade óptica determinada a 530 nm, num espectrofotómetro *Jasco M7800* contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo-se as fracções espermáticas por solução de HH. A quantidade de TBARS formada foi calculada usando o coeficiente de extinção molar do aldeído malónico ($\epsilon_{\text{MDA}} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressa em termos de nmoles TBARS /mg proteína (BUEGE e AUST, 1978).

Uma vez avaliada a absorvância dos TBARS impunha-se a quantificação do teor em proteínas, nas duas fracções do sémen, de forma a quantificar-se a extensão da peroxidação lipídica. A determinação do teor proteico, quer nos espermatozóides quer no plasma seminal, foi feita por espectrofotometria com recurso ao método descrito por SEDMAK e GROSSBERG (1977). Este método tira partido das propriedades do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB G-250) que, em condições acídicas, existe predominantemente sob a forma catiónica protonada passando a anião (forma desprotonada) quando se liga às proteínas. Dessa ligação, mediada por grupos amina protonados de aminoácidos básicos (nomeadamente arginina) e aromáticos (COMPTON e JONES, 1985), resulta a passagem do corante de castanho ($\lambda_{\max}=470\text{nm}$) para azul ($\lambda_{\max}=620\text{nm}$) (SAPAN, LUNDBLAD e PRICE, 1999).

Antecedendo a leitura das amostras, foi padronizada uma curva construída a partir de concentrações crescentes de albumina sérica bovina (BSA), de $0\mu\text{g}$ a $50\mu\text{g}$, corada com 2ml de reagente de Sedmak (CBB G250 0,06%, em ácido perclórico 3% (p/v)) em meio aquoso (3 ml de volume final). As determinações nas amostras de espermatozóides e de plasma seminal foram feitas em duplicado utilizando para o efeito 20 μl de cada uma das fracções do sémen. A absorvância foi lida num espectrofotómetro *Jasco M7800*, a um comprimento de onda de 620nm.

ii. O MÉTODO DO BODIPY

A avaliação qualitativa das regiões do espermatozóide com maior incidência de lípidos peroxidados foi efectuada com recurso ao sensor lipofílico de radicais livres 4,4-difluor-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-boro-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ácido undecanóico (BODIPY®581/591C₁₁; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Uma alíquota de esperma (200×10^6 SPZ) foi diluída em TALP modificado (114mM NaCl, 3,2mM KCl, 2mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂, 25mM NaHCO₃, 0,4mM Na₂HPO₄, 0,2mM Piruvato, 10mM C₃H₅NaO₃, 10mM Hepes), os espermatozóides separados do plasma seminal por centrifugação e ressuspendidos em 1 mL de TALP modificado. Após marcação com BODIPY®581/591C₁₁ (10 μM em DMSO) e um período de incubação de 30 minutos, a 38°C, as células foram avaliadas por microscopia de fluorescência distinguindo-se espermatozóides marcados

de verde (lípidos de membrana peroxidados) de espermatozóides marcados de vermelho (lípidos de membrana não peroxidados).

7.2.3.2. ESTABILIDADE DOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA

A presença de espermatozóides com membranas instáveis foi estimada por meio do quimiossensor cromogéneo Merocianina 540 (M540; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) (HARRISON, ASHWORTH e MILLER, 1996), um fluorocromo lipofílico que apresenta maior intensidade de fluorescência quando se liga a lípidos do folheto externo da membrana plasmática com maior grau de espaçamento entre si (desordem), como no caso de membranas em estado mais fluido. As amostras de esperma (25×10^6 spz/mL) foram incubadas com a M540 (diluída em dimetil sulfóxido, DMSO) a uma concentração final de $2,7 \mu\text{M}$, numa solução HH com 1% de BSA, por 30 minutos a 35°C . Aliquotas ($5,5 \mu\text{L}$) de cada amostra foram montadas entre lâmina e lamela e 200 espermatozóides por amostra foram observados por microscopia de fluorescência (filtro de rodamina - $\lambda_{\text{excitação}}=515-560 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}}=520 \text{ nm}$). Com esta marcação foi possível observar duas populações de células: umas, emitindo fluorescência fraca (M540-), devido à baixa fluidez da membrana reflexo de uma bicamada mais ordenada e outras, emitindo fluorescência intensa (M540+) devido à maior fluidez da membrana em resultado de uma maior desordem dos fosfolípidos.

7.2.3.3. DANOS NO ADN

i. ENSAIO DO TUNEL

O teste de TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling”) detecta danos endógenos no ADN dos espermatozóides e tem sido considerado um método adequado para quantificar as quebras no ADN (YOUNG *et al.*, 2003). O teste baseia-se na incorporação, pela enzima deoxinucleotidil transferase terminal (Tdt), de nucleótidos (dUTP, 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) na região livre 3'OH das quebras do ADN de cadeia dupla ou simples.

Foi utilizado o APO-BrdUTM TUNEL Assay *Kit* (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) com algumas modificações. Procedeu-se à adesão dos espermatozoides (10×10^6 spz em PBS - 200mg/L KCl; 200mg/L KH_2PO_4 ; 1150mg/L Na_2HPO_4 ; 8000mg/L NaCl; 500mg/L NaN_3 ; pH 7,4) a lamelas revestidas de poli-lisina seguida de fixação por 2 horas, à temperatura ambiente, em PBS com 2% de formaldeído e permeabilização com uma solução de Triton X-100 (1%) em PBS por 30 minutos. As reacções não-específicas foram bloqueadas por incubação, durante 1 hora, em PBS contendo BSA (1%) e glicina (400mM) (solução de bloqueio). As amostras foram mantidas nesta solução, a 4°C, até à marcação com os componentes do *kit* TUNEL. Nesta fase, as lamelas foram incubadas, ao abrigo da luz, com 50µL de solução de marcação do ADN (31,25µL H_2O destilada; 50µL tampão; 0,75µL Tdt; 8µL BrdUTP) por 1 h a 37°C. Findo este período de incubação, o excesso de nucleotídeos foi eliminado por passagem das lâminas em solução de lavagem (*Rinse buffer*; 10 minutos) e as células marcadas com o anticorpo anti-BrdUTP (2,5µL; conjugado com Alexa Fluor 488; 2 horas, ao abrigo da luz). Uma incubação em Triton X-100 (0,1% v/v de PBS) por 30 minutos permitiu eliminar o excesso de anticorpo secundário. As amostras foram montadas em meio de montagem VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e 100 a 200 células por lâmina foram visualizadas com um microscópio de fluorescência HUND H 600 AFL (filtro de fluoresceína $\lambda_{\text{excitação}}=494$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=520$ nm). Os espermatozoides examinados microscopicamente foram identificados como TUNEL positivo (TUNEL⁺, ADN fragmentado) em virtude da coloração verde (conferida pela ALEXA FLUOR 488) na cabeça espermática ou túnel negativo (TUNEL⁻) devido à fluorescência vermelha conferida pela contra coloração do ADN com o iodeto de propídio (IP, 0,48mM).

ii. O TESTE DE DISPERSÃO DA CROMATINA (SCDT)

O SCDT utilizado apoiou-se na metodologia descrita por FERNÁNDEZ *et al.* (2003) com algumas modificações (LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2007). O teste baseou-se no princípio de que os espermatozoides com ADN fragmentado produzem um halo característico de *loops* de ADN não observável em espermatozoides com ADN íntegro, quando sujeitos à remoção das proteínas nucleares sem desnaturação prévia em solução acídica (HCl 0,8N). As amostras de espermatozoides foram misturadas a agarose (1%) de

baixa temperatura de fusão (37°C) de forma a obter-se uma concentração final de agarose de 0,7% e de espermatozóides entre 5 a 10 milhões/mL. Uma alíquota (20µL) de cada amostra foi depositada sobre uma lâmina previamente revestida de agarose padrão, coberta com lamela (24x60mm) e deixada a solidificar a 4°C, durante 4 minutos, sobre uma superfície metálica. Findo este período, as lamelas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas mergulhadas sequencialmente em duas soluções neutralizantes e de lise (solução 1: 0,4M Tris, 0,8M DTT, 1% Triton X-100 e 50mM EDTA, pH 7,5; solução 2: 0,4M Tris, 2M NaCl, 1% Triton X-100, pH 7,5) respectivamente por 10 e 5 minutos, à temperatura ambiente. Seguidamente procedeu-se à lavagem das lâminas em tampão Tris-borato-EDTA (0,09M Tris-borato e 0,002M EDTA, pH 7,5) por 2 minutos, e posterior desidratação sequencial em soluções aquosas de etanol a 70%, 90% e 100% (2 minutos cada). As células foram coradas sequencialmente com as soluções de eosina (5 minutos) e de azul-de-metileno (1 minuto) presentes no *kit diffVet* (dmV, valldoreix, Espanha) e avaliadas por microscopia de campo claro. Segundo FERNÁNDEZ *et al.* (2003), os espermatozóides assim tratados dão origem a nucleóides com halos de difusão da cromatina em células cujos núcleos continham ADN fragmentado. Núcleos espermáticos com ADN íntegro, ou não apresentam halos de dispersão da cromatina ou, se o fazem, estes são pequenos (de tamanho inferior ou igual ao do diâmetro do núcleo) e traduzem o relaxamento da cromatina.

7.2.4. MARCAÇÃO TRIPLA IP/PSA-FITC/JC-1

Para o estabelecimento da marcação tripla associando, sobre a mesma alíquota de um ejaculado, o IP, o PSA-FITC e o JC-1, amostras de cada ejaculado (20×10^6 spz/ml em HH, a 35°C) foram adicionadas de JC-1 (2µM) e incubadas durante 15 min. Findo este tempo adicionou-se o PSA-FITC (1mg/ml de uma solução stock em DMSO) e passados 10 min, o IP (0,48mM/ml). As amostras foram observadas quando perfizeram 30 minutos de incubação. Simultaneamente, e para cada ejaculado, alíquotas de esperma (20×10^6 spz/ml em HH, a 35°C) foram tratadas em separado com cada um dos fluoróforos em questão.

7.2.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante total não-enzimática, do plasma seminal e dos espermatozóides, foi efectuada por espectrofotometria com recurso ao método TEAC - Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox - que constitui um método colorimétrico baseado na capacidade dos antioxidantes, presentes em amostras biológicas complexas, captarem o radical catiónico ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), um cromóforo verde-azulado estável com absorvidade máxima entre 600-734 nm (RE *et al.*, 1999) produzido pela oxidação do 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS). Na presença de agentes antioxidantes, ocorre um decaimento da cor, logo uma redução na absorvância que corresponde, quantitativamente, à concentração do antioxidante presente (MILER *et al.*, 1993), a qual é expressa em equivalentes Trolox (6-hidroxi 2,5,7-tetrametocromano-2-ácido carboxílico), um análogo hidrossolúvel do α -tocoferol (Vitamina E).

Precedendo a leitura das amostras, foi padronizada uma curva construída a partir de concentrações crescentes de Trolox, (GIULIVI, 1992), de 0mM a 2,5mM, em tampão fosfato (PBS, 1 mL de volume final) na presença de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($150\mu\text{M}$) formado pela interacção do ABTS com as espécies de radicais de ferilmioglobina ($\cdot\text{X}-[\text{FeIV}=\text{O}]$;) geradas pela activação da metmioglobina (HX-FeIII, Mb; $2,5\mu\text{M}$) pelo peróxido de hidrogénio (H_2O_2 ; $375\mu\text{M}$) de acordo com as reacções das figuras 7.2 e 7.3 (RICE-EVANS e MILLER, 1994; MILLER e RICE-EVANS, 1996).

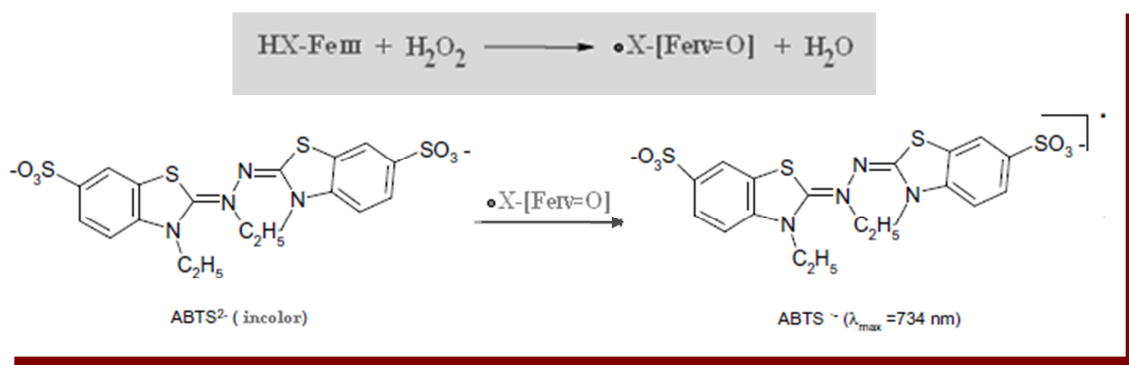


Figura 7.2. Formação de ferilmioglobina ($\cdot\text{X}-[\text{FeIV}=\text{O}]$), por acção do peróxido de hidrogénio (H_2O_2), e sua interacção com o ABTS com formação do radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

De acordo com a metodologia descrita por RHEMREV *et al.* (2000), determinou-se ainda o potencial reactivo oxidante total, *Total TRAP (Potential Antioxidant Reactive Total)* definido como o valor de TEAC resultante entre os momentos T1 (T=3') e T4 (T=33'), sendo a contribuição de antioxidantes não enzimáticos que reagem rapidamente, tal como a vitamina E e a C, definida como *Fast TRAP* e a contribuição de antioxidantes não enzimáticos que reagem mais lentamente, tal como a albumina, definida como *Slow TRAP*.

7.2.6. ANÁLISE DOS DADOS

Dado o elevado número de parâmetros a monitorar em simultâneo nos ejaculados, a dispersão do equipamento necessário por espaços físicos distantes e porque o trabalho requeria ligeireza no tempo, procedeu-se à avaliação de determinados parâmetros em determinadas épocas de reprodução e a outros em outras épocas.

Para avaliar os efeitos da *época do ano*, da *fertilidade* e do *indivíduo* reuniram-se, espermogramas onde se avaliou ainda a vitalidade (eosina-nigrosina, n=309 e IP/SYBR14; n=207, 15 animais), o potencial de membrana mitocondrial (JC-1; n=210, 15 animais), a estabilidade dos fosfolípidos de membrana (M540; n=77, 8 animais), a peroxidação lipídica (TBARS_{PS}, n=237; TBARS_{SPZ}, n=232, 11 animais), a integridade do acrossoma (PSA-FITC; n=239, 13 ganhanhões), a integridade do ADN (TUNEL n=165, 10 animais). Para a comparação entre o teste hipo-osmótico e a vitalidade reuniram-se dados relativos a 94 (eosina-nigrosina) e 54 (IP/SYBR14) ejaculados. Para o estabelecimento da marcação tripla utilizaram-se 27 ejaculados obtidos de 8 ganhanhões (2 PSL, 2 Sorraia, 1 AA, 1 SF, 1 Holstein e 1 Garrano; 3 in(sub)-férteis e 5 férteis). Dois ganhanhões PSL e 4 Sorraias foram utilizados para a avaliação da peroxidação lipídica (TBARS_{PS} e TBARS_{SPZ}; n=89) e da atividade antioxidante total não-enzimática (TEAC; PS n=89, SPZ n=63) no esperma assim como para aplicação do SCDT (n=30; 2 PSL e 2 Sorraia). Para estas últimas, as amostras foram conservadas no frio (-20°C) até serem processadas em simultâneo.

Para as situações gráficas e aplicação do método de Bland e Altman utilizou-se o programa Excel (Microsoft) e para a análise estatística dos dados recorreu-se ao

programa SPSS (versão 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os efeitos da *época do ano*, da *fertilidade* e do *indivíduo* (covariável) foram analisados por ANOVA (GLM-General Linear Models, para dados não balanceados) e por testes múltiplos de comparação (LSD). As decisões assentaram sempre nos valores F resultantes dos Quadrados-Médios do tipo III. Considerou-se um nível de significância $\alpha = 0,05$ (MAROCO, 2007).

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1. ATIVIDADE MITOCONDRIAL

7.3.1.1. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Quando os ejaculados (n=109; 48 e 61 recolhidos respectivamente, em Set-Dez e Jan-Jul), obtidos de 8 animais (2 PSL, 2 Sorraia, 1 AA, 1 SF, 1 Holstein e 1 Garrano; 3 in(sub)-férteis e 5 férteis), foram marcados com o JC-1 foi possível observar, sobre a mesma amostra, os padrões de marcação descritos na literatura, tanto em espermatozoides imóveis como móveis. Assim, distinguiram-se padrões de marcação restritos à região da peça intermédia caracterizados quer por mitocôndrias a fluorescerem com uma tonalidade variando da laranja/amarelada ao vermelho ($\uparrow\Delta\Psi_{mit}$) quer por fluorescência verde homogénea ao longo de toda a peça intermédia ($\downarrow\Delta\Psi_{mit}$; *vide* Figura 7.4). Espermatozoides (SPZ) móveis, sem qualquer marcação com o JC-1, foram também observados.

As diferentes populações observadas foram quantificadas. Durante o período de Setembro a Dezembro e independentemente dos indivíduos, a percentagem de SPZ que expressavam mobilidade associada a um baixo potencial de membrana mitocondrial (MMQ's SPZ_{móveis} $\downarrow\Delta\Psi_{mit}$ =30,73%) foi superior à registada para os SPZ móveis com elevado potencial de membrana mitocondrial (MMQ's SPZ_{móveis} $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ =15,04%). Esta situação inverte-se a partir do início da época de reprodução (MMQ's SPZ_{móveis} $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ =38,84%), quando a maior parte dos SPZ passou a apresentar elevado potencial de membrana mitocondrial associado à mobilidade (MMQ's SPZ_{móveis} $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ =47,55%, no final da época).

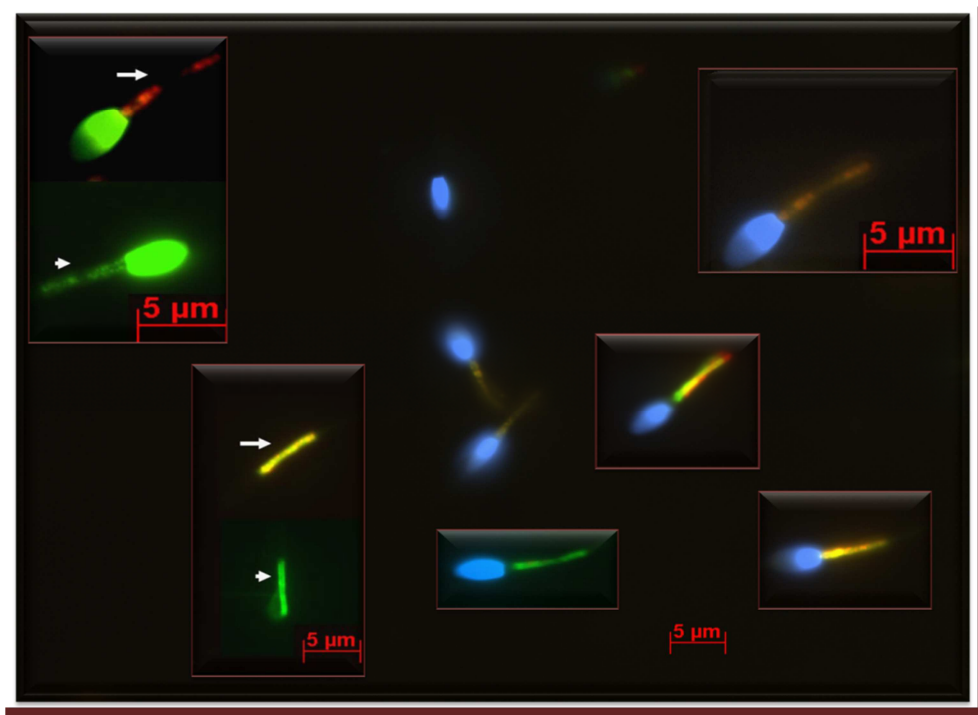


Figura 7.4. Marcação das mitocôndrias dos espermatozóides com o JC-1. A marcação com o JC-1 permitiu distinguir, na mesma amostra, espermatozóides com elevado (seta; $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$) e com baixo (ponta da seta; $\downarrow\Delta\Psi_{mit}$) potencial de membrana mitocondrial. Os núcleos foram marcados quer com IP (verde) quer com DAPI (azul).

A proporção de SPZ com alto e com baixo potencial de membrana mitocondrial, independentemente da mobilidade, foi ainda quantificada em mais 101 ejaculados ($n_{total}=210$; 4 PSL, 3 Sorraia e 8 de outras raças) de Setembro a Julho tendo-se observado melhor qualidade das células no período de Março a Julho (*vide* Figura 7.5).

O efeito da *época do ano* e do *indivíduo* ($P<0,001$) foi notório sobre os parâmetros em análise sendo que o fator *fertilidade* influiu sobre a totalidade de células expressando $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ ($P<0,001$) (*vide* Figura 7.5, tabela da ANOVA). As médias (MMQ's) da percentagem de células com potencial de membrana mitocondrial foram de 30,78% e 68,59% ($\uparrow\Delta\Psi_{mit}$, $P<0,001$) e de 54,92% e 26,24% ($\downarrow\Delta\Psi_{mit}$, $P>0,05$) para a contra-estação e para a época de reprodução, respectivamente.

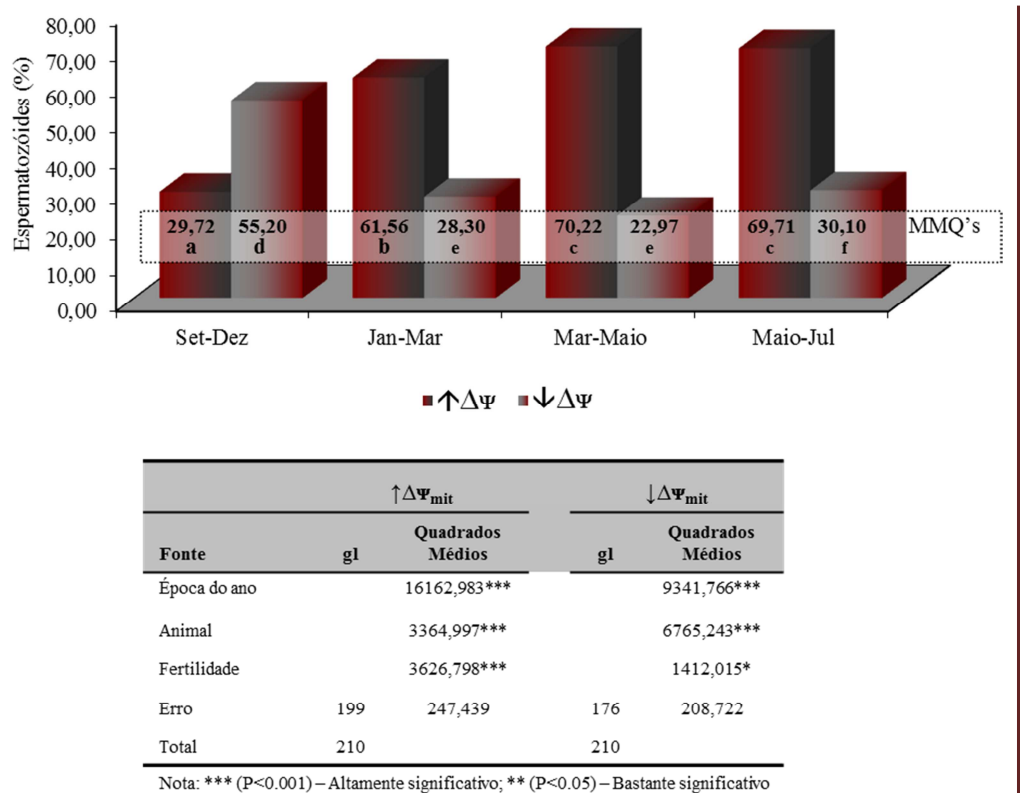


Figura 7.5. Potencial de membrana mitocondrial observado nos espermatozóides. As barras representam os valores médios (MMQ's, que se evidenciam no retângulo em destaque), obtidos para os ejaculados recolhidos entre Setembro e Dezembro (Set-Dez), Janeiro a 21 de Março (Jan-Mar), 22 de Março a meados de Maio (Mar-Maio) e finais de Maio a Julho (Maio-Jul) (n=210). Abaixo, em letras minúsculas (a,b,c,d,e,f) encontra-se o resultado do teste de diferença entre as médias sendo que médias a que correspondem letras diferentes, diferem entre si (P<0,05). Na tabela consta o resultado da ANOVA em função da época do ano, da fertilidade e do animal.

Quando considerados os dois grupos de animais (Grupo F e Grupo subF) verificámos, durante a contra-estação, valores médios (MMQ's) da percentagem de células com potencial de membrana mitocondrial de 33,08% e 20,04% ($\uparrow\Delta\Psi_{mit}$, $P < 0,05$) e de 56,80% e 61,32% ($\downarrow\Delta\Psi_{mit}$, $P > 0,05$) para os animais de fertilidade comprovada (F) e para os que apresentavam problemas de fertilidade (SubF), respectivamente; já na época de reprodução, os valores obtidos foram de 71,78% e 64,79% ($\uparrow\Delta\Psi_{mit}$, $P < 0,01$) e de 23,34% e 28,73% ($\downarrow\Delta\Psi_{mit}$, $P < 0,01$), respectivamente para os animais do Grupo F e para os do Grupo subF. Atente-se que estes animais eram maioritariamente cavalos da raça Sorraia.

7.3.2. STRESSE OXIDATIVO

7.3.2.1. OXIDAÇÃO DE LÍPIDOS DE MEMBRANA E DO PLASMA SEMINAL

Da ANOVA aplicada para ajuizar da influência da *época do ano*, da *fertilidade* e do *indivíduo* sobre os níveis de peroxidação lipídica observados resultou um efeito significativo ($P < 0,001$) da *época do ano* e do *indivíduo* no grau da extensão de lípidos oxidados no plasma seminal (TBARS_{PS}) enquanto o fator *fertilidade* influenciou significativamente ($P < 0,05$) sobre a extensão da peroxidação nos espermatozóides (TBARS_{SPZ}) (vide Figura 7.6). As médias (MMQ's) da peroxidação lipídica foram de 0,258 e 0,229 (TBARS_{SPZ}, $P > 0,05$) e de 0,330 e 0,525 (TBARS_{PS}, $P < 0,05$) para a contra-estação e para a época de reprodução, respectivamente.

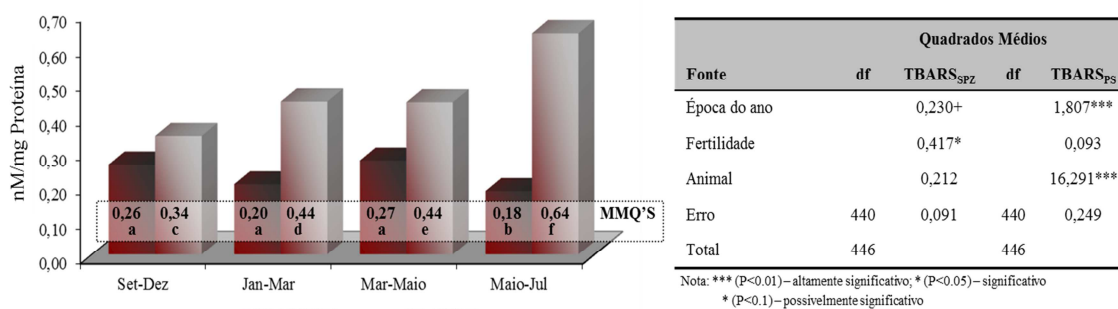


Figura 7.6. Peroxidação lipídica observada nos espermatozóides (TBARS_{SPZ}) e no plasma seminal (TBARS_{PS}).

As barras representam os valores médios (MMQ's, que se evidenciam no retângulo em destaque) obtidos para os ejaculados recolhidos entre Setembro e Dezembro (Set-Dez), Janeiro a 21 de Março (Jan-Mar), 22 de Março a meados de Maio (Mar-Maio) e finais de Maio a Julho (Maio-Jul) ($n=210$). Abaixo, em letras minúsculas (a,b,c,d,e,f) encontra-se o resultado do teste de diferença entre as médias sendo que médias a que correspondem letras diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$). Na tabela consta o resultado da ANOVA em função da época do ano, da fertilidade e do animal.

Durante a contra-estação, as médias (MMQ's) da peroxidação lipídica foram de 0,32 e 0,16 (TBARS_{SPZ}, $P < 0,05$) e de 0,17 e 0,25 (TBARS_{PS}, $P < 0,05$) para os animais do Grupo F ($n=48$) e para os do Grupo SubF ($n=38$), respectivamente; já na época de reprodução, os valores obtidos foram de 0,26 e 0,20 (TBARS_{SPZ}, $P < 0,05$) e de 0,57 e 0,53 (TBARS_{PS}, $P > 0,05$) para o Grupo F ($n=210$) e para o Grupo SubF ($n=150$), respectivamente.

Uma das limitações do método TBARS é não fornecer informação relativamente às regiões celulares mais afectadas pelo ataque de ROS. Assim, ao investigar-se, com recurso ao BODIPY®581/591C₁₁, as regiões da célula espermática com estados de *stresse* oxidativo verificamos emissão de fluorescência principalmente ao nível da região da peça intermédia sendo que nalgumas células a marcação se estendia à região da cabeça (Figura 7.7).



Figura 7.7. Espermatozóides marcados com o quimiossensor BODIPY®581/591C₁₁, tradutor de *stresse* oxidativo nos espermatozóides. Seta (→): SPZ sem mitocôndrias na porção média da PI.

7.3.2.2. DANOS CELULARES

7.3.2.2.1. INTEGRIDADE E ESTABILIDADE DE MEMBRANAS

i. INTEGRIDADE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO PLASMALEMA

A integridade estrutural da MP foi avaliada pelo método da eosina-nigrosina e pelo método do IP/SYBR14. Os fatores em análise *época do ano*, *fertilidade* e *indivíduo* influenciaram ($P < 0,001$) a proporção de células marcadas como vivas com estes métodos de exclusão (Tabela 7.1). As médias (MMQ's) da vitalidade espermática encontradas foram de 50,98% e 63,76% (eosina-nigrosina, $P < 0,001$) e de 52,00% e 58,12% (IP/SYBR14, $P < 0,05$), para a contra-estação e para época de reprodução, respectivamente.

Durante a contra-estação, as médias (MMQ's) da percentagem de vitalidade foram de 52,48% e de 47,17% (eosina-nigrosina, $< 0,001$) e de 57,11% e 40,38% (IP/SYBR14, $P < 0,05$), respectivamente para o Grupo F e para o Grupo SubF. Na época de reprodução, os valores obtidos foram de 72,10% e de 57,05% (eosina-nigrosina, $P < 0,001$) e de 65,90%

e 52,32% (IP/SYBR14, $P<0,05$), respectivamente para o grupo Grupo F e para o grupo Grupo subF. Os dois métodos de avaliação apresentaram correlação significativa ($P<0,001$) tanto para a generalidade dos dados ($r=0,76$) como para os grupos de fertilidade ($r=0,72$ e $r=0,72$, respectivamente para o Grupo F e o Grupo subF).

Tabela 7.1. ANOVA da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática em função dos fatores em análise.

	Variável dependente					Variável dependente	
	Eosina-nigrosina		IP/SYBR14			HOST+	
	gl	QM	gl	QM		gl	QM
Época do ano	1767,112	***	2948,468	***	Fertilidade	5915,240	***
Fertilidade	8232,834	***	8903,463	***	Animal	2769,710	***
Animal	6505,797	***	6428,947	***	Erro	82	
Erro	192	216,180	192		Total	84	
Total	198	182,626	198				

Nota: *** - Altamente significativo ($P<0,001$).

Durante a época de reprodução avaliou-se, ainda, a integridade funcional da MP com recurso ao teste hipo-osmótico (HOS) em 84 ejaculados obtidos de 7 garanhões. Os efeitos dos fatores *fertilidade* (QM=5915,240, gl=84, $P<0,001$) e *indivíduo* (QM=2769,710, gl=84, $P<0,001$) influenciaram a proporção de espermatozóides com resposta positiva ao teste (HOS⁺), evidenciando-se superior qualidade do plasmalema (HOS⁺, $P<0,001$) nos espermatozóides dos animais férteis (74,41% contra 41,23%, respectivamente para os grupos F e subF). A osmolaridade medida no PS, de PSL e Sorraia, apresentou valores dentro da mesma ordem de grandeza (entre 300-320mOsm).

ii. INTEGRIDADE DO ACROSSOMA

No capítulo 5 evidenciou-se a melhoria da qualidade do acrossoma com o avançar da época de reprodução, sendo essa qualidade superior nos animais sem problemas de fertilidade. Neste estudo, as médias (MMQ's) da integridade acrossómica encontradas foram de 69,52% e 65,34% (contra-estação, $P>0,05$) e de 80,85% e 73,04% (época de reprodução, $P<0,05$), para o Grupo F e para o Grupo subF, respectivamente.

iii. ESTABILIDADE DOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA

Quando os SPZ foram marcados com a M540, foi possível observar os padrões de marcação descritos na literatura, tanto em SPZ imóveis como móveis. Assim, a fluorescência vermelha intensa emitida pela M540 (M540⁺) foi observada fundamentalmente na porção apical da região da cabeça e na peça intermédia, regiões estas onde se observou marcação com ao BODIPY®581/591C₁₁. A aplicação da M540 permitiu distinguir quatro populações de células: SPZ móveis M540⁺, SPZ móveis M540⁻, SPZ imóveis M540⁺ e SPZ imóveis M540⁻ (*vide* Figura 7.8).

Considerando, simultaneamente, a mobilidade e a estabilidade dos fosfolípidos de membrana verificou-se que durante Setembro a Dezembro as amostras apresentavam maior percentagem de SPZ imóveis com membranas instáveis (46,23% SPZ imóveis M540⁺ contra 26,74% SPZ móveis M540⁻) ao passo que durante a época de reprodução a maior parte dos SPZ móveis apresentavam membranas estáveis (46,69% e 44,33% de SPZ móveis M540⁻ contra 39,23% e 33,46% de SPZ móveis M540⁺, respectivamente para os períodos de Janeiro a Março e de Março a Maio).

Apesar da estabilidade dos fosfolípidos de membrana ter aumentado com o fotoperíodo, o fator *época do ano* não afectou o percentual de espermatozóides com fosfolípidos de membrana estáveis observados no conjunto dos ejaculados analisados. Pelo contrário, este parâmetro espermático parece ser fortemente influenciado pelos fatores *indivíduo* ($P < 0,001$) e *fertilidade* ($P < 0,05$) (*vide* Figura 7.8, tabela da ANOVA). As médias (MMQ's) da percentagem de células com membranas estáveis (M540⁻) foram de 54,67% e de 63,48% ($P > 0,05$), respectivamente para a contra-estação e a época de reprodução. Atentando à *fertilidade* observou-se, na contra-estação, valores médios (MMQ's) da percentagem de células M540⁻ de 50,05% e 53,08% ($P > 0,05$), respectivamente para o Grupo F e o Grupo subF; já na época de reprodução, os valores obtidos foram de 69,17% para o Grupo F e de 56,13% ($P < 0,05$) no Grupo subF. Um aumento na desordem dos fosfolípidos de membrana foi reportado, em equinos (RHATI *et al.*, 2001), como estando associado ao fenómeno da capacitação espermática. Contudo, trabalhos de MURATORI *et al.* (2004) contradizem esta observação ao afirmarem que a marcação de SPZ de humanos com a M540 não está associada à capacitação.

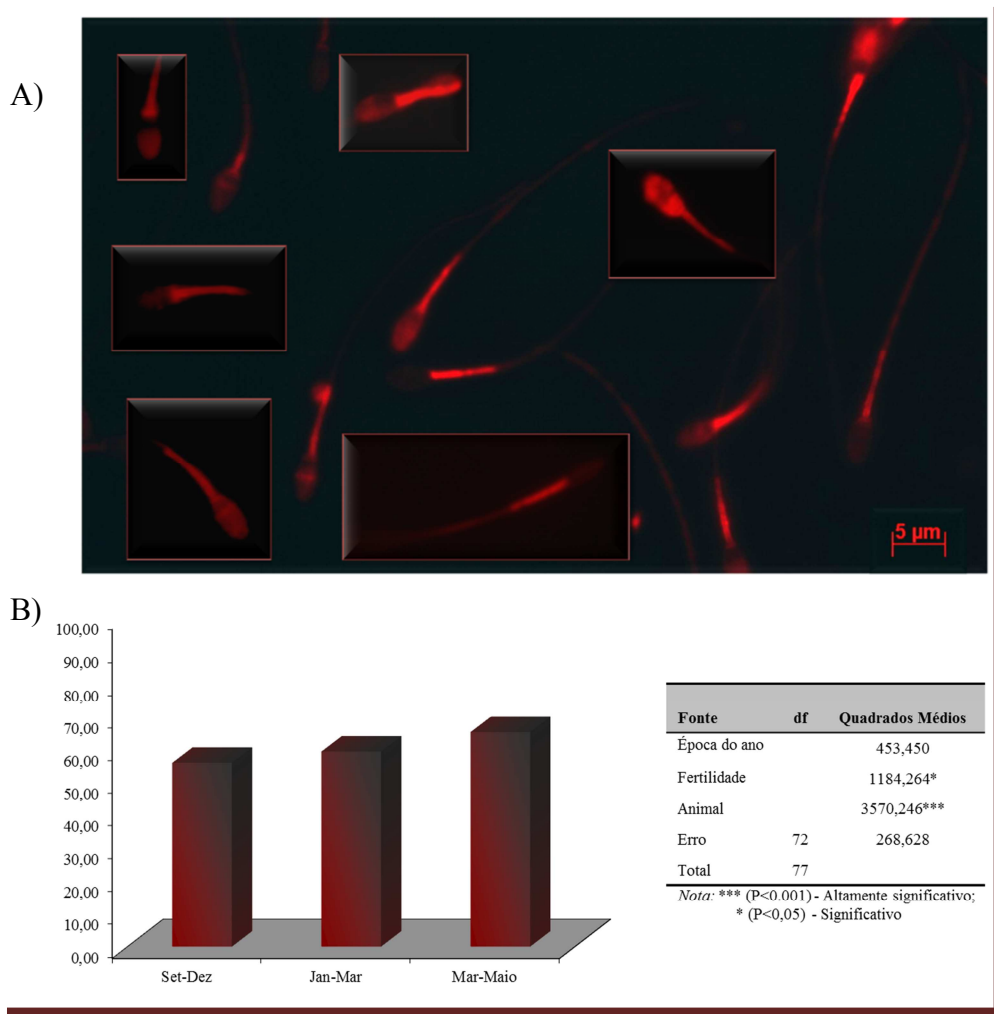


Figura 7.8. Marcação dos espermatozoides com a M540.

A) A instabilidade dos fosfolípidos de membrana foi observada fundamentalmente ao nível do acrossoma e da peça intermédia B) As barras representam os valores médios (MMQ's) que se evidenciam no retângulo em destaque, da percentagem de células evidenciando membranas estáveis (M540-) nos ejaculados recolhidos entre Setembro e Dezembro (Set-Dez), Janeiro a 21 de Março (Jan-Mar) e 22 de Março a meados de Maio (Mar-Maio) (n=77). Abaixo, em letra minúscula (a) encontra-se o resultado do teste de diferença entre as médias sendo que médias a que correspondem letras iguais, não diferem entre si (P<0,05). Na tabela consta o resultado da ANOVA em função dos factores em análise.

7.3.2.2.2. INTEGRIDADE DO ADN

Dos fatores em análise, a época do ano e o animal influíram significativamente (P<0,001) sobre o percentual de espermatozoides com danos no ADN enquanto o fator fertilidade se apresentou possivelmente significativo (P<0,1) (vide Figura 7.9). As médias (MMQ's) da percentagem de células com danos no ADN (TUNEL+) foram de

4,52% e de 4,17% ($P>0,05$), respectivamente para a contra-estação e a época de reprodução. Considerando os grupos de fertilidade, na contra-estação, as médias (MMQ's) da percentagem de células com danos no ADN (TUNEL+) foram de 3,75% e 6,45% ($P>0,05$) para o Grupo F ($n=40$) e Grupo SubF ($n=34$), respectivamente; já na época de reprodução, os valores obtidos foram de 3,85% e 4,36% ($P<0,05$) para o Grupo F ($n=168$) e o Grupo SubF ($n=88$), respectivamente.

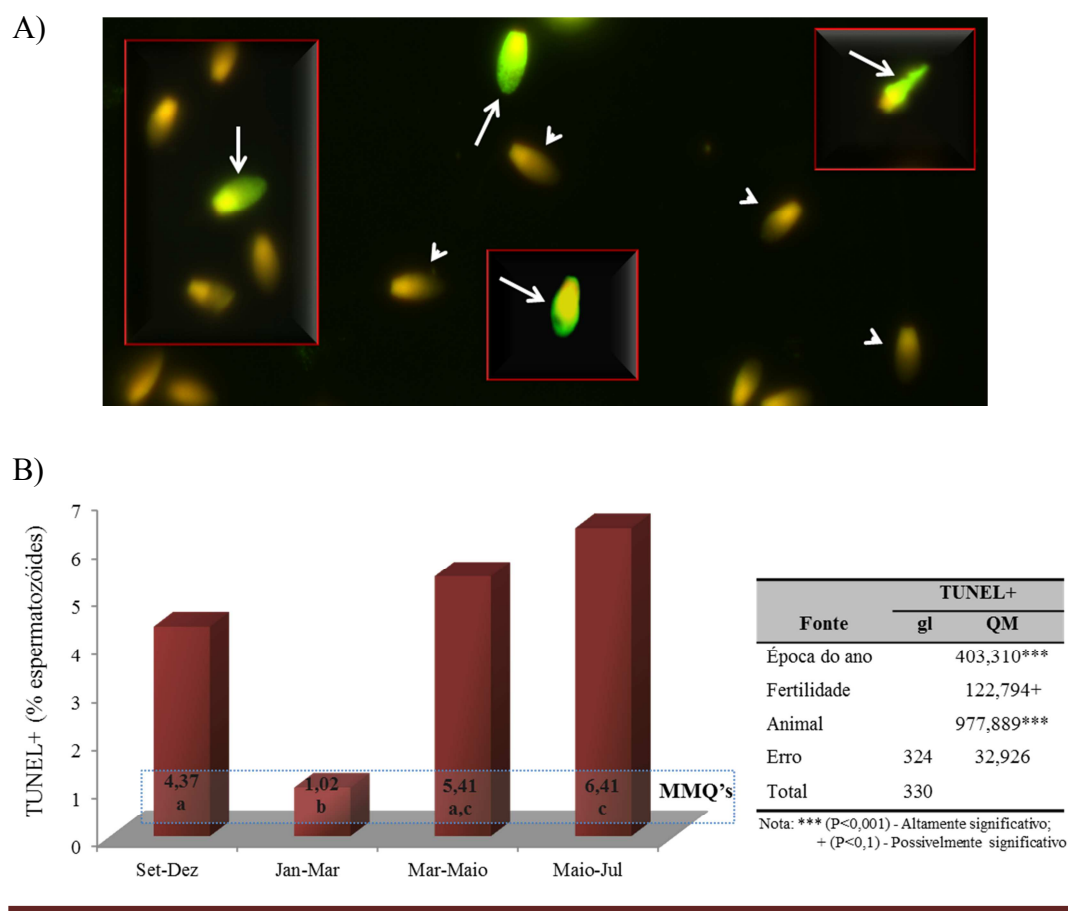


Figure 7.9. Teste TUNEL aplicado aos SPZ equinos.

- A) A marcação com o TUNEL permitiu distinguir, na mesma amostra, espermatozóides com (seta; TUNEL+) e sem danos (ponta da seta; TUNEL-) no ADN. Os núcleos foram marcados com IP.
- B) As barras representam os valores médios (MMQ's, que se evidenciam no rectângulo em destaque) da percentagem de células TUNEL+ nos ejaculados recolhidos entre Setembro e Dezembro (Set-Dez), Janeiro a 21 de Março (Jan-Mar), 22 de Março a meados de Maio (Mar-Maio) e finais de Maio a Julho (Maio-Jul) ($n=330$). Abaixo, em letras minúsculas (a,b,c) encontra-se o resultado do teste de diferença entre as médias sendo que médias a que correspondem letras diferentes, diferem entre si ($P<0,05$). Na tabela consta o resultado da ANOVA em função da época do ano, da fertilidade e do animal.

7.3.3. RELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS

7.3.3.1. INTEGRIDADE ESTRUTURAL vs. INTEGRIDADE FUNCIONAL

Os resultados obtidos com o método do teste hipo-osmótico (HOS) foram comparados, quer com o método da eosina-nigrosina, quer com o do IP/SYBR14, pela metodologia descrita por BLAND e ALTMAN (1986). O viés (d , diferença entre dois métodos) foi calculado e determinaram-se os limites de concordância ($LC = d \pm 1,96SD$) para um intervalo de confiança (IC) a 95%. A hipótese do viés ser ou não igual a zero foi testada por um teste *t-student* para amostras emparelhadas. O teste HOS apresentou-se mais homogêneo na medida em que o desvio padrão foi menor do que nos métodos de exclusão (*vide* histogramas da figura 7.10). Apesar de mais de 95% das diferenças entre os métodos se encontrarem dentro dos LC, as médias das diferenças apresentaram-se significativamente diferentes do valor zero (Tabela 7.2).

Tabela 7.2. Método de BLAND e ALTMAN aplicado aos testes de integridade e funcionalidade da membrana citoplasmática

Parâmetro	N	Média	r	teste <i>t-student</i>			
				Média das diferenças	IC	t	Sig.
Eosina HOST+ (%)	94	58,73	0,45	12,29]8,17 ; 16,41[5,926	P<0,001
IP/SYBR14 HOST+ (%)	54	52,50	0,23	24,04]19,73 ; 28,33[11,21	P<0,001
	54	76,53					

As diferenças entre os métodos tendem a diminuir com o aumento do valor da média entre os métodos sugerindo uma relação do tipo linear entre as variáveis (*vide* Figura 7.10). A análise de correlação (método dos mínimos quadrados) entre as diferenças e as médias dos métodos ditou coeficientes de correlação (r) de 0,45 e 0,23, valores muito diferentes de zero, o que insinua que as diferenças entre as variáveis dependem do tamanho da medida. Os resultados sugerem que algumas células que são marcadas como mortas com a eosina ou com o IP possuem membranas funcionais, capazes de se comportarem como osmómetros ideais. Assim, o teste hipo-osmótico parece medir propriedades diferentes das dos métodos de exclusão de corantes.

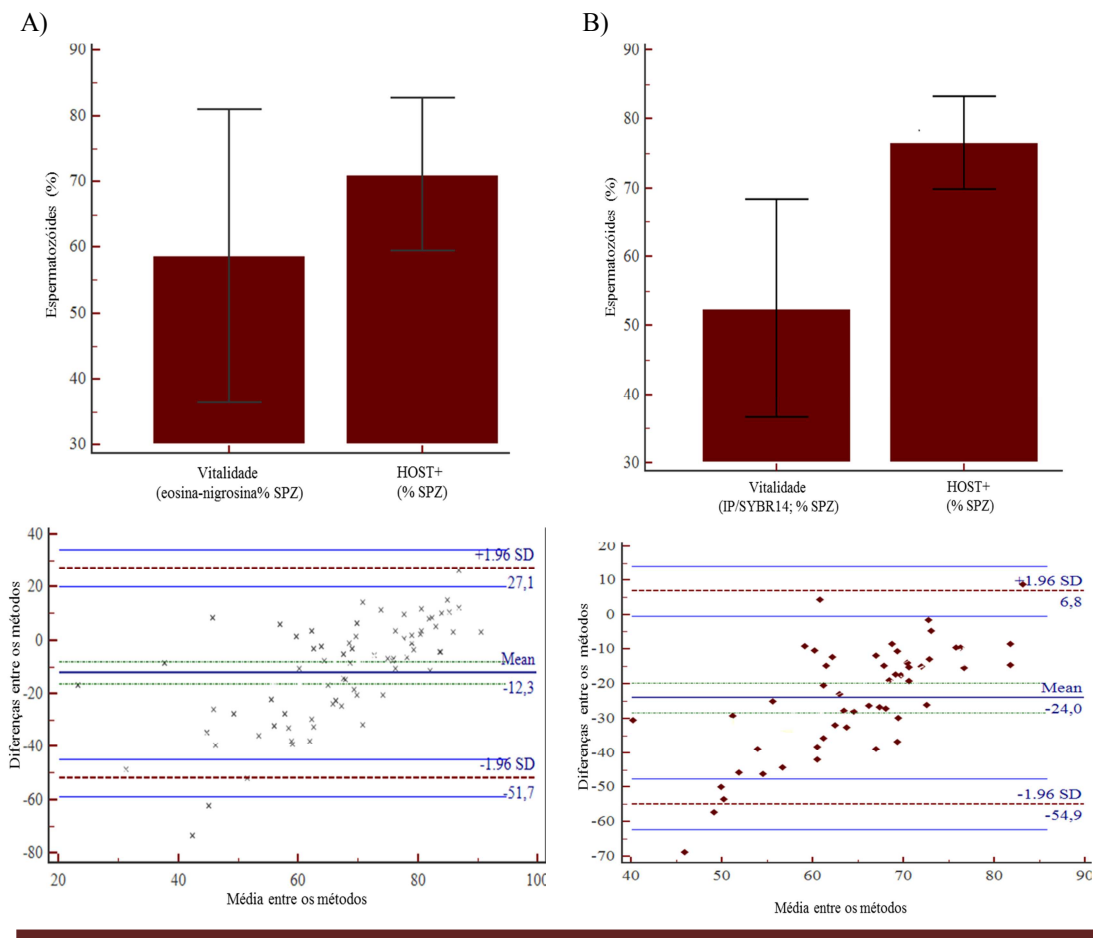


Figure 7.10. Teste hipo-osmótico (HOS) e vitalidade espermática acedida pelos métodos da eosina-nigrosina (A) e do IP/SYBR14 (B).

Nos histogramas, as barras representam os valores médios obtidos para cada um dos testes. Os gráficos de Bland e Altman encontram-se abaixo dos histogramas. Nesta representação gráfica as diferenças entre os dois métodos são representadas contra a média das duas técnicas. É possível visualizar o viés (o quanto as diferenças se afastam do valor zero), o erro (a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média) e os 'outliers'. As linhas horizontais (-----), acima e abaixo do valor médio, representam os limites de concordância (LC), definidos como sendo iguais a $d \pm 1.96SD$. As retas acima e abaixo do valor médio e dos LC representam os intervalos de confiança (IC) a 95%.

Quando se compararam os resultados da vitalidade (coloração da eosina-nigrosina) com os da M540 verificou-se uma concordância entre os dois métodos de avaliação de membranas. A média das diferenças entre os métodos (2,70; $gl=76$) não se apresentou estatisticamente significativa ($t=1,184$; $P=0,2401$), com um I.C.. a 95% de $[-1,777; 6,986]$. Apesar de os limites de concordância ($d \pm 1,96SD$) se situarem entre -40,4 e +35,2, contêm 94% das observações (72/77). A distribuição espacial dos pontos no gráfico de Bland e Altman não mostrou relação entre as diferenças e as médias das

medidas, (*vide* Figura 7.11) donde o viés é sistemático sugerindo que os dois métodos medem propriedades semelhantes das células. Estes resultados vão de encontro ao referido por MURATORI *et al.* (2004) que constataram que a M540 marca SPZ com membranas em estados iniciais de degeneração assim como células mortas.

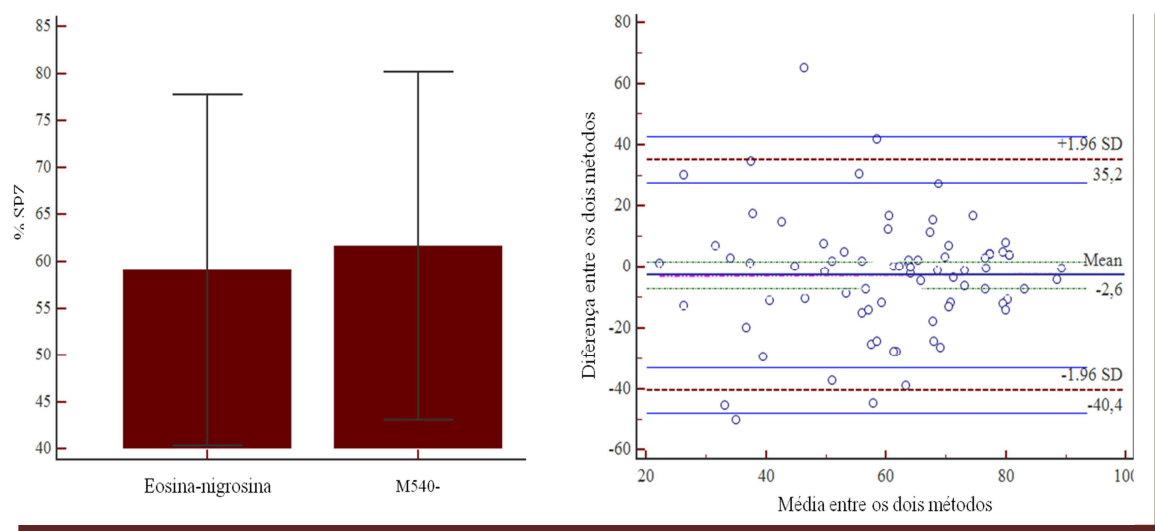


Figure 7.11. Vitalidade espermática acedida pelo método da eosina-nigrosina e estabilidade dos fosfolípidos de membrana (M540)

Nos histogramas, as barras representam os valores médios obtidos para cada um dos testes. O gráfico de Bland e Altman encontra-se ao lado dos histogramas. Nesta representação gráfica as diferenças entre os dois métodos são representadas contra a média das duas técnicas. É possível visualizar o viés (o quanto as diferenças se afastam do valor zero), o erro (a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média) e os 'outliers'. As linhas horizontais (-----), acima e abaixo do valor médio, representam os limites de concordância (LC), definidos como sendo iguais a $d \pm 1.96SD$. As retas acima e abaixo do valor médio e dos LC representam os intervalos de confiança (IC) a 95%.

7.3.3.2. MODULAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS

Para a generalidade dos indivíduos, avaliou-se a intensidade e a direção da associação entre os parâmetros avaliados no esperma, não só ao longo de todo o ano mas também na contra-estação e na época de reprodução. Os coeficientes de correlação encontrados encontram-se nas tabelas 7.3 e 7.4. Para a época de reprodução, modularam-se relações entre os parâmetros qualitativos do esperma e os parâmetros funcionais. Os modelos obtidos com significância bastante para prever o valor da variável dependente em função da variável preditora encontram-se na tabela 7.5.

Tabela 7.3. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre os diversos parâmetros observados no esperma

Parâmetros	Época	PMS	vitalidade	Morfologia anormal	AI	HOST+
$\uparrow\Delta\Psi_{mit}$	Anual	0,165*	0,404***	-0,379***	0,461***	----
	Reprodução	NS	0,247**	-0,219**	0,284***	NS
	Contra-estação	0,375**	0,295*	-0,294*	0,362*	----
$\downarrow\Delta\Psi_{mit}$	Anual	-0,164*	-0,413***	0,324***	-0,342***	----
	Reprodução	NS	-0,265***	0,166*	NS	NS
	Contra-estação	NS	NS	NS	NS	----
TBARS _{SPZ}	Anual	NS	NS	-0,161***	NS	----
	Reprodução	NS	NS	-0,153***	0,177*	NS
	Contra-estação	NS	NS	-0,260*	NS	----
TBARS _{PS}	Anual	-0,268***	NS	0,215***	NS	----
	Reprodução	-0,324***	NS	0,231***	NS	NS
	Contra-estação	NS	NS	0,257*	NS	----
M540-	Anual	0,299**	0,496***	-0,336**	0,567***	----
	Reprodução	0,309*	0,423***	-0,370**	0,483***	NS
	Contra-estação	NS	NS	NS	0,545*	----
TUNEL+	Anual	NS	-0,228***	0,123*	-0,211***	----
	Reprodução	NS	-0,290***	0,140*	-0,232***	NS
	Contra-estação	NS	NS	NS	NS	----
HOST+	Reprodução	0,405***	NS	-0,593***	0,449***	NS

Nota: ***-Altamente significativo (P<0.001); **-Bastante significativo (P<0.01); *-Significativo (P<0.05)

Tabela 7.4. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre os diversos parâmetros observados no esperma

		TBARS _{SPZ}	TBARS _{PS}	M540-	TUNEL+
$\uparrow\Delta\Psi_{mit}$	Anual	NS	NS	0,269*	-0,245**
	Reprodução	0,477***	NS	NS	NS
	Contra-estação	NS	NS	0,531*	NS
$\downarrow\Delta\Psi_{mit}$	Anual	NS	NS	NS	0,245**
	Reprodução	-0,443**	NS	NS	NS
	Contra-estação	NS	NS	NS	NS
TBARS _{SPZ}	Anual		0,097*	NS	NS
	Reprodução		NS	NS	NS
	Contra-estação		NS	NS	NS
TBARS _{PS}	Anual			NS	NS
	Reprodução			-0,300*	NS
	Contra-estação			NS	NS
M540-	Anual				NS
	Reprodução				NS
	Contra-estação				NS

Nota: ***-Altamente significativo (P<0.001); *-Significativo (P<0.05)

Tabela 7.5. Modelos de regressão obtidos na modulação das características espermáticas monitoradas durante a época de reprodução

		r	Modelo				Parâmetros			
			R ² _{ai}	F	gl1	gl2	Constante	b1	b2	b3
PMS	TBARSPS	0,26	0,045*	2,80	1	112	38,44	90,341	-652,55	871,13
	M540-	0,28	0,063*	4,88	1	57	22,31	0,007		
Vitalidade	↑ΔΨmit	0,20	0,034*	6,30	1	149	50,29	0,243		
	↓ΔΨmit	0,23	0,044**	7,94	1	149	74,80	-0,297		
	M540-	0,45	0,176***	7,39	1	60	52,54	-0,243	0,01	
	TUNEL ⁻	0,18	0,024*	4,68	1	148	-4,72	0,674		
Morfologia normal	↑ΔΨmit	0,21	0,038**	7,12	1	153	57,91	0,241		
	M540-	0,37	0,124**	9,05	1	57	39,42	0,395		
AI	↑ΔΨmit	0,38	0,129***	8,13	1	144	12,59	-2,041	0,05	0,00
	↓ΔΨmit	0,27	0,051*	3,60	1	144	77,23	0,558	-0,02	6,2E-5
	TBARSPS	0,32	0,089***	8,47	1	153	69,04	25,188	-43,36	
	TBARSPZ	0,21	0,031*	3,46	1	153	67,52	21,170	-9,30	
TUNEL ⁺	TBARSPS	0,32	0,080**	4,53	1	121	6,08	-42,341	160,14	-124,03

Nota: *** - P<0,001 - Altamente significativo; ** - P<0,01 – Bastante significativo; * - P<0,05 – Significativo

Os coeficientes de correlação encontrados para cada grupo, durante a época de reprodução, encontram-se na tabela 7.6.

Tabela 7.6. Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre os diversos parâmetros observados no esperma para o Grupo F e o Grupo Sub-F.

Parâmetros	GRUPO	↑ΔΨmit	↓ΔΨmit	TBARSPZ	TBARSPS	HOST+	TUNEL+
PMS	F	NS	NS	NS	NS	NS	-0,268***
	SubF	-0,291*	0,360*	NS	-0,344***	NS	NS
Vitalidade	F	0,233*	-0,248*	NS	NS	NS	-0,333***
	SubF	NS	NS	NS	NS	0,394*	-0,393***
Morfologia anormal	F	NS	NS	-0,150*	NS	-0,505***	0,195*
	SubF	NS	NS	NS	0,333***	NS	NS
AI	F	0,269**	NS	NS	NS	NS	-0,244**
	SubF	0,310*	NS	NS	-0,289*	NS	-0,239*
TUNEL+	F	NS	NS	NS	NS		----
	SubF	NS	NS	NS	0,330*		----
TBARSPZ	F	0,381*	-0,373*	----			NS
	SubF	NS	NS	----			NS

Nota: ***-Altamente significativo (P<0.001); **-Bastante significativo (P<0.01); *-Significativo (P<0.05)

Apesar de se ter observado uma melhoria significativa da percentagem de células expressando $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ durante a época de reprodução nos dois grupos de animais, este parâmetro não se relacionou com a mobilidade espermática. Por outro lado, no Grupo SubF e somente durante a época de reprodução, o $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ correlacionou-se negativamente com a mobilidade ($r=-0,291$, $P<0,05$, $n=48$) enquanto o $\downarrow\Delta\Psi_{mit}$ se correlacionou positivamente ($r=0,360$, $P<0,05$, $n=48$). Este grupo de animais sub-férteis era maioritariamente constituído por cavalos Sorraia cujos ejaculados, como referido anteriormente, apresentaram mobilidade espermática baixa. Acresce ainda que, para esta raça, encontrámos níveis de açúcares redutores (em termos de D-glicose) no plasma seminal significativamente superiores aos dos PSL (1,216 mg/L contra 0,853 mg/L) sem que se observasse qualquer relação com os outros parâmetros avaliados nas células. Tomadas em conjunto, estas observações vão de encontro ao sugerido por alguns autores que consideram não ser a produção mitocondrial de ATP necessária para sustentar a mobilidade espermática, na presença de glicose (*vide* FORD, 2006 e HUNG *et al.*, 2008, para revisão).

A cadeia respiratória mitocondrial tem sido apontada como uma fonte de ROS nas células, com pelo menos oito locais conhecidos capazes de gerarem o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), sendo a quantidade de ROS que a mitocôndria não é capaz de remover emitida pelo organelo (sob a forma de H_2O_2), independentemente do $\Delta\Psi_{mit}$ dos SPZ (*vide* ANDREYEV, KUSHNAREVA e STARKOV, 2007, para revisão). Dependendo do local da mitocôndria onde é produzido $O_2^{\bullet-}$, assim se observarão, ou não, danos celulares (KOPPERS *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos com o JC-1 mostraram que somente no Grupo F e para a época de reprodução, o $\Delta\Psi_{mit}$ apresentou correlação com os TBARS_{SPZ} ($r=0,381$, $P<0,05$, $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ e $r=-0,373$, $P<0,05$, $\downarrow\Delta\Psi_{mit}$) sugerindo que a atividade das mitocôndrias gera radicais livres de oxigénio sem que os níveis dos mesmos resultem em danos para a funcionalidade dos espermatozóides deste grupo de animais. Este considerando parece ser apoiado pelo facto de, para a generalidade dos dados, a vitalidade, o AI, a M540- e o TUNEL- se correlacionaram positivamente com o $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ e negativamente com o $\downarrow\Delta\Psi_{mit}$ (*vide* Tabelas 7.3 e 7.4). Acresce, ainda, o facto de o $\Delta\Psi_{mit}$ ter apresentado, na época de reprodução, correlação com a vitalidade ($r=0,233$, $P<0,05$, $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$; $r=-0,248$, $P<0,05$, $\downarrow\Delta\Psi_{mit}$, $n=104$) e com o AI ($r=0,269$, $P<0,01$, $n=100$, $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$) no Grupo F e com o AI no

Grupo subF ($r=0,310$, $P<0,05$, $n=45$, $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$) e de se terem encontrado funções regressivas capazes de prever a vitalidade e a integridade do acrossoma em função do $\Delta\Psi_{mit}$.

Os estudos de BAUMBER *et al.* (2002) e NEILD *et al.* (2005) sugerem que os espermatozoides equinos são mais resistentes à peroxidação dos lípidos de membrana do que os SPZ de outras espécies pecuárias. Durante a época de reprodução, e para a generalidade dos animais, os níveis de TBARS_{SPZ} não apresentaram relação com a mobilidade, a vitalidade, a estabilidade dos fosfolípidos de membrana nem com a fragmentação do ADN; a correlação positiva e significativa observada com o AI assim como a função regressiva encontrada, parecem traduzir níveis fisiológicos de ROS que, de acordo com alguns autores, estão implicados na fisiologia do espermatozoide (*vide* de LAMIRANDE *et al.*, 1997, para revisão). Curiosamente, num estudo anterior, onde se avaliaram os níveis de peroxidação de proteínas nas duas fracções do esperma, observámos elevados níveis de oxidação proteica no esperma dos animais férteis, durante a época de reprodução, níveis esses que se correlacionaram positivamente ($P<0,05$) com a mobilidade e a vitalidade espermáticas (MORTE *et al.*, 2008). Já no Grupo subF, observou-se correlação entre os níveis de TBARS_{PS} e os parâmetros espermáticos mobilidade ($r=-0,344$, $P<0,001$, $n=168$), integridade do acrossoma ($r=-0,289$, $P<0,05$, $n=56$) e o TUNEL+ ($r=0,330$, $P<0,05$, $n=38$) resultados estes que estão de acordo com o observado por outros autores (*vide* BANSAL e BILASPURI, 2010, para revisão) e que sugerem um efeito deletério do *stresse* oxidativo no plasma seminal neste grupo de animais.

Para a generalidade dos dados, as correlações observadas para a percentagem de SPZ com alterações morfológicas com os outros parâmetros avaliados sugerem que, nestas células, a função respiratória mitocondrial ($\Delta\Psi_{mit}$) se encontra afectada, assim como a estabilidade (M540) e funcionalidade do plasmalema (HOST+) e a integridade do ADN (TUNEL+; *vide* Tabela 7.3). MURATORI *et al.* (2004) já haviam notado, em humanos, que os SPZ marcados com M540 apresentavam fraca mobilidade e morfologia anormal. Em touros, HALLAP *et al.* (2004) observaram correlações positivas significativas entre a estabilidade da membrana plasmática (M540-) e os parâmetros seminais mobilidade, morfologia normal na região da cabeça e integridade do plasmalema ($P<0,01$).

Alguns autores atribuem, ainda, elevados níveis de ROS no esperma à presença de SPZ anormais (KOPPERS *et al.*, 2008). Neste trabalho, verificámos que as alterações na

morfologia normal apresentaram correlação com os níveis de TBARS nas duas fracções do esperma. Contudo, no Grupo F e durante a época de reprodução, a correlação observada foi negativa com os TBARS_{SPZ} ($r=-0,150$, $P<0,05$, $n=200$) e no Grupo SubF apresentou-se positiva mas com os TBARS_{PS} ($r=0,333$, $P<0,001$, $n=164$). Contudo, não se encontrou nenhuma função regressiva com significância bastante para explicar a relação entre a morfologia anormal e a peroxidação lipídica sugerindo que a associação observada poderá ser meramente casual, o que contrariará resultados de outros autores (KOPPERS *et al.*, 2008). As funções regressivas encontradas permitiram identificar o nível de peroxidação lipídica no PS (TBARS_{PS}) como preditor significativo da mobilidade espermática ($P<0,05$), da integridade do acrossoma (AI; $P<0,001$) e dos danos ao ADN (TUNEL+; $P<0,01$).

Os danos no ADN apresentaram, no Grupo F, correlação com a mobilidade ($r=-0,268$, $P<0,001$, $n=168$), a vitalidade ($r=-0,333$, $P<0,001$, $n=168$), a % de SPZ anormais ($r=0,195$, $P<0,05$, $n=164$) e o AI ($r=-0,244$, $P<0,01$, $n=128$); e no Grupo SubF, com a vitalidade ($r=-0,393$, $P<0,001$, $n=88$) e AI ($r=-0,239$, $P<0,05$, $n=74$). As correlações negativas entre os danos na cromatina e a vitalidade sugerem morte celular, tendo-se encontrado uma função regressiva capaz de prever a vitalidade em função da marcação com o TUNEL⁺ (*vide* tabela 7.5). Contudo, não é possível dizer se a marcação com o TUNEL traduz, ou não, morte por apoptose. No Grupo SubF, caracterizado por uma elevada percentagem de células com alterações morfológicas, não se observou relação entre a marcação com o TUNEL e a morfologia espermática. Este parâmetro seminal só apresentou modulação pelos parâmetros funcionais $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ e $M540^-$.

Durante a época de reprodução, a resposta positiva ao teste HOS correlacionou-se negativamente com os SPZ anormais ($r=-0,505$, $P<0,001$, $n=40$), no Grupo F e com a vitalidade ($r=0,394$, $P<0,05$, $n=36$) no grupo SubF. NEILD *et al.* (1999) também obtiveram fracos valores de correlação entre a vitalidade e o teste HOS aplicado aos SPZ equinos sendo que animais de fertilidade duvidosa apresentaram ejaculados com menos de 40% de SPZ com resposta positiva ao teste (NEILD *et al.*, 2000). Neste estudo, o teste hiposmótico não se apresentou como preditor de nenhum dos parâmetros sumários do espermograma o que parece consistente com o facto de este teste parecer medir propriedades distintas dos testes de integridade de membrana, conforme vimos acima.

7.3.3.3. MARCAÇÃO TRIPLA IP/PSA-FITC/JC-1

Tendo em conta as relações obtidas entre os parâmetros espermáticos estruturais e funcionais, e uma vez que a tecnologia disponível permite monitorizar, numa única célula, uma variedade de parâmetros, procurou implementar-se a técnica de marcação que associa, sobre a mesma alíquota de um ejaculado, o IP, o PSA-FITC e o JC-1 de forma a observar-se, em simultâneo a integridade das membranas plasmática e acrossomal e a função mitocondrial dos espermatozóides no sémen em natureza. Os dados obtidos foram analisados segundo o método de Bland e Altman (*vide* Tabela 7.7). Com esta metodologia foi possível observar 12 populações de células sendo que a população predominante (44,61%) se caracterizou por apresentar células vivas (ausência de marcação com o iodeto de propídio, IP-), com acrossomas intactos (PSA-, ausência de marcação com o PSA/FITC) e com elevado potencial de membrana mitocondrial (JC-1+) (*vide* Figura 7.12).

Tabela 7.7. Análise de concordância entre os métodos de marcação simples/dupla e a marcação tripla IP/PSA-FITC /JC-1

	PI/SYBR-14 vs. PI/ PSA-FITC /JC-1	PSA-FITC vs. PI/ PSA-FITC /JC-1	JC-1 vs. PI/ PSA- FITC /JC-1
Média das diferenças \bar{d}	-1,70	0,10	-0,54
SD das diferenças	7,27	8,80	12,76
Limite superior de concordância	12,84	17,71	24,99
Limite inferior de concordância	-16,25	-17,51	-26,06
Erro padrão da \bar{d}	1,40	1,69	2,46
Erro padrão dos limites de concordância	2,42	2,93	4,25
IC viés (95%)	-4,09 a 0,68	-2,79 a 2,99	-4,73 a 3,65
IC limite inferior de concordância (95%)	-20,39 a -12,11	-22,52 a -12,51	-33,32 a -18,81
IC limite superior de concordância (95%)	8,71 a 16,98	12,70 a 22,71	17,73 a 32,24

Técnicas que associam, sobre a mesma amostra, vários fluorocromos de forma a aceder, em simultâneo, a diferentes estruturas do SPZ foram validadas em ovinos (SUKARDI, CURRY e WATSON, 1997), suínos (de ANDRADE et al., 2007), bovinos (GRAHAM, KUNZE, e HAMMERSTEDT, 1990; NAGY *et al.*, 2003) e equinos (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Estes últimos autores avaliaram a integridade da MP (IP) e do acrossoma (PSA-FITC) e a função mitocondrial (JC-1), somente em espermatozóides sujeitos a congelação (-196°C) e não reportam a

existência de espermatozoides sem qualquer marcação com o JC-1, conforme observado neste estudo. As populações observadas por esses autores (8 populações) são coincidentes com as restantes populações que observamos. A existência de populações espermáticas caracterizadas por MP danificada (IP+), acrossoma intacto (PSA-)/danificado (PSA+) e $\uparrow\Delta\Psi_{mit}$ poderá traduzir diferentes graus de senescência dos SPZ. A presença de células com MP e acrossoma intactos, mas sem qualquer marcação com o JC-1, parece traduzir disfunção mitocondrial, que pode ter origem numa infinita variedade de fatores incluindo alterações na espermatogênese (*vide* RAJENDER, RAHUL e MAHDI, 2010, para revisão).

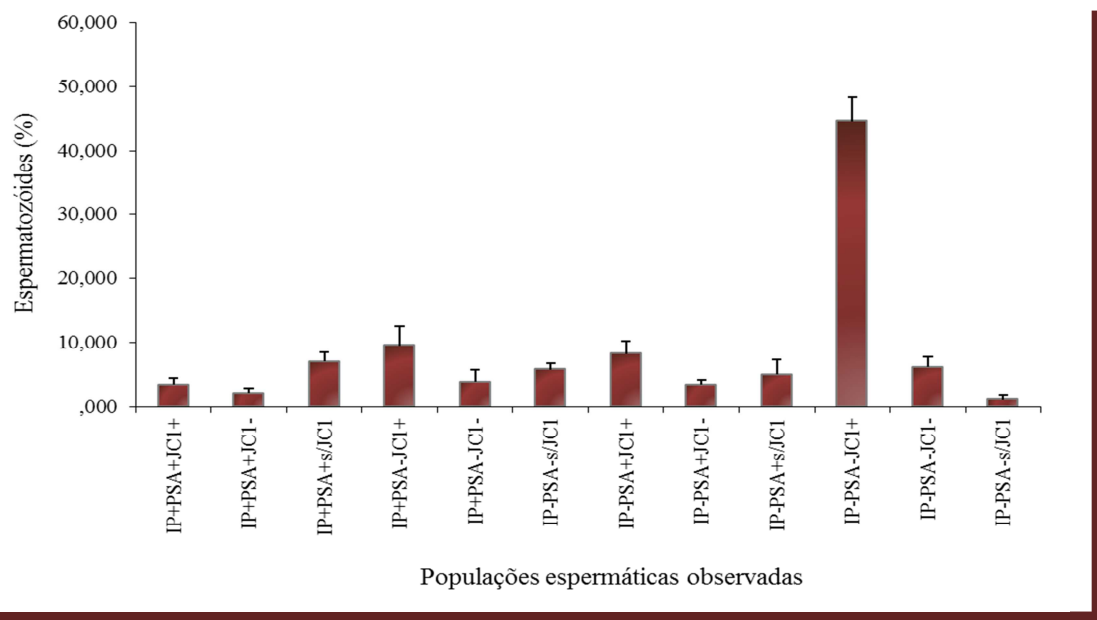


Figura 7.12. Populações espermáticas observadas com a marcação tripla.

As barras representam os valores médios. Com esta técnica, PSA significa acrossoma íntegro e PSA⁺ acrossoma reragido/danificado; IP⁺, marcação com o IP; IP⁻, sem marcação com o IP; JC-I⁺, elevado potencial de membrana mitocondrial ($\uparrow\Delta\Psi_{mit}$); JC-I⁻, baixo potencial de membrana mitocondrial ($\downarrow\Delta\Psi_{mit}$); s/JC-1, sem marcação com o JC-1.

De acordo com os resultados da nossa análise é possível afirmar que a marcação simultânea dos espermatozoides com os quimiossensores cromogêneos pode substituir com eficiência as marcações simples (JC-1 e PSA-FITC) e duplas (IP/SYBR14).

7.3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICA

As ROS podem causar danos ao ADN dos SPZ equinos (BAUMBER *et al.*, 2003a) sendo que o equilíbrio entre as espécies oxidantes e a capacidade de remoção do intermediário reactivo formado é fundamental para a boa qualidade espermática. Tendo em conta estes considerandos e as associações observadas durante a época de reprodução, para os dois grupos de fertilidade, entre o nível de peroxidação lipídica no esperma e os parâmetros PMS, morfologia, AI e TUNEL⁺, avaliou-se a atividade antioxidante total não enzimática em ejaculados (n=73) obtidos de 2 garanhões PSL (férteis) e 4 Sorraias (in(sub)férteis), durante os meses de Março a Julho.

Depois de definida a equação da reta necessária para o cálculo da Capacidade Antioxidante Equivalente Trolox (TEAC) nas amostras de esperma (conforme descrito nos Materiais e Métodos) determinou-se, tanto na fração líquida como na fração figurada do esperma, a extensão da descoloração dada em termos da % de inibição do radical ABTS, em cada um dos tempos de incubação e os TEACs foram calculados relativamente à reatividade do Trolox como padrão. As variações observadas ao longo do tempo para o TEAC nas duas fracções do esperma e para os grupos PSL e Sorraia encontram-se na figura 7.13.

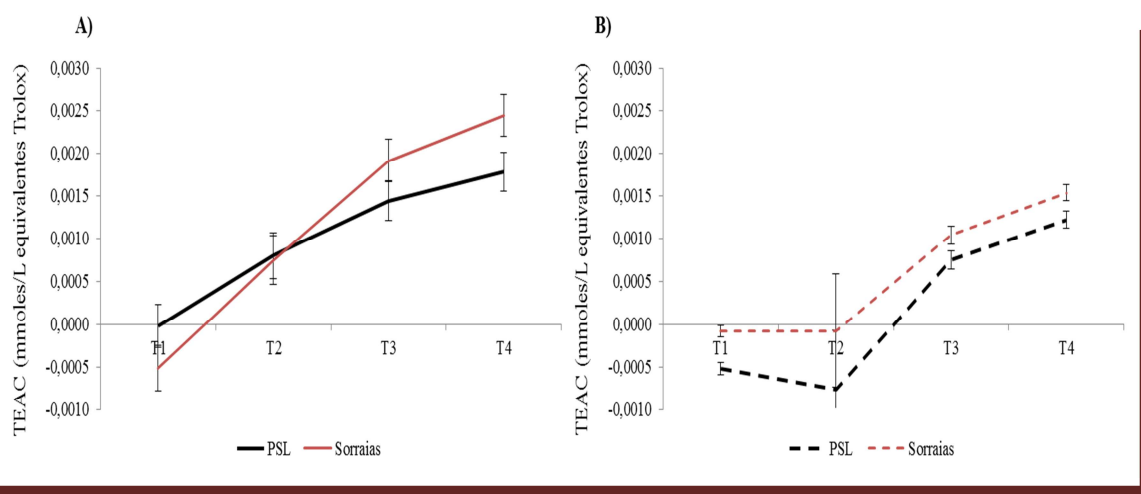


Figura 7.13. Capacidade antioxidante total não enzimática.

Resultados, expressos em termos de equivalentes Trolox (TEAC), observados na fração líquida (PS, gráfico A) e na fração figurada (SPZ, gráfico B) do esperma de animais PSL e Sorraia.

Conforme esperado, o plasma seminal (PS) apresentou superior capacidade antioxidante total não enzimática. Na fração figurada do esperma, a maior percentagem de inibição do radical ABTS observou-se entre os 13 e os 23 minutos de incubação enquanto no plasma seminal se situou entre os 3 e os 13 minutos de incubação, nos dois grupos de animais.

De acordo com a metodologia descrita por RHEMREV *et al.* (2000), os valores de TEAC calculados entre o momento T=3 e os limites superiores desses intervalos foram definidos como *Fast TRAP (Potential Antioxidant Reactive Total)* devido à contribuição de antioxidantes não enzimáticos que reagem rapidamente. O *Total TRAP* foi definido como o valor de TEAC resultante entre o momento T1 e T4 sendo o *Slow TRAP* (contribuição de antioxidantes não enzimáticos que reagem mais lentamente) definido pela diferença entre *Total TRAP* e *Fast TRAP*. O fator *animal* apresentou efeito significativo superior sobre os valores médios (MMQ's) do *Total TRAP* e do *Fast TRAP* nos espermatozóides ($P<0,001$) ao passo que o fator *fertilidade* influenciou sobre o *Fast TRAP* no plasma seminal ($P<0,05$) (Tabela 7.8).

Tabela 7.8. ANOVA do TRAP em função dos fatores em análise.

Fonte	Fast TRAP _{PS}		Total TRAP _{PS}		Slow TRAP _{PS}	
	gl	QM	gl	QM	gl	QM
Fertilidade		4,271E-6 *		1,088E-5 +		1,517E-6
Animal		2,395E-6		3,992E-6		2,030E-7 +
Erro	71	7,784E-7	71	2,983E-6	71	1,363E-6
Total	73		73		73	
Fonte	Fast TRAP _{SPZ}		Total TRAP _{SPZ}		Slow TRAP _{SPZ}	
	gl	QM	gl	QM	gl	QM
Fertilidade		1,238E-8		7,416E-9		6,331E-10
Animal		1,078E-5 ***		1,649E-5 ***		6,039E-7
Erro	60	9,074E-7	60	1,237E-6	60	2,416E-7
Total	63		63		63	

Nota: ***-Altamente significativo ($P<0,001$); *-Significativo ($P<0,05$); +- Possivelmente significativo ($P<0,1$)

Os resultados mostraram que a proteção contra o *stresse* oxidativo oferecida pelos antioxidantes de resposta lenta (*Slow TRAP*) é igual nas duas raças, nas duas fracções do esperma; já para os de resposta rápida (*Fast TRAP*) o plasma seminal oferece proteção superior nos animais Sorraia enquanto a correspondente aos espermatozóides

não difere entre os grupos (*vide* Tabela 7.8). Para este conjunto de dados, os níveis de TBARS medidos nos SPZ dos PSL (0,252 μ moles/mg proteína) foram superiores (mas não significativamente) aos dos Sorraias (0,182 μ moles /mg proteína); já os de TBARS_{PS} observados nestes últimos (1,080 μ moles /mg proteína) diferem significativamente ($P<0,05$) dos dos PSL (0,743 μ moles /mg proteína).

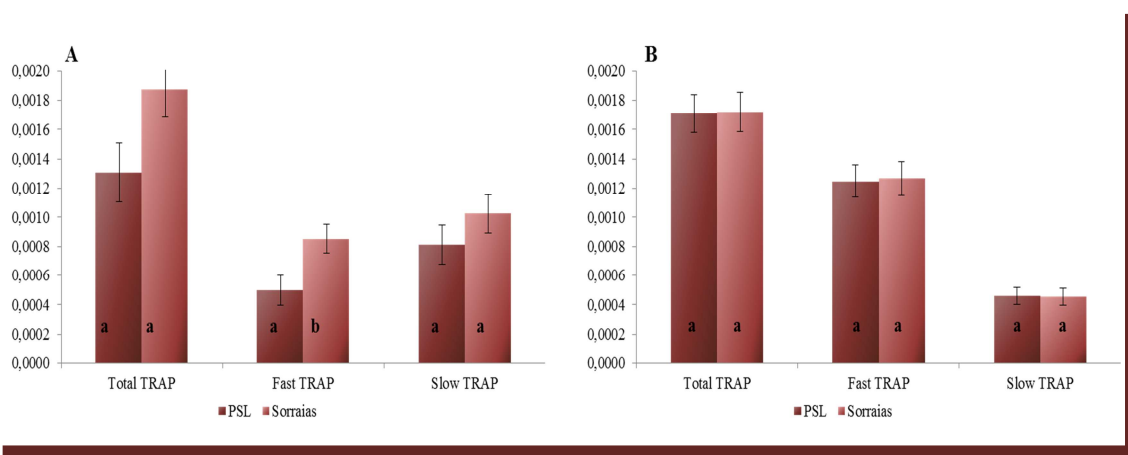


Figura 7.12. Capacidade antioxidante total não enzimática.

Resultados observados na fração líquida (PS, gráfico A) e na fração figurada (SPZ, gráfico B)) do esperma de animais PSL e Sorraia. Para cada fração do sêmen, letras diferentes (a, b) traduzem diferenças significativas entre grupos ($P<0,05$).

Na fração líquida do esperma, os níveis de TBARS e a proteção contra o *stresse* oxidativo oferecida pelos antioxidantes de resposta rápida (*Fast TRAP*) apresentam-se significativamente superiores na raça Sorraia. ZINI, GARRELS e PHANG (1996) já haviam observado a coexistência de bons níveis enzimáticos anti-oxidantes e elevadas produções de ROS no esperma de humanos sugerindo, não uma falha nos mecanismos de defesa, mas uma sobre-produção de ROS. Não nos é possível dizer se os níveis elevados de peroxidação lipídica presentes no PS do esperma de Sorraias resultaram da produção intrínseca de ROS, quer ao nível do complexo III da cadeia transportadora de electrões (KOPPERS *et al.*, 2008) quer por atividade da NOX 5, a NADPH oxidase específica da MP dos SPZ, já identificada em equinos (SABEUR e BALL, 2007).

Em condições normais, o esperma equino, nomeadamente de animais férteis, raramente apresenta leucócitos, fonte extrínseca de ROS no PS. Contudo, nunca observámos destas células no esperma dos garanhões Sorraia. Às gotas citoplasmáticas, presentes em

SPZ imaturos ejaculados, tem também sido atribuída função de produção de ROS uma vez que nos resíduos de citoplasma se encontra a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) enzima que, na via das pentoses monofosfato, catalisa a conversão de glucose-6-P a gluconolactona-6-P com produção de NADPH. Este, ao alimentar a actividade da NOX 5, poderá resultar na produção de ROS (TREMELLEN, 2008). Contudo, como vimos no capítulo 4, apesar de a % de spz com anomalias na PI no esperma de Sorraias ser superior à dos PSL, as gotas citoplasmáticas não predominaram nesta categoria.

Os valores médios observados para o TUNEL (ponto 7.3.2.2.2) são valores baixos e, apesar de se relacionarem com a vitalidade espermática, podem não traduzir morte celular por apoptose, o que se pode considerar coerente se tivermos em conta que a célula espermática é a guardiã e a mensageira da componente paternal do ADN do embrião. No entanto, durante o processo de remodelação da cromatina ocorrem, naturalmente, quebras nas cadeias que falham em ser reparadas durante a espermatogénese. Segundo alguns autores, o método do TUNEL para a detecção de quebras nas cadeias de ADN apresenta limitações porque não inclui um procedimento específico de extracção de protaminas e histonas, o que determina que a maior parte do ADN se mantém inacessível ao TdT. Segundo SHAMAN e WARD (2006), o único tipo de cromatina que estará acessível ao TdT será o correspondente às regiões de ligação entre os toróides. Atendendo a estes considerandos, algumas das amostras de esperma (n=27) obtidas durante uma época de reprodução, de 2 PSL e 2 Sorraia, foram ainda sujeitas ao teste da dispersão da cromatina (SCDT; *vide* Figura 7.13) em condições neutras, teste este considerado como capaz de evidenciar muito mais quebras nas cadeias de ADN.

As médias (MMQ's) produzidas para o SCDT revelaram-se significativamente diferentes (QM=6652,72; $P<0,001$) para as raças PSL (17,00% células com ADN fragmentado) e Sorraia (49,81%), valores estes muito superiores aos observados com o teste TUNEL [TUNEL+: 3,13% e 5,13%, respectivamente para PSL (n=84) e Sorraia (n=76)]. Não será de excluir aqui algum efeito do frio sobre a qualidade do ADN, uma vez que as amostras foram conservadas para posterior tratamento em simultâneo. De qualquer modo, os resultados mostram maior instabilidade/fragmentação no ADN dos SPZ dos Sorraia conforme o teste do TUNEL já havia mostrado para os Grupos F e SubF. Um coeficiente de correlação elevado e significativo ($r=0,583$, $P<0,01$) foi observado entre os valores do SCDT e as anomalias espermáticas com

sede na região da cabeça. Não foi observada qualquer relação entre os valores do SCDT e os níveis de peroxidação lipídica e de actividade antioxidante observados em qualquer das frações do esperma. No entanto, atente-se que o número de ejaculados sujeitos a esta metodologia foi inferior ao utilizado para a metodologia do TUNEL.

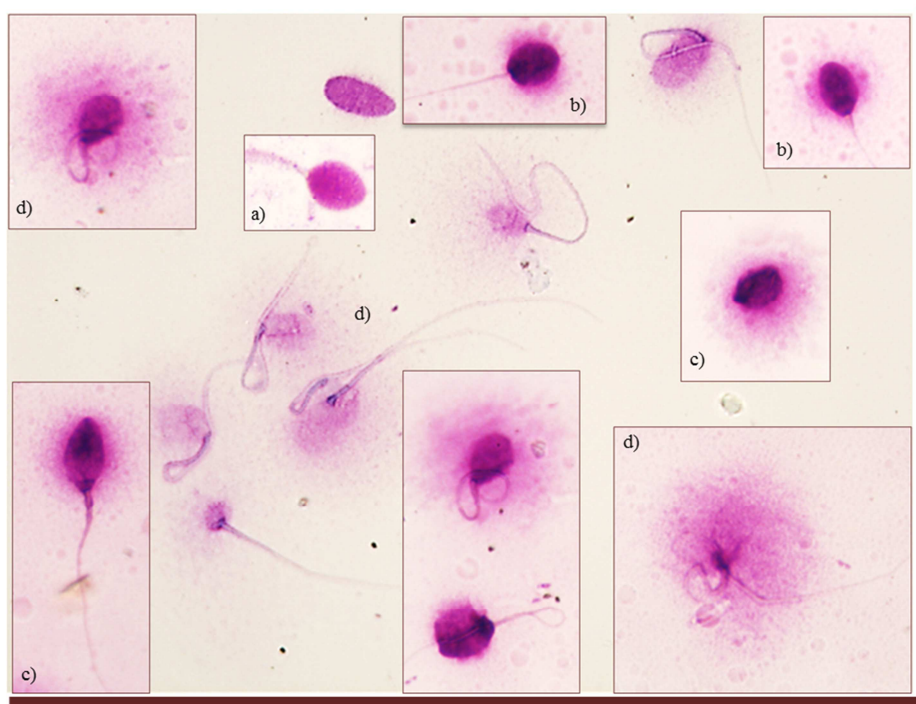


Figura 7.13. SPZ sujeitos ao SCDT e corados com o *kit diffVet* apresentam diferentes graus de dispersão da cromatina.
a) núcleos sem halo; b) halo de dispersão \leq a metade do raio do núcleo; c) halo de dispersão \approx a metade do raio do núcleo; d) halo de dispersão $>$ a metade do raio do núcleo.

WNUK et al. (2010) observaram que baixos níveis de actividade antioxidante total não-enzimática no plasma seminal equino se correlacionavam com danos no ADN espermático. Nos gananhões Sorraia a actividade antioxidante não enzimática no PS foi superior à observada para os PSL. Alguns estudos têm revelado relação entre a forma e a dimensão da cabeça do espermatozóide (como as cabeças piriformes e gigantes) e as alterações à compactação e/ou integridade do ADN (BARTH et al., 1992). Certos autores sugerem que a morfologia da cabeça espermática é um biomarcador de fertilidade uma vez que traduz a estabilidade/compactação da cromatina (DADOUNE et al., 1988; HINGST, BLOTTNER e FRANZ, 1995; OSTERMEIER et al., 2001). Como vimos no capítulo 4, os espermatozoides dos gananhões Sorraia apresentaram maior pleomorfismo na região da cabeça constatando-

se, neste estudo, uma elevada % de células com grandes halos de dispersão da cromatina, nesta raça. Não foi possível estabelecer nenhuma equação regressiva para estes dois parâmetros, dado o reduzido número de amostras, contudo, ficou clara a maior instabilidade do ADN nos SPZ dos garanhões Sorraia, caracterizados por um elevado número de anomalias na região da cabeça das células. ENCISO *et al.* (2001), ao analisarem SPZ de bovinos, verificaram que, naqueles que apresentavam ADN fragmentado, a proporção de defeitos morfológicos na região da cabeça (cabeças piriformes, pequenas, isoladas e gigantes) era significativamente superior à observada nos que apresentavam acrossoma íntegro.

7.4. CONCLUSÃO

No conjunto das observações, notámos diferenças significativas nos espermatozoides de animais férteis (Grupo F) quando comparados com os animais com problemas de fertilidade (Grupo subF), confirmando-se a melhor qualidade seminal das amostras recolhidas na época de reprodução. Independentemente destes factores, os ejaculados caracterizam-se por uma diversidade de populações espermáticas, conforme confirmado pela marcação tripla dos espermatozoides. Face às relações observadas entre a integridade do acrossoma, a morfologia e o potencial de membrana mitocondrial, esta metodologia parece-nos útil e exequível nas condições em que trabalhamos pelo que deveria ser implementada nos espermogramas de início de época para caracterização do padrão espermático de cada indivíduo. De igual forma, o teste de dispersão da cromatina também nos parece apropriado não só porque permitiu distinguir os grupos de fertilidade, similarmente ao teste TUNEL, com o benefício de não requerer equipamento sofisticado (microscópio de fluorescência) e poder ser aplicado em condições de campo.

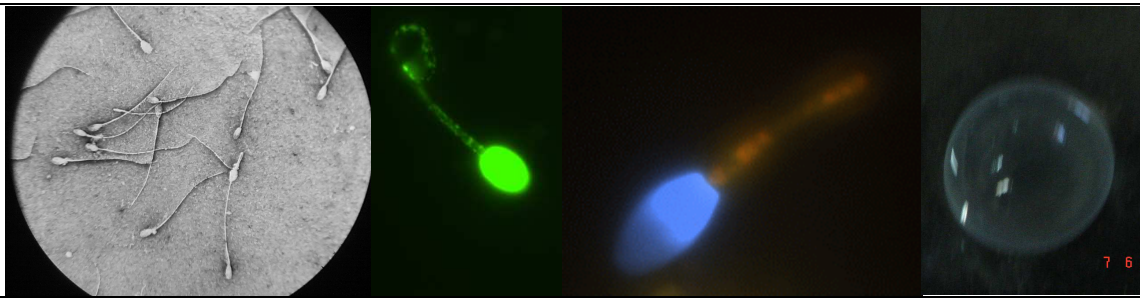
A análise estatística dos dados revelou que os parâmetros PMS, vitalidade, morfologia, AI e integridade/estabilidade do ADN são modulados pelos parâmetros funcionais avaliados, excepto o teste HOST. No entanto, como este método revelou distinguir grupos de fertilidade, para além de parecer medir propriedades diferentes das dos métodos de vitalidade por exclusão de corantes, parece-nos útil a sua introdução na rotina laboratorial afectada à avaliação sumária do espermatozóide equino, conforme sugerem outros autores (NEILD *et al.*, 2000), com a vantagem desta técnica possibilitar a recuperação dos SPZ para posterior utilização/análise.

Na generalidade, os resultados sugerem que a função respiratória mitocondrial não compromete a estabilidade das membranas nem a sua integridade assim como a do ADN. O papel das mitocôndrias como sinalizadores celulares importantes para a funcionalidade do espermatozóide tem sido sugerido em alguns trabalhos de investigação (*vide* RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2009, para revisão). Relativamente ao *stresse* oxidativo, durante a época de reprodução e nos animais de fertilidade comprovada, os níveis de TBARS parecem estar dentro de parâmetros fisiológicos pois não revelaram afectar a mobilidade espermática, a integridade e estabilidade das membranas nem a integridade do ADN. Com efeito, ejaculados com maior percentagem de células expressando elevado potencial de membrana mitocondrial ($\uparrow\Delta\Psi_{mit}$), integridade do ADN (TUNEL- ou SCDT), estabilidade dos fosfolípidos de membrana (M540-), e resposta positiva ao teste hiposmótico (HOST+) caracterizaram os espermatozoides de animais de fertilidade comprovada.

BAUMBER *et al.* (2000) referem ser a mobilidade espermática afetada pelo *stresse* oxidativo no esperma, parâmetro este que, quando inferido pelo método dos TBARS, se correlacionou negativamente ($P < 0,001$) com a mobilidade espermática somente no Grupo SubF. Adicionalmente, a formação de ROS tem sido correlacionada positivamente com danos na cromatina (*vide* COCUZZA *et al.*, 2007, para revisão) tendo-se verificado, na espécie equina, aumentos nos danos ao ADN dependentes da dose de exposição a espécies reativas de oxigénio (BAUMBER *et al.*, 2003a). Somente observámos correlação positiva entre a peroxidação lipídica no PS e os danos ao ADN nos animais in(sub)férteis, maioritariamente ganhos Sorraia. Ruiz-Lopes *et al.* (2010) referem que altos níveis de fragmentação do ADN nos espermatozoides estão associados à consanguinidade e à fraca qualidade seminal em ungulados em perigo de extinção. Conforme referido anteriormente, os níveis de consanguinidade, nesta raça, são elevados. Os espermatozoides destes animais apresentaram ainda valores de mobilidade espermática marginais, fraca atividade mitocondrial, elevados níveis de açúcares redutores e superior atividade antioxidante total não-enzimática no plasma seminal sem que se observasse relação entre os níveis de açúcares redutores e a função mitocondrial, nem com a peroxidação lipídica no esperma. Estes resultados sugerem alguma disfunção nos espermatozoides desta raça e apontam, ainda para que a produção de ATP, nessas células, assente sobre a via glicolítica. As observações deste estudo, aliadas às alterações observáveis ao nível morfológico, indicam problemas na espermatogénese nos animais desta raça.

CAPÍTULO 8

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS



SUMÁRIO

As conclusões finais assim como os trabalhos que se perspetivam necessários, bem como os exequíveis, são apresentados no presente capítulo.

CAPÍTULO 8

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

As nossas raças equinas autóctones, PSL e Sorraias, diferem significativamente quanto à qualidade espermática e para os PSL, por enquanto, não parece haver problemas quanto à fertilidade e capacidade dos espermatozóies suportarem as temperaturas de refrigeração. Os resultados obtidos mostraram claramente uma variabilidade entre ejaculados do mesmo indivíduo pelo que este facto deverá ser tomado em consideração nos concursos para admissão de futuros reprodutores. Isto é tanto mais importante quando se revelaram, para a nossa latitude, diferenças sazonais na qualidade espermática. Estas diferenças poderão ter implicações não só na avaliação da qualidade do esperma de animais presentes a concurso para admissão ao livro de reprodutores mas também quanto à recolha de sémen em diferentes alturas do ano para criopreservação e posterior utilização em IA. De facto, em equinos (JANETT *et al.*, 2003), assim como noutras espécies de reprodução sazonal (D'ALESSANDRO e MARTEMUCCI, 2003), a resposta dos espermatozóides à congelação/descongelação apresenta variações com a sazão, possivelmente devido à qualidade inicial do sémen. Resultados preliminares obtidos por AGRÍCOLA *et al.* (2009) apontam para que a melhor época para congelar esperma de cavalos PSL seja o Inverno/Primavera. Já WRENCH *et al.* (2010) ao estudarem os efeitos da sazão (latitude 36-37°N) na qualidade do esperma fresco e congelado concluíram que os espermatozóides recolhidos entre Março e Junho apresentavam melhor qualidade pós descongelação do que os recolhidos na contra-estação. No geral, a nossa experiência com congelamento de sémen reitera o conhecimento de que a congelabilidade do sémen de ganhanho depende muito do indivíduo. Nos Sorraia, a fraca qualidade inicial do esperma parece traduzir-se na fraca qualidade do sémen após descongelação (dados não publicados). Mais estudos são necessários de forma a poder definir-se um programa de conservação *ex situ* para a raça Sorraia.

Já no seu estudo sobre a raça Lusitana, e utilizando a raça Sorraia na análise de aspectos relacionados com a depressão consaguínea, OOM (1992) verificou um decréscimo significativo da viabilidade dos produtos nesta raça e evidências para a redução da fecundidade dos progenitores mais consaguíneos. Com base nos resultados de fertilidade obtidos com os animais com que trabalhamos, podemos afirmar que a fraca qualidade do esperma se reflete nos índices reprodutivos alcançados. No entanto, não será de descartar a hipótese de problemas associados à fêmea contribuírem para o

insucesso reprodutivo. Recentemente, um problema de mosaicismo cromossómico foi detetado numa égua Sorraia (KJÖLLERSTRÖM, COLLARES-PEREIRA e OOM, 2011), sobre a qual fizémos o maneo reprodutivo, sem sucesso. O cariótipo deste animal revelou monossomia do cromossoma X em 10,45% das metafases analisadas. Nada mais se sabe relativamente à incidência de alterações cromossómicas, quer a nível somático quer ao nível dos gâmetas, nesta raça, pelo que se avizinha aqui uma linha de trabalho interessante.

A fertilização nos mamíferos é caraterizada por uma intrincada coreografia durante a qual o SPZ sofre modificações na sua estrutura, não sendo a célula estruturalmente intacta e igual à que é ejaculada que fertiliza o oócito, mas sim aquela que se encontrar funcionalmente íntegra. No estudo das proteínas envolvidas na hipótese SNARE de fusão de membranas confirmámos a incapacidade do espermograma normal em detetar casos de infertilidade porquanto se verificou uma dissociação entre a qualidade do esperma avaliado *à priori* e a fecundidade *à posteriori* num ganhão infértil com parâmetros espermáticos normais. Os nossos resultados mostraram que mais do que os parâmetros do espermograma, essas proteínas, nomeadamente a sintaxina, a NSF e a caveolina, permitem explicar a fertilidade dos indivíduos apresentando-se, assim, como bons marcadores moleculares.

Tal como para a generalidade dos mamíferos estudados (OMBELET *et al.*, 1995), tanto os ejaculados de ganhões de fertilidade comprovada como os ganhões Sorraia exibiram variações não só no tamanho e forma da cabeça como também nos aspectos relacionados com alterações na morfologia da PI e da PP, integridade do acrossoma, vitalidade, estabilidade dos fosfolípidos de membrana e actividade mitocondrial. No entanto, o maior problema encontrado na avaliação do sémen na raça Sorraia prendeu-se com o elevado grau de pleomorfismo apresentado pela região da cabeça espermática. Alguns autores são de opinião que durante a passagem dos espermatozóides pelo epidídmo as células vão adquirindo a capacidade de regular o seu volume, face às variações de omolaridade que vão encontrando assumindo, assim, a sua forma normal. Nos animais in(sub)férteis observámos uma menor % de SPZ com resposta positiva ao teste hipo-osmótico (HOST+), sinal de possível *stresse* oxidativo nos SPZ (TREMELLEN, 2008). Este teste revelou medir propriedades diferentes das dos métodos de exclusão de

corantes (eosina-nigrosina e IP/SYBR14) preconizando-se, assim, a sua introdução no espermograma sumário.

Os nossos resultados mostraram que, no esperma dos animais com problemas de fertilidade, uma % elevada de SPZ possui mitocôndrias com fraca atividade metabólica sugerindo outros aspetos da fisiologia da mitocôndria que não a produção de ATP para sustentar a viabilidade e a mobilidade da célula. Estudos conducentes a elucidar o envolvimento da mitocôndria em eventos de sinalização celular no esperma equino serão necessários para elucidar.

O *stress* oxidativo, monitorizado pelo método dos TBARS, só parece ser um problema ao nível do plasma seminal nos animais in(sub)féteis. Para a raça Sorraia contudo, a elevada atividade antioxidante (TEAC) observada no PS sugere que as secreções das glândulas anexas não apresentam défice nos antioxidantes que produzem. Assim, parece ocorrer, no PS, uma sobreprodução de ROS. A sua proveniência permanece por determinar, não sendo de excluir a sua origem nas secreções do epidídimo que acompanham os SPZ durante a ejaculação e/ou na actividade da NOX 5, que é regulada por aumentos no Ca^{2+} citoplasmático. A avaliação da presença e atividade da NOX 5 é exequível nas condições em que trabalhamos, o mesmo não se podendo dizer relativamente a estudos ao nível dos SPZ residentes no epidídimo, uma vez que a disponibilidade de testículos, por castração ou pós-morte, é muito limitada. O método TBARS é moroso pelo que a utilização de marcadores fluorescentes específicos para avaliação da oxidação de lípidos, como OBODIPY_{C11}, é preconizada. Nas condições em que trabalhamos, a recente disponibilidade de um citómetro de fluxo permitirá a análise de rotina da peroxidação lipídica no esperma assim como de outros parâmetros monitorizados com recurso a fluorocromos.

A avaliação do *stress* oxidativo assim como da capacidade antioxidante do esperma revelou-se relevante e sê-lo-á, sobretudo, quando sobre o esperma se aplicarem tecnologias conducentes à sua utilização diferida. Os estudos em equinos sugerem que o efeito do *stress* oxidativo assume maior expressão durante o armazenamento do esperma, tanto por refrigeração como por congelação (BALL, 2008). Em termos práticos de utilização e preservação do esperma equino, em particular nos animais Sorraia, eliminar o plasma seminal e substituí-lo por meios de diluição com antioxidantes,

poderá ser uma alternativa contudo, oferece dizer-se que a centrifugação do esperma, método comumente utilizado nos processos de conservação, mormente por congelação, não será o método mais adequado na medida em que induz acréscimos na produção de ROS (IWASAKI e GAGNON, 1992), pelo que preconizamos a avaliação da utilização de membranas filtrantes (já existentes no mercado) para separação do PS em trabalhos futuros conducentes à conservação de esperma nesta raça.

Seja qual for a razão pela qual os espermatozoides dos garanhões in(sub)féreis, nomeadamente da raça Sorraia, expressam maior % de SPZ com danos na cromatina (distribuição anormal da cromatina durante a fase mitótica da espermatogénese; problemas na substituição de histonas pelas protaminas, incluindo na actividade da topoisomerase II; apoptose abortiva; stressse oxidativo, ou todas as hipóteses em sinergia) os nossos resultados sugerem que as alterações à morfologia espermática refletem problemas na espermatogénese. A coexistência de fragmentação no ADN e defeitos morfológicos na região da cabeça foi evidenciada em bovinos (ENCISO *et al.* 2001). Uma relação entre o grau de condensação da cromatina e anomalias cromossómicas também já foi estabelecida, no entanto, alguma controvérsia subsiste quanto à relação entre casos de aneuploidia cromossómica e as alterações à morfologia do SPZ (SHI e MARTIN, 2006) em humanos com cariótipo normal, ou não. Alguns estudos têm assinalado a existência de aneuploidia em SPZ com defeitos na cabeça no esperma humano, sendo a frequência de aneuploidias elevada em SPZ com cabeças redondas (*vide* COLLODEL e MORETTI, 2006, para revisão). Parece que as aberrações do ADN paterno determinam infertilidade do macho, não por falhas na fertilização, mas por apoptose das células do embrião na fase de expressão do seu ADN (*vide* SILVA e GADELLA, 2006, para revisão e LIN *et al.*, 2008). Estudos conducentes a determinar, tanto o conteúdo em ADN dos espermatozoides (por citometria de fluxo), como situações eventuais de anomalias cromossómicas nos SPZ (por FISH), assim como ensaios de fertilização *in vitro* e de injeção intracitoplasmática de espermatozoides, permitiriam averiguar o que acontece no caso da raça Sorraia.

Anomalias estruturais do núcleo incluem ainda condensação incompleta ou anormal da cromatina, com maior exposição de *loops*, estando o grau de condensação da cromatina associado à presença de fragmentação no ADN. A utilização da

cromocianina A3, um antibiótico com propriedades de emissão de fluorescência quando ligado ao ADN, na região do sulco menor, em zonas ricas em guanina e citosina (HOU *et al.*, 2004), permite avaliar, indiretamente, a compactação da cromatina e a deficiência de protaminas (KAZEROONI *et al.*, 2011) pelo que a sua utilização parece útil para aprofundarmos o conhecimento no que, em particular, ao cavalo do Sorraia diz respeito. Atente-se, no entanto, que estes estudos podem ser estendidos, não só à generalidade das nossas raças equinas autóctones, principalmente a pequenos núcleos de criação com alguma depressão consaguínea, mas também a outros animais de produção.

A máxima eficiência reprodutiva e produtiva só será alcançada como resposta positiva ao trabalho aplicado se o controlo reprodutivo do garanhão e da égua for compreendido com profundidade e executado correctamente (MERK, 2000, comunicação pessoal). Do ponto de vista da utilização e aplicação do esperma equino, quanto mais soubermos das particularidades de cada reprodutor que pretendemos utilizar maior a probabilidade de sucesso no maneio reprodutivo. De fato, as modernas técnicas de reprodução possibilitam melhorar a fertilidade no entanto, não podemos olvidar nem a fonte genética nem a herança epigenética de algumas situações de infertilidade sob pena de se comprometer a capacidade de gerar descendência nas gerações subsequentes.

Neste estudo, os vários métodos aplicados para monitorização da qualidade do esperma provêm mais informação do que os parâmetros avaliados num espermograma sumário evidenciando, não só diferenças significativas entre grupos de fertilidade, mas também particularidades inerentes às raças autóctones utilizadas. Assim, a avaliação da (in)fertilidade com sede no macho deverá ser encarada tomando a célula espermática como uma unidade cujo comportamento apenas pode ser compreendido através de múltiplas abordagens complementares.

LISTA DE REFERÊNCIAS

- Agarwal, A., Gupta, S., Sikka, S. - The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**. ISSN 1040-872X. 18:3 (2006), 325-332.
- Agarwal, A., Prabakaran, S.A. - Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**. ISSN 0019-5189 43. (2005), 963-974
- Agrícola, R., Chaveiro, A., Robalo Silva, J., Lopes Da Costa, L.F., Horta, A.E.M., Moreira Da Silva, F. - Seasonal semen freezeability from Lusitano stallions using flow-citometry. In: 60th Annual Meeting of the European Association for Animal Production; 2009 Aug 24-29; Barcelona, Spain. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2009. pp. 307.
- Aitken, R.J. - Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**. ISSN 1031-3613. 7:4 (1995), 659-668.
- Aitken, R.J. Buckingham, D., West, K., Wu, F.C., Zikopoulos, K., Richardson, D.W. - Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022-4251. 94:2 (1992), 451-462.
- Aitken, R.J., Baker, M.A., Sawyer, D. - Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. **Reproductive Biomedicine Online**. EISSN 1472-6491. 7:1 (2003), 65-70.
- Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S. - Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 41:1 (1989), 183-97.
- Aitken, R.J., Fisher, H. - Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioessays**. ISSN 1521-1878. 16:4 (1994), 259-267.
- Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z. [et al.] - Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 59 (1998), 1037-1046.
- Aitken, R.J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A.J., Lee, Y.H., Baker, M.A. - Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J. Androl.* 9:4 (2007), 554-64.
- Alkan, I., Simşek, F., Haklar, G., Kervancıoğlu, E., Ozveri, H., Yalçın, S., Akdaş, A. - Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. **Journal of Urology**. ISSN 1677-5538. 157:1 (1997), 140-143.
- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L., Storey, B.T. - Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 8:5 (1987), 338-348.
- Amann, R.P. - Functional anatomy of the adult male. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1993a. ISBN 0-8121-1427-2. pp.645-657.
- Amann, R.P. - Physiology and Endocrinology. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1993b. ISBN 0-8121-1427-2. pp.658-685.
- Amann, R.P., Graham, J.K. - Spermatozoal function. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1993. ISBN 0-8121-1427-2. 715-745.
- Amann, R.P., Thompson, D.L., Squires, E.L., Pickett, B.W. - Effect of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 27 (1979), 1-6.

- Andrade, A.F. Andrade, F. d' – O cavalo Lusitano. **Vida Rural**. PT-358383. 17 (1988), 16-17.
- Andrade, R. d' - Les chevaux du Sorraia. In : Extrait des Comptes Rendues du XII^e Congrès International de Zoologie; 1935 ; Lisbonne, Portugal. Lisboa : Casa Portuguesa ; (1937), 2368-2370.
- Andreyev, Y.A., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A. - REVIEW: Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 70, No. 2, 2005, pp. 200-214. Translated from *Biokhimiya*, 70:2 (2005), 246-264.
- Arienti, G., Carlini, E., De Cosmo, A.M., Di Profio, P., Palmerini, C.A. - Prostate-like particles in stallion semen. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 59 (1998), 309-313.
- Associação de Criadores de Equinos de Raça Garrana (ACERG) – Livro genealógico da raça Garrana: Stud Book. Leite, J., Portas, M., Silva, C. (coord) [ed. lit.] PT-162531/01 (2006) Vieira do Minho. 2^o vol, 120 p.
- Associação Internacional de Criadores do Cavalo Ibérico de Tipo Primitivo – Sorraia (AICS) - Stud Book da Raça Sorraia. Oom, M.M., d'Andrade, J.L., Costa-Ferreira, J. eds. [S.I.]. ISBN 972-8471-90-4. Alpiarça, 357 p.
- Associação Nacional de Criadores da Raça Garrana (ACeRG) – Plano de valorização da raça garrana. [ed.lit.] Barros, J., fotogr.; Neto, P., il. PT-167351/01 (2001) 41 [2] p.
- Associação Portuguesa de Criadores de Raças Selectas (APCRS) - Livro Genealógico Português de Equinos: Stud Book da Raça Lusitana-1989. [S.I.] PT-53900/92. [ed. lit] Mafra.
- Aumüller, G., Renneberg, H., Schiemann, P.J., Wilhelm, B., Seitz, J., Konrad, L., Wennemuth, G. - The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. ISSN: 0065-2598 424 (1997), 193-219.
- Axnér, E., Strom, B., Linde-Forsberg, C. - Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 52:5 (1999), 767-778.
- Aziz, N., Fear, S., Taylor, C., Kingslan, C.R., Lewis-Jone, D.I. – Human sperm head morphometric distribution and its influence on human fertility. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 70:5 (1998), 883-891.
- Baccetti, B., Bruni, E., Collodel, G., Gambera, L., Moretti, E., Marzella, R., Piomboni, P. - 10, 15 reciprocal translocation in an infertile man: ultrastructural and fluorescence in-situ hybridization sperm study: Case report. **Human Reproduction**. ISSN 0268-1161. 18:11 (2003), 2302-2308.
- Baccetti, B., Selmi, M.G., Soldani, P. - Morphogenesis of 'decapitated' spermatozoa in a man. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022-4251. 70:2 (1984), 395-397.
- Ball, B. - Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 107 (2008), 257-267.
- Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., Baumbber, J., Liu, I.K. - Catalase activity in equine semen. **American Journal of Veterinary Research**. ISSN 0002-9645. 61:9 (2000), 1026-1030.
- Ball, B.A., Mohammed, H.O. - Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 44:3 (1995), 367-377.
- Ball, B.A., Vo, A.T., Baumbber, J. - Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**. ISSN 0002-9645. 62:4 (2001), 508-515.
- Balsinde, J., Winstead, M.V., Dennis, E.A. - Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Lett**. ISSN 0014-5793. 531:1 (2002), 2-6.
- Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S. - Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**. ISSN 2042-0048. 2010. pii: 686137.

- Barber, A.A., Bernheim, F. - Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. **Advances in Gerontological Research**. ISSN 0065-2709. 2 (1967), 355-403.
- Barbosa, M.J.F., Abreu, J.V. – Alguns parâmetros reprodutivos em cavalos lusitanos e árabes. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. ISSN 0035-0389. LXXXI:478 (1986), 147-169.
- Barrisco, M.J. - O sémen equino: obtenção, exame, valorização, conservação e utilização. [Provas de aptidão pedagógica e capacidade científica]. Universidade de Évora. 1984.
- Barth, A.D., Bowman, P.A., Bo, G.A., Mapletoft, R.J. - Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle. **The Canadian Veterinary Journal**. ISSN 0008-5286. 33:1 (1992), 31-39.
- Batellier, F. Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J.M. [et al.] - Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 68 (2001), 181-190.
- Batellier, F., Magistrini, M., Fauquant, J., Palmer, E. - Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 48:3 (1997), 391-410.
- Baumber, J., Ball, B.A. - Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. **American Journal of Veterinary Research**. ISSN 0002-9645. 66:8 (2005), 1415-1419.
- Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A. - Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 24:4 (2003a), 621-628.
- Baumber, J., Sabeur, K., Vo, A., Ball, B.A. - Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 60:7 (2003b), 1239-1247.
- Baumbert, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A. - The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 21:6 (2000), 895-902.
- Belmonte, S. A., Lopez, C. I., Roggero, C. M., De Blas, G. A., Tomes, C. N., Mayorga, L. S. - Cholesterol content regulates acrosomal exocytosis by enhancing Rab3A plasma membrane association. **Developmental Biology**. ISSN 0012-1606. 285:2 (2005), 393-408
- Berndtson, W.E., Igboeli, G., Parker, W. G. - The number of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 37 (1987), 60-67.
- Berndtson, W.E., Squires, E.L., Thompson, Jr D.L. - Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 20:4 (1983), 449-457.
- Beu, C.C.L. Orsi, A.M., Domeniconi, R.F., Novelli, E.L.B. - Localization of Total Proteins and Lactate Dehydrogenase in Hamster Epididymis. **International Journal of Morphology**. ISSN 0717-9367. 25:2 (2007), 259-264.
- Bielański, W., Dudek, E., Bittmar, A., Kosiniak, K. - Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 32 (1982), 21-26.
- Bielański, W., Kaczmarek, F. - Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 27 (1979), 39-45.
- Bileski, B.H.J., Arudi, R.L., Sutherland, M.W. - A study of the reactivity of H₂O₂/O₂ with unsaturated fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**. ISSN 0021-9258. 258:8 (1983), 4759-4761.

- Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N., Sirad, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 57 (2002), 1105-1122.
- Bize, I., Santander, G., Cabello, P., Driscoll, D., Sharpe, C. - Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 44:3 (1991) 398-403.
- Blanchard, T.L., Johnson, L. - Determination of daily sperm production in stallion testes by enumeration of germ cells in homogenates **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 47:3 (1997a), 655-664.
- Blanchard, T.L., Johnson, L. - Increased germ cell degeneration and reduced germ cell: Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 47:3 (1997b), 665-667.
- Bland, J.M., Altman, D.G. - Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Reproduced by kind permission of the **Lancet**. 1:8476 (1986), 307-310.
- Bloom, E. - A one minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 1 (1950b), 176-177.
- Bloom, E. - Interpretation of spermiatic cytology in bulls. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 1 (1950a), 223-238.
- Bloom, E. - Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram (Norwegian). **Nordisk Veterinaer Medicin**. ISSN 0029-1579. 25 (1973), 383-391.
- Blottner, S., Hingst, O., Meyer, H.H. - Inverse relationship between testicular proliferation and apoptosis in mammalian seasonal breeders. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 44:3 (1995), 321-328.
- Blottner, S., Warnke, C., Tuchscherer, A., Heinen, Torner, H. - Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 65:1-2 (2001), 75-88.
- Bonet, S., Briz, M., Fradera, A., Egozcue, J. - Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. **Human Reproduction**. ISSN 0268-1161.7:4 (1992), 523-529.
- Borisovska, M., Zhao, Y., Tsytsyura, Y., Glyvuk, N., Takamori, S., Matti, U. [et al.] - v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. **The EMBO Journal**. ISSN 1460-2075. 24;12(2005), 2114-2126.
- Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Rigby, S.L., Love, C.C., Varner, D.D. - Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine sperm. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 59:3-4 (2003), 735-742.
- Brinsko, S.P., Varner, D.D. - Artificial Insemination. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. Equine Reproduction. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1993. ISBN 0-8121-1427-2. pp. 790-797.
- Brito, L.F.C. - Evaluation of Stallion Sperm Morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**. ISSN 1534-7516. 6:4 (2007), 249-264.
- Broadie, K., Prokop, A., Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Schulze, K.L., Sweeney, S.T. - Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in Drosophila. **Neuron**. ISSN 0896-6273.15:3 (1995), 663-673.
- Brouwers, J.F., Gadella, B.M. - In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology and Medicine**. ISSN 0891-5849. 35:11 (2003), 1382-1391.
- Brouwers, J.F., Silva, P.F., Gadella, B.M. - New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 63:2 (2005), 458-69.

- Brown, D.A., London, E. - Functions of lipid rafts in biological membranes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. ISSN 15308995. 14 (1998), 111-136.
- Bruford, M.W., Bradley, D.G., Luikart, G. - DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. **Nature Reviews Genetics**. EISSN 1471-0064. 4:11 (2003), 900-910.
- Buege, J.A., Aust, S.D. - Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. ISSN 0076-6879. 52 (1978), 302-10.
- Buttke, D.E., Nelson, J.L., Schlegel, P.N., Hunnicutt, G.R., Travis, A.J. - Visualization of GM1 with Cholera Toxin B in Live Epididymal Versus Ejaculated Bull, Mouse, and Human Spermatozoa. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 74:5 (2006), 889-895.
- Byers, S.W., Dowsett, K.F., Glover, T.D. - Seasonal and circadian changes of testosterone levels in peripheral blood plasma of stallions and their relation to semen quality. **Journal of Endocrinology**. ISSN 0022-0795. 99:1 (1983), 141-150.
- Cacho, B. - As explorações de equinos garranos no solar da raça. In: [s.n.] Plano de valorização da raça garrano. [ed. lit.], Associação Nacional de Criadores da Raça Garrana; Gerês 2001. cap. 1º, p. 7-19.
- Campos, A.M., Lissi, E.A. - Kinetics of the reaction between ABTS derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**. EISSN 1097-4601. 29:3 (1997), 219-224.
- Card, C. - Cellular associations and the differential spermogram: Making sense of stallion spermatozoal morphology. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 64:3 (2005), 558-567.
- Casey, P.J., Hillman, R.B., Robertson, K.R., Yudin, A.I., Liu, I.K., Drobnis, E.Z. - Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 14:4 (1993), 289-297.
- Casey, P.J., Gravance, C.G., Davis, R.O., Chabot, D.D., Liu, I.K. - Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 47:2 (1997), 575-582.
- Chamberlain, L.H., Burgoyne, R.D., Gould, G.W. - SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: Implications for the spacial control of exocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. ISSN 0027-8424. 98:10 (2001), 5619:5624.
- Chapa, J. - Manejo de Sementales. In: Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación, ed. Proceedings das VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Livro de ponencias y mesas redondas. 1992 Julio 2-5; Salamanca, Espanha. Salamanca: Centro de Publicaciones; NIPO: 251-92-067-2. 1992. p. 6-15.
- Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiéry, J.C., Pellicer-Rubio, M.T., Malpoux, B. - Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. **Reproduction in Domestic Animals**. ISSN 0936-6768. 43:Suppl 2 (2008), 40-47.
- Chen, Y.A., Scheller, R.H. - SNARE-mediated membrane fusion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. ISSN 1471-0072. 2:2 (2001), 98-106.
- Christova, Y., James, P.S., Jones, R. - Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. *Molecular Reproduction and Development*. ISSN 1040-452X. 68:3 (2004), 365-372.
- Clarke, G. N.; Liu, Y.; Baker, H. W. - Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 86 (2006), 721-722.

- Clay, C.M., Clay, J.N. - Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod, and the peri-pubertal period in stallions. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. ISSN 0749-0739. 8:1 (1992), 31-56.
- Clay, C.M., Squires, E.L., Amann, R.P., Pickett, B.W. - Influences of Season and Artificial Photoperiod on Stallions: Testicular Size, Seminal Characteristics and Sexual Behavior. **Journal of Animal Science**. ISSN 0021-8812. 64 (1987), 517-525.
- Clay, C.M., Squires, E.L., Amann, R.P., Nett, T.M. - Influences of season and artificial photoperiod on stallions: luteinizing hormone follicle-stimulating hormone and testosterone. **Journal of Animal Science**. ISSN 0021-8812. 66:5 (1988), 1246-1255.
- Cocuzza, M., Sikka, S.C., Athayde, K.S., Agarwal, A. - Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. **International Brazilian Journal of Urology**. ISSN 1677-5538. 33:5 (2007) 603-621.
- Cognard, E. – Analyse comparée de tests de qualité de la semence congelée d'étalon. Mémoire de Fin D'Etude. Diplôme d'Ingénieur Agronomique-Option Elevage, Université Catholique de Louvain, Belgique – INRA, Nouzilly ; 1996.
- Coimbra, S.H. - LVSITANO: ensinaça de bem cavalgar. **National Geographic Portugal**. 4:46 (2005), 34-55.
- Colenbrander, B., Puyk, P., Zandee, A.R., Parlevliet, J. – Evaluation of the stallion for breeding. **Acta Veterinaria Scandinavica**. ISSN 1751-0147. 88 (1992), 29-37.
- Compton, S.J., Jones, C.G. - Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**. ISSN 0003-2697. 151:2 (1985), 369-374.
- Cooper, T.G. - Epididymis. In: Knobil, E, Neill, J, eds. Encyclopedia of Reproduction. San Diego: Academic Press; 1999. ISBN 0-12-227022-3. pp. 1–17.
- Cooper, T.G. - Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. **Asian Journal of Andrology**. ISSN 1008-682X. 9:4 (2007), 533–539.
- Cooper, T.G., - The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**. ISSN 1008-682X. 13(2011), 130–138.
- Cooper, T.G., Yeung, C.H. - Involvement of potassium and chloride channels and other transporters in volume regulation by spermatozoa. **Curr Pharm Des** 13 (2007) 3222–3230.
- Cooper, T.G., Yeung, C.H. - Sperm maturation in the human epididymis. In: De Jonge, Christopher J; Barratt, Christopher LR, eds The sperm cell – production, maturation, fertilization, regeneration. New York: Cambridge University Press; 2006. ISBN-13 978-0-521-85397-2. pp. 72-107.
- Cornwall, G.A. - New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**. ISSN 1355-4786. 15:2 (2009), 213–227.
- Correa, J.R., Zavos, P.M. - The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 42:2 (1994), 351-60.
- Cross, N.L., Lambert, H., Samuels, S. - Sperm binding activity of the zona pellucida of immature mouse oocytes. **Cell Biology International Reports**. ISSN 0309-1651. 10:7 (1986), 545-54.
- Cross, N.L., Meizel, S. - Methods for Evaluating the Acrosomal Status of Mammalian Sperm. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 41 (1989), 635-641.
- Cuasnicu, P.S., Cohen, D.J., Ellerman, D.A., Busso, D., Da Ros, V.G., Morgenfeld, M.M. - Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In: Robaire, B; Hinton, BT, eds. The Epididymis: From

Molecules to Clinical Practice. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher; 2002. ISBN 0-306-46684-8. pp. 389–403.

- Cuasnicu, P.S., Gonzalez Echeverria, F., Piazza, A., Blaquier, J.A. - Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022- 4251. 70:2 (1984a), 541-547.
- Cuasnicu, P.S., Gonzalez Echeverria, F., Piazza, A., Pineiro, L., Blaquier, J.A. - Epididymal proteins mimic the androgenic effect on zona pellucida recognition by immature hamster spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022-4251. 71 (1984b), 427-31
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Lecce ram. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 79 (2003), 93-102.
- Dadoune, J.P., Mayaux, M.J., Guihard-Moscato, M.L. - Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. **Andrologia**. ISSN 0303-4569. 20:3 (1988), 211-217.
- Damm, O.S., Cooper, T.G. - Maturation of sperm volume regulation in the rat epididymis. **Asian Journal of Andrology**. ISSN 1008-682X. 12:4 (2010), 578-90.
- Davis, R.O., Gravance, C.G., Casey, P.J. - Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**. ISSN 0002-9645. 54:11 (1993), 1808-1811.
- Davis-Morel, M.C.G. Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management. 1st edition, London: CABI International, 1999. ISBN 978-1-84593-450-7. pp. 82-87.
- de Andrade, A.F., Arruda, R.P., Celeghini, E.C., Nascimento, J., Martins, S.M., Raphael, C.F. [et al.] - Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**. ISSN 0936-6768 42:2 (2007), 190-194.
- De Blas, G. A., Roggero, C. M., Tomes, C. N., Mayorga, L. S. - Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. **PLoS Biology**. EISSN-1545-7885. 3(10):e323 (2005), 1801-1812.
- de Lamirande, E., Gagnon, C. - A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**. EISSN 1365-2605. 16:1 (1993) 21-25.
- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C. - Reactive oxygen species and sperm physiology. **Rev Reprod**. 2:1 (1997) 48-54.
- de Wit, H., Cornelisse, L.N., Toonen, R.F., Verhage, M. - Docking of secretory vesicles is syntaxin dependent. **PLoS One**. EISSN 1932-6203. 1(1):e126 (2006), 1-10.
- Dias, G.M., Retamal, C.A., Tobella, L., Arnholdt, A.C., López, M.L. - Nuclear status of immature and mature stallion spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 66 (2006), 354–365.
- Dott, H.M. -Morphology of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 23 (1975), 41-6.
- Dowsett, K. F., Knott, L. M. - The influence of age and breed on stallion semen. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 46 (1996), 397-412.
- Dowsett, K.F., Osborne, H.G., Pattie, W.A. - Morphological characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 22:5 (1984), 463-472.
- Dowsett, K.F., Pattie, W.A. - Characteristics and fertility of stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 32 (1982), 1-8.

- Dowsett, K.F., Pattie, W.A. - Variation in characteristics of stallion semen caused by breed, age, season of year and service frequency. *J. Reprod. Fertil.* 35 (1987), 645–647.
- Drevius, L.O., Eriksson, H. - Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res.* 42:1 (1966), 136-56.
- Enciso, M., Cisale, H., Johnston, S.D., Sarasa, J., Fernández, J.L., Gosávez, J. - Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. ***Theriogenology***. ISSN 0093-691X. 76:1 (2011), 23-32.
- Ernster, L., Nordenbrand, K. - Microsomal lipid peroxidation. Oxidation and Phosphorylation. In: Estabrook, RW; Pullman, ME, eds ***Methods in Enzymology***. New York:, Academic. ISBN 978-0-12-181850-0. 10 (1967), 574-580.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R. - Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. ***Science***. ISSN 0036-8075. 240 (1980), 1131–1133.
- Fabião, C. – O passado proto-histórico e romano. O bronze final. In: Mattoso, José, dir. *História de Portugal*. vol I. Lisboa: Círculo de Leitores: 1994. ISBN 972-42-0589-8. pp. 79-119.
- FAO, 2000. Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans. Management of Small Populations at Risk. Initiative for Domestic Animal Diversity. FAO, Rome. Disponível em WWW:<URL:www-DAD-3 - ftp://ftp.ffao.org/docrep/fao/009/x8750e/x8750e.pdf>
- Fawcett, D.W. – Sperm flagellum. In: *The cell*. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1981. ISBN 0-7216-3584-9. pp. 604-624.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., Goyanes, V., Vazquez, R., Alvarez, J.G. - The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. ***Journal of Andrology***. ISSN 0196-3635. 24:1 (2003), 59-66.
- Ferreira-Dias, G., Claudino, F., Carvalho, H., Agrícola, R., Alpoim-Moreira, J., Robalo Silva, J. - Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status. ***Domestic Animal Endocrinology***. ISSN 0739-7240:1 (2005), 203-13.
- Fitzpatrick J.L., Evans, J.P. – Reduced heterozygosity impairs sperm quality in endangered mammals. ***Biology Letters***. EISSN 1744-957X. 5:3 (2009), 320-323.
- Flesch, F. M., Gadella, B.M.. - Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. ***Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes***. ISSN 0304-4157. 1469:3 (2000), 197-235.
- Ford, W.C. - Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? ***Human Reproduction Update***. ISSN 1355-4786. 12:3 (2006), 269-274.
- Ford, W.C. - Regulation of sperm function by reactive oxygen species. ***Human Reproduction Update***. ISSN 1355-4786. 10:5 (2004). 387-399.
- Fouchécourt, S., Métayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., Dacheux, J.L. - Stallion Epididymal Fluid Proteome: Qualitative and Quantitative Characterization; Secretion and Dynamic Changes of Major Proteins. ***Biology of Reproduction***. ISSN 0006-3363. 62 (2000), 1790–1803.
- Frenette, G., Lessard, C., Sullivan, R. - Selected proteins of "prostosome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. ***Biology of Reproduction***. ISSN 0006-3363. 67:1 (2002), 308-313.
- Friend, D.S. - Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell. ***The Journal of Cell Biology***. ISSN 0021-9525. 93:2 (1982), 243-249.
- Fundação Alter Real (FAR) – Disponível em WWW:<URL:www.http://far.alterreal.pt/>

- Gadella, B.M., Colenbrander, B., Lopes-Cardozo, M. - Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 45:3 (1991), 381-386.
- Gadella, B.M., Rathi, R., Brouwers, J.F., Stout, T.A.; Colenbrander, B. - Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 68:3-4 (2001), 249-265.
- Gadella, B.M., Tsai, P.S., Boerke, A., Brewis, I.A. - Sperm head membrane reorganisation during capacitation. **The International Journal of Developmental Biology**. EISSN 1696-3547. 52:5-6 (2008), 473-480.
- Gamboa, S., Francisco M., Gomes, P., Mendes, C., Machado-Faria, M., Ramalho-Santos, J. - Level of glycolyzable substrates in stallion semen: Effect of ejaculation frequency on sperm survival after cool storage during the nonbreeding Season. **Journal of Equine Veterinary Science**. ISSN 0737-0806. 31:3 (2011), 109-115.
- Gamboa, S., Ramalho-Santos, J. - SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 64:2 (2005), 275–291.
- Gamboa, S., Rodrigues, A.S., Henriques, L., Batista, C., Ramalho-Santos, J. – Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 73:7 (2010), 950–958.
- Garner, D.L., Johnson, L.A., Yue, S.T., Roth, B.L., Haugland, R.P. - Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 15:6 (1994), 620-629.
- Garner, D.L., Thomas, C.A., Joerg, H.W., DeJarnette, J.M., Marshall, C.E. - Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 57 (1997), 1401-1406.
- Gebauer, M.R., Pickett, B.W., Faulkner, L.C., Remmenga, E.E., Berndtson W.E. - Reproductive Physiology of the Stallion. VII. Chemical Characteristics of Seminal Plasma and Spermatozoa. **Journal of Animal Science**. ISSN 0021-8812. 43:3 (1976), 626-632.
- Gomes, J.C., Oom, M.M. - Caracterização demográfica do núcleo de garranos bravios do PNPG. **Revista Portuguesa de Zootecnia**. ISSN 0872-7098. 7:1 (2000), 67–78.
- Gomez, E., Buckingham, D.W., Brindle, J., Lanzafame, F., Irvine, D.S., Aitken, R.J. - Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 17:3 (1996), 276-87.
- Goyal, H.O. - Light microscopic and ultrastructural evidence of epithelial phagocytosis of sperm in the rete testis and ductuli efferentes in the bull. **American Journal of Veterinary Research**. ISSN 0002-9645. 43:5 (1982), 785-790.
- Graham, J.K., Kunze, E., Hammerstedt, R.H. - Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 43: (1990), 55-64.
- Gravance, C.G., Garner, D.L., Baumber, J., Ball, B.A. – Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 53:9 (2000), 1691-1703.
- Gravance, C.G., Liu, I. K. M., Davis, R. O., Hughes, J. P., Casey, P. J. - Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022- 4251. 108:1 (1996), 41-46.
- Gravance, C.G., Champion, Z., Liu, I.K., Casey, P.J. - Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 47:1-2 (1997) 149-155.

- Griveau, J.F., Le Lannou, D. - Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**. ISSN: 0105-6263. 20 (1997), 61–69.
- Griveau, J.F., Renard, P., Le Lannou D. - An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. **International Journal of Andrology**. ISSN: 0105-6263. 17:6 (1994) 300-307.
- Großfeld, R., Sieg, B., Struckmann, C., Frenzel, A., Maxwell, W.M., Rath, D. - New aspects of boar semen freezing strategies. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 70:8 (2008), 1225-1233.
- Grubaugh, W., Sharp, D.C., Berglund, L.A., McDowell, K.J., Kilmer, D.M., Peck, L.S. [et al.] - Effects of pinealectomy in Pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 32 (1982), 293-295.
- Grundler, W., Dirscherl, P., Beisker, W., Weber, F., Stolla, R., Bollwein, H. -Quantification of temporary and permanent subpopulations of bull sperm by an optimized SYBR-14/propidium iodide assay. **Cytometry Part A**. ISSN 1552-4922. 60:1 (2004), 63-72.
- Guerin, M.V., Deed, J.R., Kennaway, D.J., Matthews, C.D. - Plasma melatonin in the horse: Measurements in natural photoperiod and in acutely extended darkness throughout the year. **Journal of Pineal Research**. ISSN 0742-3098.19:1 (1995), 7–15.
- Gutteridge, J.M. Free-radical damage to lipids, amino acids, carbohydrates and nucleic acids determined by thiobarbituric acid reactivity. **International Journal of Biochemistry**. ISSN: 0020-711X. 14:7 (1982), 649-53.
- Gutteridge, J.M.C. – Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**. ISSN 0009-9147. 41:12 (1995), 1819-1828.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, U., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. - Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro1/Hoechst33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 65:6 (2006) 1122-1136.
- Harris, J.M., Irvine, C.H.G., Evans, M.J. - Seasonal changes in serum levels of FSH, LH and testosterone and in semen parameters in stallions. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 19:3 (1983), 311–322.
- Harrison, R.A.P., Ashworth, P.J.C., Miller, N.G.A. - Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Molecular Reproduction and Development**. ISSN 1040-452X. 45:3 (1996), 378–391.
- Hermo, L., Jacks, D. - Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. **Molecular Reproduction and Development**. ISSN 1040-452X. . 63:3 (2002), 394-410.
- Hermo, L., Pelletier, R.M., Cyr, D.G., Smith, C.E. - Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 4: Intercellular Bridges, Mitochondria, Nuclear Envelope, Apoptosis, Ubiquitination, Membrane/Voltage-Gated Channels, Methylation/Acetylation, and Transcription Factors. **Microscopy Research and Technique**. ISSN 1097-0029. 73 (2010c), 364–408
- Hermo, L., Pelletier, R.M., Cyr, D.G., Smith, C.E. - Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**. ISSN 1097-0029. 73:4 (2010a), 279-319.
- Hess, R.A. - Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. **Reviews of Reproduction**. ISSN ISSN: 1359-6004. 5:2 (2000), 84–92.
- Hess, R.A. – The efferent ductules: structure and functions. In: robaire, B e Hinton, BT, The epididymis; from molecules to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. ISBN 0-306-46684-8. 2001. pp.49-80.

- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Soler, C. - Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 103:3-4 (2008), 374-378
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Sanz, J., Soler, C. - Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. **Veterinárni Medicína**. ISSN 0375-8427. 50:1 (2005), 24-32.
- Hiele, J.J., Friesleben, H.J., Fuchs, J., Ochsendorf, F.R. - Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**. ISSN 0268-1161. 10:1 (1995), 110-115.
- Hingst, O., Blottner, S., Franz, C. - Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. **Andrologia**. ISSN 0303-4569. 27:5 (1995), 275-279.
- Hirai, M., Boersma, A., Hoeflich, A., Wolf, E., Foll, J., Aumuller, T.R. [et al.] - Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 22:1 (2001), 104-110.
- Hoffmann, B., Landeck, A. - Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 57:1-2 (1999), 89-98.
- Holland, M.K., Alvarez, J.G., Storey, B.T. - Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 27:5 (1982), 1109-1118.
- Holland, M.K., Storey, B.T. - Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. Generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa. **Biochemical Journal**. ISSN 0264-6021. 198:2 (1981), 273-280.
- Holstein, A.F., Schill, W.B., Breucker, H. - Dissociated centriole development as a cause of spermatid malformation in man. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022-4251. 78:2 (1986), 719-725.
- Holstein, A.F., Schulze, W., Davidoff, M. - Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**. ISSN 1477-7827. 14 (2003), 1-107.
- Holt, W.V. - Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. **International Review of Cytology**. ISSN 0074-7696. 87 (1984), 159-194.
- Hotzel, M.J., Walkden-Brown, S.W., Fisher, J.S., Martin, G.B. - Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: responses to a nutritional stimulus in the breeding and non-breeding seasons. **Reproduction, Fertility and Development**. ISSN 1031-3613. 15:1-2 (2003), 1-9.
- Hou, M.H., Robinson, H., Gao, Y.G., Wang, A.H. - Crystal structure of the [Mg²⁺-(chromomycin A3)₂]-d(TTGGCCAA)₂ complex reveals GGCC binding specificity of the drug dimer chelated by a metal ion. **Nucleic Acids Research**. ISSN 0305-1048. 32:7 (2004), 2214-2222.
- Hurtgen, J.P. - Evaluation of the stallion for breeding soundness. **Veterinary clinics of North America: Equine practice**. ISSN 0749-0739. 8:1 (1992), 149-165.
- Hutt, D.M., Cardullo, R.A., Baltz, J.M., Ngsee, J.K. - Synaptotagmin VIII is localized to the mouse sperm head and may function in acrosomal exocytosis. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 66:1 (2002), 50-56.
- Ilio, K.Y., Hess, R.A. - Structure and Function of the Ductuli Efferentes: a review. **Microscopy Research and Technique**. ISSN 1097-0029. 29:6 (1994), 432-467.
- Instituto Nacional de Estatística (INE) - Recenseamento Agrícola 2009 - Análise dos Principais Resultados. Estatísticas Oficiais. Lisboa: INE ed. ISSN 0870-8916. 2011.

- Instituto Politécnico de Viana do Castelo (IPVC) – Cavalo Garrano - Candidatura a Património Nacional. Viana do Castelo: IPVC [Consult. Set. de 2011] Disponível em WWW:<URL: <http://garrano.ipvc.pt/index.php?section=31>
- Irvine, C.H., Alexander, S. - Importance of testicular hormones in maintaining the annual pattern of LH secretion in the male horse. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 32 (1982), 97-102.
- Iwasaki, A., Gagnon, C. - . Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 57 (1992), 409-416.
- Jahn, R., Grubmuller, H. - Membrane fusion. **Current Opinion in Cell Biology**. ISSN 0955-0674. 14:4 (2002), 488–495.
- Jahn, R., Scheller, R.H. - SNAREs—engines for membrane fusion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. ISSN 1471-0072. 7:9 (2006), 631–643.
- Janes, P.W., Ley, S.C., Magee, A.I. - Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. **The Journal of Cell Biology**. ISSN 0021-9525. 147:2 (1999), 447-461.
- Janett, F., Thun, R., Bettschen, S., Burger, D., Hassig, M. - Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches–Montagnes stallions. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 77:3-4 (2003b), 213–221.
- Janett, F., Thun, R., Niederer, K., Burger, D., Hassig, M. - Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 60:3 (2003a), 453–461.
- Jansen, T., Forster, P., Levine, M.A., Oelke, H., Hurler, M., Renfrew, C., Weber, J., Olek, K. - Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. ISSN 0027-8424. 99:16 (2002), 10905-10910.
- Jasko, D.J., Lein, D.H., Foote, R.H. – A comparison of two computer-automated semen analysis instruments for the evaluation of sperm motion characteristics in the stallion. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 11:5 (1990), 453-459.
- Jasko, D.J., Lein, D.H., Foote, R.H. - The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 35:2 (1991), 317–327.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J. - Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022-4251. 70:1 (1984), 219-228.
- Jian, W., Lee, S.H., Williams, M.V., Blair, I.A. - 5-Lipoxygenase-mediated endogenous DNA damage. **The Journal of Biological Chemistry**. ISSN 0021-9258. 284:25 (2009), 16799–16807.
- Johnson, A.L., Howards, S.S. - Hyperosmolality in intraluminal fluids from hamster testis and epididymis: a micropuncture study. **Science**. ISSN 0036-8075. 195 (1977), 492–493.
- Johnson, L. - Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 32:5 (1985), 1181-1190.
- Johnson, L. - Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 44:2 (1991), 284–291.
- Johnson, L., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Scrutchfield, W. L. - Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 48:7 (1997), 1199-1216.

- Johnson, L., Carter, G.K., Varner, D.D., Taylor, T.S., Blanchard, T.L., Rembert, M.S. - The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022-425. 100:1 (1994), 315-321.
- Johnson, L., Neaves, W.B. - Age-Related Changes in the Leydig Cell Population, Seminiferous Tubules, and Sperm Production in Stallions. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 24:3 (1981), 703-712.
- Johnson, L., Thompson, D.L. - Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population. daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone. luteinizing hormone and testosterone in stallions. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 29:3 (1983), 777-789.
- Johnson, L., Thompson, D.L. Jr., Varner, D.D. - Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 105:1-2 (2008), 23-51.
- Johnson, L., Varner, D. D., Roberts, M. E., Smith, T. L., Keillor, G. E., Scrutchfield, W. L. - Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 60-61 (2000), 471-480.
- Johnson, L., Varner, D.D., Tatum, M.E., Scrutchfield, W.L. - Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 45:3(1991b), 404-410.
- Johnson, L., Varner, D.D., Tatum, M.E., Scrutchfield, W.L. - Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 45:3 (1991a), 404-410.
- Jones, L.S., Berndtson, W.E. - A quantitative study of Sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and aging in the stallion. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 35:1 (1986), 138-148.
- Jones, R. - Plasma membrane composition and organization during maturation of spermatozoa in the epididymis. In: Robaire, B; Hinton, BT, eds. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. ISBN 0-306-46684-8. p. 405-416.
- Jones, R., Howes, E., Dunne, P.D., James, P., Bruckbauer, A., Klenerman, D. - Tracking diffusion of GM1 gangliosides and zona pellucida binding molecules in sperm plasma membranes following cholesterol efflux. **Developmental Biology**. ISSN 0012-1606. 339:2 (2010), 398-406.
- Jones, R., Mann, T., Sherins, R. - Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 31:5 (1979), 531-537.
- Jones, R.C., Jurd, K.M. - Structural differentiation and fluid reabsorption in the ductuli efferentes testis of the rat. **Australian Journal of Biological Sciences**. ISSN 0004-9417. 40:1 (1987), 79-90.
- Joseph, A., Shur, B.D., Ko, C., Chambon, P., Hess, R.A. - Epididymal hypo-osmolality induces abnormal sperm morphology and function in the estrogen receptor alpha knockout mouse. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 82:5 (2010), 958-967.
- Jóźwik, M., Jóźwik, M., Kuczyński, W., Szamatowicz, M. - Nonenzymatic antioxidant activity of human seminal plasma. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 68:1 (1997), 154-157.
- Kamp, G., Busselmann, G., Lauterwein, J. - Spermatozoa: models for studying regulatory aspects of energy metabolism. **Experientia**. ISSN 0014-4754. 52 (1996) 487- 494
- Kankofer, M., Kolm, G., Aurich, J., Aurich, C. - Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 63:5 (2005), 1354-1365.

- Katafuchi, K., More, T., Toshimore, K. Iida, H. - Localization of a syntaxin isoform, syntaxin 2, to the acrosomal region of rodent spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**. ISSN 1040-452X. 57:4 (2000), 375-383.
- Kavar, T., Dovč, P. - Domestication of the horse: Genetic relationships between domestic and wild horses. **Livestock Science**. ISSN 1871-1413. 116:1 (2008), 1–14.
- Keller, L.F., Waller, D.M. - Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology & Evolution**. ISSN 0169-5347. 17:5 (2002), 230-241.
- Keller, P. Simons, K. - Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. **The Journal of Cell Biology**. ISSN 0021-9525. 140:6 (1998), 1357-1367.
- Kemal D.N., Morshedi, M., Oehninger, S. - Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 74:6 (2000) 1200-1207.
- Kilmer, D.M., Sharp, D.C., Berglund, L.A., Grubaugh, W., McDowell, K.J., Peck, L.S. - Melatonin rhythms in Pony mares and foals. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 32 (1982), 303-307.
- Kim, Y.H., Haidl, G., Schaefer, M., Egner, U., Mandal, A., Herr, J.C. - Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. **Developmental Biology**. ISSN 0012-1606. 302:2 (2007), 463-476.
- King, G.J. - The Biology of Reproduction. In: King, GJ, ed. Reproduction in Domestic Animals: B9. World Animal Science B, Disciplinary Approach. Amsterdam: Elsevier Science publishers BV; 1993. ISBN 0-444-89530-2. p. 1-8.
- Kirchhoff, C., Hale, G. - Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. **Molecular Human Reproduction**. ISSN 1360-9947. 2:3 (1996), 177-184.
- Kirk, E.S., Squires, E.L., Graham, J.K. - Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 64:6 (2005), 1422-1439.
- Kjöllerström, H.J., Collares-Pereira, M.J., Oom, M.M. - First evidence of sex chromosome mosaicism in the endangered Sorraia Horse breed. **Livestock Science**. ISSN: 1871-1413. 136 (2011), 273–276.
- Klemetsdal, G., Johnson, M. - Effect of inbreeding on fertility in Norwegian trotters. **Livestock Production Science**. ISSN 0301-6226. 21:3 (1989), 263–272.
- Komarek, R.J., Pickett, B.W., Gibson, E.W., Lanz, R.N. - Composition of lipids in stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022-4251. 10:3 (1965), 337-342.
- Koppers, A.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., McLaughlin, E.A., Aitken R.J.- Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. ISSN 1945-7197. 93:8 (2008), 3199-3207.
- Ladha, S., James, P.S., Clark, D.C., Howes, E.A., Jones, R. - Lateral mobility of plasma membrane lipids in bull spermatozoa: heterogeneity between surface domains and rigidification following cell death. **Journal of Cell Science**. ISSN 0021-9533. 110 (1997), 1041-1050.
- Leeb, T., Sieme, H., Topfer-Petersen, E. - Genetic markers for stallion fertility--lessons from humans and mice. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 89:1-4 (2005), 21-29.
- Levine, N., Marsh, D. J. - Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. **Journal of Physiology**. ISSN 0022-3751. 213:3 (1971), 557–570. 1971.

- Lewis, R.N.A.H., McElhane, R.N. - The mesomorphic phase behaviour of lipid bilayers. In: Yagle P., ed. The structural of biological membranes. 2th ed.; London: CRC Press, Boca Raton; 2004. ISBN: 978-1-4200-4020-3 [Consult. 2007]. Disponível em [WWW:<URL:http://www.chem.ufl.edu/~fanucci/courses/CHM6304/scanned_chapters/yeagle%20struc%20membranes%20chpt2%20partA.pdf](http://www.chem.ufl.edu/~fanucci/courses/CHM6304/scanned_chapters/yeagle%20struc%20membranes%20chpt2%20partA.pdf). pp.73-155.
- Lewis, S.E., Boyle, P.M., McKinney, K.A., Young, I.S., Thompson. W. - Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 64:4 (1995), 868-870.
- Lin, M.H., Kuo-Kuang, L.R, Li, S.H., Lu, C.H., Sun, F.J., [et al.] - Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 90:2 (2008), 352-359
- Lin, M.H., Kuo-Kuang, L.R, Li, S.H., Lu, C.H., Sun, F.J., [et al.] - Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 90:2 (2008), 352-359.
- Lister, A.M., Kaldwell, M., Kaagan, L.M., Jordan, W.C., Richards, M.B., Stanley, H.F. - Ancient and modern DNA in a study of horse domestication. **Ancient Biomolecules**. ISSN 1358-6122. 2 (1999), 267–280.
- Lopate, C., Le Blanc, M., Knottenbelt, D. - The stallion. In: Knottenbelt, D; Le Blanc, M; Lopate, C; Pascoe, RR, eds. Equine stud farm medicine and surgery. China: Elsevier Science Limited, 2003. ISBN 07020-2130-X. pp. 43-112.
- Lopes, M.S., Mendonça, D., Cymbron, T., Valera, M., da Costa-Ferreira, J., Machado, A.da C. - The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation. **Animal Genetics**. ISSN 0268-9146. 36:3 (2005), 196-202.
- Lopez, C.I., Belmonte, S.A., De Blas, G.A., Mayorga, L.S. - Membrane-permeant Rab3A triggers acrosomal exocytosis in living human sperm. **The FASEB Journal**. ISSN 0892-6638. 21:14 (2007), 4121–4130.
- López, M.L., Olea, N., Retamal, C.A. - Post-testicular changes in the density and distribution of intramembrane particles of stallion sperm surface domains. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 100 (2007), 204–210.
- López-Fernández, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernández, J.L., Arana, P., Johnston, S.D. [et al.] - Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: the stallion. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 68:9 (2007), 1240-1250.
- Love, C.C. - Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 76:3 (2011), 547-557.
- Love, C.C., Varner, D.D., Thompson, J.A. – Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 56 (2000), 93-100.
- Luis, C., Bastos-Silveira, C., Costa-Ferreira, J., Cothran, E.G., Oom, M.M. - A lost Sorraia maternal lineage found in the Lusitano horse Breed. **Journal of Animal Breeding and Genetics**. ISSN 0931-2668.123:6 (2006), 399–402.
- Luis, C., Cothran, E.G., Oom, M.M. - Inbreeding and genetic structure in the endangered Sorraia horse breed. Implications for its conservation and management. **Journal of Heredity**. ISSN 0022-1503. 98:3 (2007), 232-237.

- Luís, C., Juras, R., Oom, M.M., Cothran, E.G. - Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite loci variation. **Animal Genetics**. ISSN 0268-9146. 38:1 (2007), 20-27.
- Machado-Faria, M. – Inseminação artificial em equinos. [Dissertação para efeitos de concurso à categoria de Professor Coordenador].Coimbra: Escola Superior Agrária; Instituto Politécnico de Coimbra, 1991.
- Magistrini, M., Chanteloube, P.H., Palmer E. - Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 35 (1987), 127–133.
- Magistrini, M., Vidament, M., Clement, F., Palmer, E. - Fertility prediction in stallions. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 42:1-4 (1996), 181-188.
- Malmgren, L. – Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 48 (1997), 523-530.
- Malmgren, L. - Sperm morphology in stallions in relation to fertility. **Acta Veterinaria Scandinavica**. ISSN 1751-0147. 88 (1992), 39-47.
- Malpoux, B. - Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. In: Neill, JD, ed. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Vol 2 (Reproductive Processes and their control. Palnt, TM, ed.) 3th ed. St. Louis: Elsevier Academic Press; 2006. ISBN 10-12-515401-7. pp. 2231-2281.
- Mann, T. – Biochemistry of semen. In: Greep, RO; Astwood EB, eds. Handbook of Physiology. Endocrinology: Male Reproductive System., ed. Vol 5 (5 vols). Washington DC: American Physiological Society; 1975. ISBN 683-03567-3. pp. 461-471.
- Mann, T., Minotakis, C.S. POLGE, C. – Semen composition and metabolism in the stallion and jackss. **Journal of Reproducton Fertility**. ISSN 0022-4251. 5 (1963), 109-122.
- Marchetti, C., Obert, G., Defossez, A., Formstecher, P., Marchetti, P. - Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. **Human Reproduction**. ISSN 0268-1161. 17:5 (2002), 1257–1265.
- Maroco, J., 2007. - Análise Estatística com a utilização do SPSS. 3ª ed. Lisboa: Silabo; 2007. 822 pp.
- Maximini, L., Fuerst-Waltl, B., Gredler, B., Baumung, R. – Inbreeding depression on semen quality in Austrian dual-purpose Simmental bulls. **Reproduction in Domestic Animals**. ISSN: 0936- 6768. 46:1 (2011), e102-104.
- May, A.P., Whiteheart, S.W., Weis, W.I. - Unravelling the mechanism of the vesicle transport ATPase NSF, the N-ethylmaleimide-sensitive factor. **The Journal of Biological Chemistry**. ISSN 0021-9258. 276:25 (2001), 21991-21994.
- Mayorga, L.S., Tomes, C.N., Belmonte, S.A. - Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. **IUBMB Life**. ISSN 1521-6551. 59:4-5 (2007), 286-292.
- Merkt, H., Jacobs, K.O., Klug, E., Aukes, E. – An analysis of stallion fertility rates (foals born alive) from the breeding documents of the Landgestiit Celle over 158-year period. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 27 (1979), 73-77.
- Merritt, E.A., Sixma, T.K., Kalk, K.H., van Zanten, B.A., Hol, W.G. - Galactose-binding site in Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). **Molecular Microbiology**. ISSN 1365-2958. 13:4 (1994), 745-753.
- Meyers, S.A., Overstreet, J.W., Liu, I.K., Drobnis, E.Z. - Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 16:1 (1995), 47-54.

- Michaut, M., De Blas, G., Tomes, C.N., Yunes, R., Fukuda, M., Mayorga, L.S. - Synaptotagmin VI participates in the acrosome reaction of human spermatozoa. **Developmental Biology**. ISSN 0012-1606. 235 (2001), 521-529.
- Michaut, M., Tomes, C.N., De Blas, G., Yunes, R., Mayorga, L.S. - Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. ISSN 0027-8424. 97:18 (2000), 9996–10001.
- Miki, K., Qu, W., Goulding, E.H., Willis, W.D., Bunch, D.O., Strader, L.F., Perreault, S.D. [et al.] - Glycer-aldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. ISSN 0027-8424. 101 (2004), 16501–16506.
- Miller, D., Brinkworth, M., Iles, D. - Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetic. **Reproduction**. ISSN 1470-1626. 139 (2010), 287-301.
- Miller, G.L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. ISSN 0003-2700. 31:3 (1959), 426-428,
- Miller, N.J., Rice Evans, C. A. - Spectrophotometric determination of antioxidant activity. **Redox Report**. ISSN 1743-2928. 2 (1996), 161-171.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. - A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**. ISSN 1470-8736. 84:4 (1993), 407-412.
- Ministère de L'Agriculture, de La Pêche et de l'Alimentation (MAPA) - Insémination Artificielle Équine, Guide Pratique. 2^e éd. Paris: Institut du Cheval, Service des Haras, des Courses et de l'Équitation, 1996. ISBN 2-910610-15-2.
- Minneman, K.P., Wurtman, R.J. - Effects of pineal compounds on mammals. **Life Science**. ISSN 0024-3205. 17:8 (1975), 1189-1199.
- Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K. - Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**. 63:9 (2005), 2372-2381.
- Moran, D.M., Jasko, D.J., Squires, E.L., Amann, R.P. - Determination of temperature and cooling rate which induce cold-shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 38 (1992), 291-304.
- Morrell, J.M., Johannisson, A., Dalin, A.M., Hammar, L., Sandebert, T., Rodriguez-Martinez, H. - Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**. ISSN 0044-605X. 50:2. (2008), Disponível em [www.<URL: http://www.actavetscand.com/content/50/1/2](http://www.actavetscand.com/content/50/1/2)
- Morte, M.I., Rodrigues, A.M., Soares, D., Rodrigues, A.S., Gamboa, S., Ramalho-Santos, J. - The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 106:1-2 (2008), 36-47.
- Mukai, C., Okuno, M. - Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 71:2 (2004), 540-547.
- Muratori, M., Marchiani, S., Forti, G., Baldi, E. - Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen. **Human Reproduction**. ISSN 0268-1161. 20:4 (2005), 1035-1043.
- Muratori, M., Porazzi, I., Luconi, M., Marchiani, S., Forti, G., Baldi, E. - AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 25:5 (2004), 797-810.

- Myles, D.G., Primakoff, P., Koppel, D.E. - A localized surface protein of guinea pig sperm exhibits free diffusion in its domain. **Journal of Cell Biology**. ISSN 0021-9525. 98:5 (1984), 1905-1909.
- Naden, J., Amann, R.P., Squires, E.L. - Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022- 4251. 88:1 (1990), 167-176.
- Nagata, S., Tsunoda, N., Nagamine, N., Tanaka, Y., Taniyama, H., Nambo, Y. [et al.] - Testicular inhibin in the stallion: cellular source and seasonal changes in its secretion. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 59:1 (1998), 62–68.
- Naguib, Y.M. - A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. **Analytical Biochemistry**. ISSN 0003-2697. 265:2 (1998), 290–298.
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E.K., Gadella, B.M. - A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 68:5 (2003), 1828-1835.
- Nakanishi, Y., Shiratsuchi, A. - Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. ISSN 0918-6158. 27:1 (2004), 13-16.
- Nascimento, J., Raphael, C.F., Andrade, A.F.C., Alonso, M.A., Celeghini, E.C.C., Arruda, R.P. - Effects of Sperm Concentration and Straw Volume on Motion Characteristics and Plasma, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Equine Cryopreserved Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**. ISSN 0737-0806. 28:6 (2008), 351-358.
- Naz, R.K., Rajesh, P.B. - Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. **Reproductive Biology and Endocrinology**. ISSN 1477-7827. 2 (2004), 75. Disponível em [www:<URL:http://www.rbej.com/content/2/1/75](http://www.rbej.com/content/2/1/75)
- Nebe-von-Caron, G., Stephens, P.J., Hewitt, C.J., Powell, J.R., Badley, R.A. - Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. **Journal of Microbiological Methods**. ISSN 0167-7012. 42:1 (2000), 97-114.
- Neild, D., Chaves, G., Flores, M., Mora, N., Beconi, M., Agüero, A. - Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 51:4 (1999), 721-727.
- Neild, D.M., Brouwers, J.F.H.M., Colenbrander, B., Aguero A., Gadella, B.M. - Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**. ISSN 1040-452X. 72 (2005), 230–238.
- Neild, D.M., Chaves, M.G., Flores, M., Miragaya, M.H., Gonzalez, E., Agüero, A. - The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**. ISSN 0303-4569. 32:6 (2000) 351-355.
- Nevo, A.C., Rikmenspoel, R. - Diffusion of ATP in sperm flagella. **Journal of Theoretical Biology**. ISSN 0022-5193. 26 (1970), 11-18.
- Nikolettos, N., Kiipler, W., Demirel, C., Schopper, B., Blasig, C., Sturm, R., [et al] - Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. *Human Reproduction*. 14:1 (1999), 47-70. **Human Reproduction Update**. ISSN 1355-4786. 3: 5 (1997), 441–452.
- Noiles, E.E., Mazur, P., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Critser, J.K. - Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 48:1 (1993), 99-109.

- Nonno, R., Capsoni, S., Lucini, V., Møller, M., Fraschini, F., Stankov, B. - Distribution and characterization of the melatonin receptors in the hypothalamus and pituitary gland of three domestic ungulates. **Journal of Pineal Research**. ISSN 0742-3098. 18:4 (1995), 207-216.
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., Gagnon, C. - Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology and Medicine**. ISSN 0891-5849. 41:4 (2006), 528-540.
- Oliva, J.L. – Protaines and male infertility. **Human Reproduction Update**. ISSN 1355-4786. 12:4 (2006), 417-435.
- Olson, G.E., Winfrey, V.P., Nagdas, S.K. - Structural modification of the hamster sperm acrosome during posttesticular development in the epididymis. **Microsc. Res. Tech.** 61 (2003), 46-55.
- Ombelet, W., Menkveld, R., Kruger, T.F., Steeno, O., - Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. **Human Reproduction Update**. ISSN 1355-4786. 1:6 (1995), 543-557.
- Oom, M.M. – Avaliação da variabilidade genética. In: [s.n.] Plano de valorização da raça garrano. [ed. lit.], Associação Nacional de Criadores da Raça Garrana; Gerês; 2001. cap. 2º, p. 21-25.
- Oom, M.M. - O cavalo Lusitano. Uma raça em recuperação. [Texto policopiado] Lisboa: Universidade de Lisboa, 1992. Tese de Doutoramento.
- Oom, M.M., Serrano, J. fot. - O cavalo do Sorraia. Um património histórico e genético a preservar. Lisboa: Edições Cosmos; 2006. ISBN 9789727622702.
- Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., Morrell, J.M., Salazar Sandoval, C., Macías García, B., Rodríguez-Martínez, H., Tapia, J.A., Peña, F.J. – Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**. ISSN 1470-1626. 138:1 (2009), 55-63.
- Ostermeier, G.C., Sargeant, G.A., Yandell, B.S., Evenson, D.P., Parrish, J.J. - Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 22:4 (2001), 595-603.
- Paccamonti, D.L., Buiten, A.V., Parlevliet, J.M., Colenbrander, B. - Reproductive parameters of miniature stallions. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 51:7 (1999), 1343-1349.
- Pap, E.H., Drummen, G.P., Winter, V.J., Kooij, T.W., Rijken, P., Wirtz, K.W., Op den Kamp, J.A. [et al.] - Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591). **FEBS Letter**. ISSN 0014-5793. 453:3 (1999), 278-282.
- Parks, J.E., Lynch, D.V. - Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**. ISSN 0011-2240. 29:2 (1992), 255-266.
- Parlevliet, J.M., Colenbrander, B. - Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old Dutch Warmbloods with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm. **Equine Veterinary Journal**. ISSN 0737-0806. 31:3 (1999), 248-251.
- Parlevliet, J.M., Kemp, B., Colenbrander, B. - Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022-4251. 101:1 (1994), 183-187.
- Pattie, W.A., Dowsett, K.F. - Repeatability of seminal characteristics of stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 32 (1982), 9-13.
- Pedersen, H. - Ultrastructure of spermatozoa with abnormal morphology and predominantly single-stranded DNA. **Archives of Andrology**. ISSN 0148-5016. 19:2 (1987), 97-105.
- Perotti, M.E., Giarola, A., Gioria, M. - Ultrastructural study of the decapitated sperm defect in an infertile man. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022-4251. 63:2 (1981), 543-549.

- Pickett, B.W. - Factors affecting sperm production and output. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. Equine Reproduction. 1st ed. Philadelphia: Willians & Wilkins; 1993a. ISBN 0-8121-1427-2. pp. 689-704.
- Pickett, B.W. - Reproductive evaluation of the stallion. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. Equine Reproduction. 1st ed. Philadelphia: Willians & Wilkins; 1993b. ISBN 0-8121-1427-2. pp.755-768.
- Pickett, B.W., Faulkner, L.C., Seidel, G.E., Berndtson, W.E., Voss, J.L. - Reproductive physiology of the stallion. VI. Seminal and behavioral characteristics. **Journal of Animal Science**. ISSN 0021-8812. 43:3 (1976), 617–625.
- Pickett, B.W., Faulkner, L.C., Sutherland, T.M. - Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. **Journal of Animal Science**. ISSN 0021-8812. 31 (1970), 713-728.
- Pickett, B.W., Faulkner, L.C., Voss, J.L. - Effect of season on some characteristics of stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 23 (1975), 25-28.
- Pickett, B.W., Sullivan, J.J., Seidel Jr, G.E. - Reproductive physiology of the stallion V - Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. **Journal of Animal Science**. ISSN 0021-8812. 40 (1975), 917-923.
- Pickett, B.W., Voss, J.L. - The influence of season on seminal characteristics, sexual behaviour and testosterone levels in the stallion. **Thoroughbred Recreation**. 200 (1974), 1604-1608.
- Pinto, J. – Cavalo Lusitano: Filhos do Vento. **ESTA Jornal**. 2007 Junho 29; 13.
- Pio, Duarte, Duque de Bragança, co-aut - Os milénios do Garrano. Vieira do Minho; Associação dos Criadores de Equinos de Raça Garrana, cop. 2000. 107 p. doado pela ATAHCA - Associação de Desenvolvimento das Terras Altas do Homem, Cávado e Ave. Co-financiado pela ATAHCA - Associação de Desenvolvimento das Terras Altas do Homem, Cávado e Ave no âmbito do Programa LEADER II, PT 154310/00.
- Portas, M. C., Leite, J. M. - Livro Genealógico dos Equinos de Raça Garrana. In: 2º Congresso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animais; 2000 Out 19-20; Santarém, Portugal.
- Portas, M. C., Leite, J. M., Sousa, J. J. - A raça Garrana. Um contributo para o seu estudo. **Veterinária Técnica**. ISSN 0872-119X. 8:6 (1998), 18-26.
- Portas, M. C., Vieira-e-Brito, N., Silva-Carvalho, I., Vieira-Leite, J. M. - La conservación de la raza equina Garrana. **Archivos Zootecnia**. ISSN 1885-4494. 50:189-190 (2001), 171-179.
- Potts, R.J., Jefferies, T.M., Notarianni, L.J. - Antioxidant capacity of the epididymis. **Human Reproduction**. ISSN 0268-1161. 14:10 (1999), 2513-2516.
- Pukazhenthil, B.S., Neubauer, K., Jewgenow, K., Howard, J., Wildt, D.E. - The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 66:1 (2006), 112-121.
- Purdy, P.H. - Ubiquitination and its influence in boar sperm physiology and cryopreservation. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 70 (2008), 818-26.
- Rajender, S., Rahul, P., Mahdi, A.A. - Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. **Mitochondrion**. ISSN 1567-7249. 10:5 (2010) 419-428.
- Ramalho-Santos, J., Moreno, R.D., Sutovsky, P., Chan, A.W., Hewitson, L., Wessel, G.M. [et al.] - SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. **Developmental Biology**. ISSN 0012-1606. 223:1 (2000), 54–69.
- Ramalho-Santos, J., Schatten, G., Moreno, R.D. - Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 67:4 (2002), 1043-1051.

- Ramalho-Santos, J., Varum, S., Amaral, S., Mota, P. C., Sousa A.P., Amaral, A. - Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. **Human Reproduction Update**. ISSN 1355-4786. 15 :5 (2009), 553-572.
- Ramamohana, R. A., Bane, A., Gustafsson, B.K. - Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 14:1 (1980), 1–12.
- Rao, B., Soufir, J.C., Martin, M., David, G. - Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. **Gamete Research**. ISSN 0148-7280 24:2 (1989), 127-134.
- Rathi, R., Colenbrander, B., Stout, T.A., Bevers, M.M., Gadella, B.M. - Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. **Molecular Reproduction and Development**. ISSN 1040-452X. 64 (2003), 120–128.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. - Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. ISSN 0891-5849. 26: 9-10 (1999), 1231–1237.
- Reers, M., Smith, T.W., Chen, L.B. - J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**. EISSN 1520-4995. 30:18 (1991), 4480-4486.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Mayo, J.C., Sainz, R.M. - Melatonin and reproduction revisited. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 81:3 (2009), 445-456.
- Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C. , Frenoux, J.M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P., Drevet, J.R. - Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 74 (2006), 1104–1113.
- Retamal, C., Urzúa, J., Alves, E.W., López, M.L. - Cytochemical and electrophoretic study of the stallion epididymal glycoproteins. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**. ISSN 1122-9497. 32:1 (2000a), 117-130.
- Retamal, C., Urzúa, J., Lorca, C., López, M.L., Alves, E.W. - Changes in the plasma membrane proteins of stallion spermatozoa during maturation in the epididymis. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**. ISSN 1122-9497. 32:2 (2000b), 229-239.
- Rhemrev, J.P., van Overveld, F.W., Haenen, G.R., Teerlink, T., Bast, A., Vermeiden, J.P. - Quantification of the nonenzymatic fast and slow TRAP in a postaddition assay in human seminal plasma and the antioxidant contributions of various seminal compounds. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 21:6 (2000), 913-920.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J. - Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods in Enzymology**. ISSN 0076-6879. 234 (1994), 279-293.
- Rietveld, A., Simons, K. - The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. **Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes**. ISSN 0304-4157. 1376:3 (1998), 467–479.
- Robaire, B., Viger, R.S. - Regulation of epididymal epithelial cell functions. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 52:2 (1995), 226-236.
- Rodriguez-Martinez, H. - Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**. ISSN 0936-6768. 38:4 (2003), 312-318.

- Roqueta-Rivera, M., Abbott, T.L., Sivaguru, M., Hess, R.A., Nakamura, M.T. - Deficiency in the Omega-3 Fatty Acid Pathway Results in Failure of Acrosome Biogenesis in Mice. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 85:4 (2011), 721-732
- Roser, J.F. - Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 107:3-4 (2008), 179-196.
- Roser, J.F., Hughes, J.P. - Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations, and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 13:3 (1992), 214-223.
- Rota, A., Penzo, N., Vincenti, L., Mantovani, R. - Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 53:7 (2000), 1415-1420.
- Royo, L.J., Alvarez, I., Beja-Pereira, A., Molina, A., Fernández, I., Jordana, J. [et al.] - The origins of Iberian horses assessed via mitochondrial DNA. **Journal of Heredity**. ISSN 0022-1503. 96:6 (2005), 663-669.
- Ruiz-Lopes, M.J., Evenson, D.P., Espeso, G., Gomendio, M., Roldan, E.R. - High Levels of DNA fragmentation in spermatozoa are associated with inbreeding and poor sperm quality in endangered ungulates. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 83 (2010), 332-338.
- Saacke, R.G. - Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 70:3 (2008), 473-8.
- Saacke, R.G., Dalton, J.C., Nadir, S., Nebel, R.L., Bame, J.H. - Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 60-61 (2000), 663-667.
- Sabeur, K., Ball, B.A. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. **Reproduction**. ISSN 1470-1626. 134 (2007), 263-270.
- Saez, F., Ouvrier, A., Drevet, J.R. - Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. **Asian Journal of Andrology**. ISSN 1008-682X. 13 (2011), 11-17.
- Sailer, B.L., Jost, L.K., Evenson, D.P. - Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 16:1 (1995), 80-87.
- Samper, J. C., Hellander, J.C., Crabo, B.G. - Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion and semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 44 (1991), 107-114.
- Sanocka, D., Kurpisz, M. - Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**. ISSN 1477-7827. 2:12 (2004). Disponível em WWW:<URL:http://www.rbej.com/content/2/1/12.
- Sapan, C.V., Lundblad, R.L., Price, N.C. - Colorimetric protein assay techniques. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. ISSN 0161-7354. Pt 2 (1999), 99-108.
- Schober, D., Aurich, C., Nohl, H., Gille, L. - Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 68:5 (2007), 745-754.
- Schröter, S., Osterhoff, C., McArdle, W., Ivell, R. - The glycocalyx of the sperm surface **Human Reproduction Update**. ISSN 1355-4786. 5:4 (1999), 302-313.
- Schulz, J.R., Wessel, G.M., Vacquier, V.D. - The exocytosis regulatory proteins syntaxin and VAMP are shed from Sea Urchin sperm during the acrosome reaction. **Developmental Biology**. ISSN 0012-1606. 191:1 (1997), 80-87.
- Sedmak, J.J., Grossberg, F.E. - A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**. ISSN 0003-291697. 79:1-2 (1977), 544-552.

- Selvaraj, V., Asano, A., Buttko, D.E., Sengupta, P., Weiss, R.S., Travis, A.J. - Mechanisms underlying the micron-scale segregation of sterols and GM1 in live mammalian sperm. **Journal of Cellular Physiology**. ISSN 0021-9541. 218:3 (2009), 522–536.
- Shaman, J.A., Ward, S.W. - Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. In: De Jonge, CJ; Barratt, CLR, eds. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge: Cambridge University Press; 2006. ISBN-10: 0521853974. pp. 31-48.
- Shannon, P., Curson, B. - Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. **Journal of Dairy Science**. ISSN 0022-0302. 55:5 (1972), 615-620.
- Sharma e Agarwal, 1996). Sharma, R.K., Agarwal, A. - Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**. ISSN: 0090-4295. 48:6 (1996), 835-50.
- Sharp, D.C., Davis, S.D. - Vernal transition. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. *Equine Reproduction*. 1st ed. Philadelphia: Willians & Wilkins; 1993. ISBN 0-8121-1427-2. pp. 133–143.
- Shi, Q., Martin, R.H. - Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. **Reproduction**. ISSN 1470-1626. 121 (2001), 655–666.
- Sieme, H., Katila, T., Klug, E. - Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 61:4 (2004), 769-784.
- Silva, P.F.N., Gadella, B.M. - Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 65:5 (2006), 958-978.
- Simões, J.M.C. - *Fisiologia da Reprodução dos Ungulados Domésticos*. ed. Lisboa: F. C. Gulbenkian; 1984. ISBN 9789723101478.
- Simonneaux, V., Ribelayga, C. - Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacological Reviews**. ISSN 0031-6997. 55:2 (2003), 325-395.
- Simons, K., Ikonen, E. - Functional rafts in cell membranes. **Nature**. ISSN 0028-0836. 387:6633 (1997), 569–572.
- Simons, K., Toomre, D. - Lipid rafts and signal transduction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. ISSN1471-0072. 1:1 (2000), 31-39.
- Singh, R., Leuratti, C., Josyula, S., Sipowicz, M.A., Diwan, B.A., Kasprzak, K.S., Schut, H.A., Marnett, L.J., Anderson, L.M., Shuker, D.E. Lobe-specific increases in malondialdehyde DNA adduct formation in the livers of mice following infection with *Helicobacter hepaticus*. **Carcinogenesis**. ISSN 0143-3334. (2001) 22 (8): 1281-1287.
- Skalet, L.H., Rodrigues, H.D., Goyal, H.O., Maloney, M.A., Vig, M.M., Noble, R.C. - Effects of age and season on the type and occurrence of sperm abnormalities in Nubian bucks. **American Journal of Veterinary Research**. ISSN 0002-9645. 49:8 (1988), 1284–1289.
- Smith, R., Vantman, D., Ponce, J., Escobar, J., Lissi, E. - Total antioxidant capacity of human seminal plasma. **Human Reproduction**. ISSN 0268-1161. 11:8 (1996), 1655-1660.
- Soler, C., Gadea, B., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Estes, M.C., Núñez, J. [et al.] - Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 64:5 (2005), 1236-1243.
- Söllner, T.H., Rothman, J.E. Molecular machinery mediating vesicle budding, docking and fusion. **Cell Structure and Function**. ISSN 0386-7196. 21:5 (1996) 407-412.

- Squires, E.L., Pickett, B.W., Amann, R.P. - Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 27 (1979), 7-12.
- Stankov, B., Fraschini, F., Reiter, R.J. - Melatonin binding sites in the central nervous system. **Brain Research Reviews**. ISSN 0165-0173. 16:3 (1991), 245-256.
- Steeghs, K.; Oerlmans, F.; Wieringa, B. - Mice deficient in ubiquitous mitochondrial creatine kinase are viable and fertile. **Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics**. ISSN 0005-2728. 1230 (1995) 130-138.
- Storey, B.T. - Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**. ISSN 1360-9947. 3:3 (1997), 203-213.
- Storey, B.T. - Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. Storey BT. **International Journal of Developmental Biology**. ISSN: 0214-6282. 52:5-6 (2008), 427-437.
- Sukardi, S., Curry, M.R., Watson, P.F. - Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 46:1-2 (1997), 89-96.
- Sullivan, R., Frenette, G., Girouard, J. - Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. **Asian Journal of Andrology**. ISSN 1008-682X. 9:4 (2007), 483-491.
- Sutovsky, P. - Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: Killing three birds with one stone. **Microscopy Research and Technique: The Biology of Spermatozoa Maturation**. ISSN 1097-0029. 61:1 (2003), 88-102.
- Sutovsky, P., Hauser, R., Sutovsky, M. - Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. **Human Reproduction**. ISSN 0268-1161. 19: (2004), 628-638.
- Sutovsky, P., Manandhar, G. - Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: De Jonge, Christopher J; Barratt, Christopher LR, eds. *The sperm cell – production, maturation, fertilization, regeneration*. New York: Cambridge University Press; 2006. ISBN-13 978-0-521-85397-2. pp.1-30.
- Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Thompson, W.E., Schatten, G. - A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **Journal of Cell Science**. ISSN 0021-9533. 114 (2001), 1665-1675.
- Sutovsky, P., Neuber, E. Schatten, G. - Ubiquitin-dependent, sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects, as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. **Molecular Reproduction and Development**. ISSN 1040-452X. 61 (2002), 406-413.
- Sutovsky, P., Terada, Y., Schatten, G. - Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. **Human Reproduction**. ISSN 0268-1161. 16 (2001), 250-258.
- Sutovsky, P., Turner, R.M., Hameed, S., Sutovsky, M. - Differential ubiquitination of stallion sperm proteins: possible implications for infertility and reproductive seasonality. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 68: (2003), 688-698.
- Swanson, E.W., Bearden, H.J. - An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**. ISSN 0021-8812. 10 (1951) 981-987.
- Swierstra, E.E., Gebauer, M.R., Pickett, B.W. - Reproductive physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022- 4251. 40: (1974), 113-123.
- Teng, F.Y., Wang, Y., Tang, B.L. - The syntaxins. **Genome Biology** 2:11 (2001), reviews3012.1-3012.7. Disponível em WWW:<URL:http://genomebiology.com/2001/2/11/reviews/3012

- Thomas, C.A., Garner, D.L., DeJarnette, J.M., Marshall, C.E. - Fluorometric assessments of acrossomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 56:4 (1997), 991-998.
- Thompson, D.L. Jr, Pickett, B.W., Berndtson, W.E., Voss, J.L., Mett, T.M. - Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behavior and concentrations of LH and testosterone in serum. **Journal of Animal Science**. ISSN 0021-8812. 44:4 (1977), 656-664.
- Thompson, D.L., Jr., Pickett, B.W., Squires, E.L., Amann, R.P. - Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. ISSN 0449-3087. 27 (1979a), 13-17.
- Tischner, M., Kosiniak, K., Bielański, W. - Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. ISSN 0022-4251. 41:2 (1974), 329-335.
- Tombes, R.M., Shapiro, B.M. - Enzymes termini of a phosphocreatine shuttle. Purification and characterization of two creatine kinase isozymes from sea urchin sperm. **The Journal of Biological Chemistry**. ISSN 0021-9258. 262:33 (1987), 16011-16019.
- Tomes, C.N., De Blas, G.A., Michaut, M.A., Farre, E.V., Cherhiti, O., Visconti, P. [et al.] - Alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. **Molecular Human Reproduction**. ISSN 1360-9947. 11:1 (2005), 43-51.
- Tomes, C.N., Michaut, M., De Blas, G., Visconti, P., Matti, U., Mayorga, L.S. - SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. **Developmental Biology**. ISSN 0012-1606. 243:2 (2002), 326-338.
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Kirchhoff, C., Leeb, T., Sieme, H. - The role of stallion seminal proteins in fertilisation. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 89:1-4 (2005), 159-170.
- Travis, A.J., Kopf, G.S. - The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. **The Journal of Clinical Investigation**. ISSN 0021-9738. 110:6 (2002), 731-736.
- Travis, A.J., Merdushev, T., Vargas, L.A., Jones, B.H., Purdon, M.A., Nipper, R.W. [et al.] - Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and guinea pig spermatozoa. **Developmental Biology**. ISSN 0012-1606. 240:2 (2001), 599-610.
- Tremellen, K. - Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. **Human Reproduction Update**. ISSN 1355-4786. 14:3 (2008), 243-258.
- Treviño, C.L., Serrano, C.J., Beltrán, C., Felix, R., Darszon, A. - Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. **FEBS Letter**. ISSN 0014-5793. 509:1 (2001), 119-125.
- Trimble, W.S., Cowan, D.M., Scheller, R.H. - VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. ISSN 0027-8424. 85:12 (1988), 4538-4542.
- Troedsson, M.H.T., Desvousges, A.L., Hansen, P.J., Buhi, W.C. - Equine seminal plasma proteins protect live spermatozoa from PMN-binding and phagocytosis, while providing a mechanism for selective sperm elimination of apoptotic and dead spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 94:1-4 (2006), 60-61.
- Trokey, D.E., Merilan, C.P. - Effect of added cold shocked cells upon the viability of pony stallion spermatozoa. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 18:6 (1982), 723-725.
- Tsai, P.S., De Vries, K.J., De Boer-Brouwer, M., Garcia-Gil, N., Van Gestel, R.A., Colenbrander, B. [et al.] - Syntaxin and VAMP association with lipid rafts depends on cholesterol depletion in capacitating sperm cells. **Molecular Membrane Biology**. ISSN 0968-7688. 24:4 (2007), 313-324.

- Turner, T.T. - De Graaf's Thread: review the human epididymis. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 29:3 (2008), 237-250.
- Ungermann, C., Nichols, B.J., Pelham, H., Wickner, W. - Vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. **The Journal of Cell Biology**. ISSN 0021-9525. 140:1 (1998), 61-69.
- Urner, F., Sakkas, D. - Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. **Reproduction**. ISSN 1470-1626. 125:1 (2003), 17-26.
- van Eldik, P., van der Waaij, E.H., Ducro, B., Kooper, A.W., Stout, T.A.E., Colenbrander, B. - Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 65:6 (2006), 1159-1170.
- van Gestel, R.A., Brewis, I.A., Ashton, P.R., Helms, J.B., Brouwers, J.F., Gadella, B.M. - Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. **Molecular Human Reproduction**. ISSN 1360-9947. 11:8 (2005), 583-590.
- Varum, S., Bento, C., Sousa, A.P., Gomes-Santos, C.S., Henriques, P., Almeida-Santos, T. [et al.] - Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 87:3 (2007), 572-583.
- Verhage, M., Toonen, R.F. - Regulated exocytosis: merging ideas on fusing membranes. **Current Opinion in Cell Biology**. ISSN 0955-0674. 19:4 (2007), 402-408.
- Vernet, P., Aitken, R.D., Drevet, J.R. - Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**. ISSN: 0303-7207. 216:1-2 (2004), 31-39.
- Vicente, A., Carolino, N., Gama, L.T. - Indicadores demográficos no cavalo lusitano. **Archivos de Zootecnia**. EISSN 1885-4494. 58:supl. 1 (2009), 501-504.
- Vidament, M., Duper, A.M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P. Palmer, E. - Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 48:6 (1997), 907-917.
- Vidament, M., Magistrini, M., Palmer, e., Clement, F. - Equine artificial insemination in French National Studs. **Reproduction in Domestic Animals**. ISSN 0936-6768. Suppl. 6 (1999), 61-66.
- Vilà, C., Leonard, J.A., Gotherstrom, A., Marklund, S., Sandberg, K., Liden, K. [et al.] - Widespread origins of domestic horse lineages. **Science**. ISSN 0036-8075. 291:5503 (2001), 474-477.
- Visconti, P.E., Ning, X., Fornés, M.W., Alvarez, J.G., Stein, P., Connors, S.A., Kopf, G.S. - Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. **Developmental Biology**. ISSN 0012-1606. 214:2 (1999), 429-443.
- Vist, M.R., Davis, J.H. - Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ²H Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry. **Biochemistry**. ISSN 0006-2960. 29:2 (1990), 451-464.
- Voss, J.L., Pickett, B.W., Squires, E.L. - Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationships to fertility. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. ISSN 0003-1488. 178:3 (1981), 287-289.
- Wang, X., Sharma, R.K., Gupta, A., George, V., Thomas, A.J., Falcone, T. [et al.] - Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertility and Sterility**. ISSN 0015-0282. 80: 2 (2003), 844-850.
- Ward, W.S., Coffey, D.S. - DNA packing and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biology of reproduction**. 44 (1991), 569-574.

- Warmuth, V., Eriksson, A., Bower, M.M., Cañon, J., Cothran, G., Dist, O. [et al.] - European Domestic horses originated in two Holocene refugia. **PLoS ONE**. ISSN 1932-6203. 6:3 (2011), e18194.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F. [et al.] - SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion. **Cell**. EISSN 1097-4172. 92:6 (1998), 759-772.
- Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., Kinne, R. K. H. - Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport and signal transduction. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. ISSN 0303-4240. 148 (2003), 1–80.
- Wildt, D.E., Baas, E.J., Charkraborty, P.K., Wolfle, T.L., Stewart, A.P. – Influence of inbreeding on reproductive performance, ejaculate quality and testicular volume in the dog. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 17:4 (1982), 445-452.
- Wildt, D.E., Bush, M., Goodrowe, K.L., Packer, C., Pusey, A.E., Brown, J.L. [et al.] - Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. **Nature**. ISSN 0028-0836.. 329 (1987), 328-331.
- Wildt, D.E., Bush, M., Howard, J.G., O'Brien, J., Meltzer, D., Van Dyk, A. [et al.] – Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 29 (1983), 1019-1025.
- Wilhelm, K.M., Graham, J.K., Squires, E.L. - Comparison of the fertility of cryopreserved stallion sperm with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 46 (1996), 559–578.
- Williams, E.E. - Membrane lipids: what membrane physical properties are conserved during physiochemically-induced membrane restructuring? **American Zoologist**. EISSN 1557-7023. 38:2 (1998), 280-290.
- Wnuk, M., Lewinska, A., Oklejewicz, B., Bartosz, G., Tischner, M., Bugno-Poniewierska, M. - Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. **Theriogenology**. ISSN 0093-691X. 74:9 (2010), 1677-1684.
- Wolf, D.E., Voglmayr, J.K. - Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa. **The Journal of Cell Biology**. ISSN 0021-9525. 98:5 (1984), 1678-1684.
- Wrench, N., Pinto, C.R., Klinefelter, G.R., Dix, D.J., Flowers, W.L., Farin, C.E. - Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. **Animal Reproduction Science**. ISSN 0378-4320. 119:3-4 (2010), 219-227.
- Yanagimachi, R. Mammalian Fertilization. In: Knobil, E; Neil, JD, eds. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, Ltd; 1974. pp.189-281.
- Yeung, C.H., Barfield, J.P., Cooper, T.G. - Physiological volume regulation by spermatozoa. **Molecular and Cellular Endocrinology**. ISSN: 0303-7207. 250:1-2 (2006), 98-105.
- Yeung, C.H., Cooper, T.G.- Acquisition and development of sperm motility upon maturation in the epididymis. In: Robaire, B; Hinton, BT, eds. The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. ISBN 0-306-46684-8. pp. 417–434.
- Yeung, C.H., Majumder, G.C., Rolf, C., Behre, H.M., Cooper, T.G. - The role of phosphocreatine kinase in the motility of human spermatozoa supported by different metabolic substrates. **Molecular Human Reproduction**. ISSN 1360-9947. 2:8 (1996), 591-596.
- Yeung, F., Tuttelmann, M., Bergmann, V., Nordhoff, E., Vorona, T.G., Cooper - Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication. **Human Reproduction**. ISSN 0268-1161. 24:6 (2009), 1288–1295.

- Yoshinaga K., Toshimori, K. - Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. **Microscopy Research and Technique**. ISSN 1097-0029. 61:1 (2003), 39–45.
- Young, K.A., Zirkin, B.R., Nelson, R.J. -Testicular Apoptosis Is Down-Regulated during Spontaneous Recrudescence in White-Footed Mice (*Peromyscus leucopus*). **Journal of Biological Rhythms**. ISSN 0748-7304. 16:5 (2001), 479-488.
- Young, K.E., Robbins, W.A., Xun, L., Elashoff, D., Rothmann, S.A., Perreault, S.D. - Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. **Journal of Andrology**. ISSN 0196-3635. 24:6 (2003), 853-861.
- Yunes, R., Michaut, M., Tomes, C., Mayorga, L. - Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. **Biology of Reproduction**. ISSN 0006-3363. 62:4 (2000), 1084-1089.
- Zalata, A.A., Christophe, A.B., Depuydt, C.E., Schoonjans, F., Comhaire, F.H. - The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. **Molecular Human Reproduction**. ISSN 1360-9947. 4:2 (1998), 111-118.
- Zini, A., de Lamirande, E., Gagnon, C. - Reactive oxygen species in the semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **International Journal of Andrology**. ISSN: 0105-6263. 16:3 (1993), 183-188.
- Zini, A., Garrels, K., Phang, D. - Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**. ISSN: 0090-4295. 55:6 (2000), 922-926.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., Sollott, S.J. - Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. **Biochimica et Biophysica Acta**. ISSN 0304-4165. 1757:5-6 (2006), 509-517.