

DEDALUS - Acervo - FMVZ



11300026475

**HENRY BERGER DE ALMEIDA**

**Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina e tiroxina e a longevidade de sêmen eqüino resfriado**

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

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de Concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2004

10 3166

N.º CLASSIFICAÇÃO T. 1364 FMVZ
N.º TOMBO 023159

Ano 1389591  
Sabi 602

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

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1364 Almeida, Henry Berger de  
FMVZ Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina e tiroxina e a longevidade de sêmen eqüino resfriado / Henry Berger de Almeida. -- São Paulo : H. B. Almeida, 2004.  
137 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.  
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Garanhões. 2. Sêmen animal. 3. Hormônios sexuais.  
4. Hormônios da tireóide. I. Título.

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: ALMEIDA, Henry Berger de

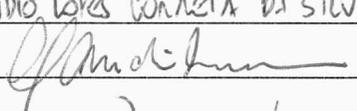
Título: Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina e tiroxina e a longevidade de sêmen eqüino resfriado.

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

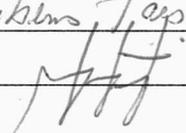
Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

### Banca Examinadora

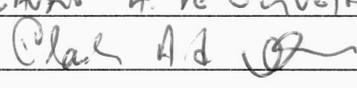
Prof. Dr. LUIS CUNHA LOPES CORREIA DA SILVA Instituição FMVZ - USP

Assinatura  Julgamento APROVADO

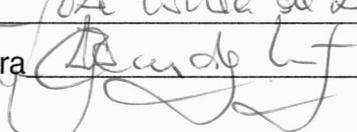
Prof. Dr. Rubens Pires de Almeida Instituição FMVZ / USP

Assinatura  Julgamento Aprovado

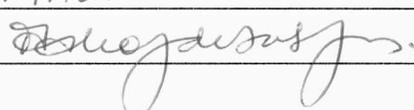
Prof. Dr. CLAYTON A. DE OLIVEIRA Instituição FMVZ - USP

Assinatura  Julgamento APROVADO

Prof. Dr. Joze Carlos de Almeida Neto Instituição UNESP

Assinatura  Julgamento Aprovado

Prof. Dr. TATIANA LUIZ DE SALES GONÇALVES Instituição Assoc de Equinos SG e Foz

Assinatura  Julgamento APROVADO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

...infinitamente a Deus pela vida, saúde, disposição, misericórdia e benignidade para comigo e para com os meus.

...à minha esposa Emillene, companheira compreensiva e amorosa, muitas vezes sacrificada em silêncio ao longo de mais esta caminhada.

...ao meu filhinho Henrique, que, mesmo sem saber, tem sido um grande incentivador dos projetos de vida do papai.

...à minha família, que constitui a sólida base da formação de meu caráter e personalidade.

...ao Prof. Rubens Paes de Arruda, que, além de um grande tutor e mestre, tornou-se naquilo que realmente podemos chamar de amigo.

...ao Prof. Cláudio Alvarenga, pela orientação e companheirismo sempre presentes.

...aos colegas Carla Eneiva Celeghini, Fernando Rebellatto e Érica (LDH), pelo inestimável, fundamental e determinante auxílio nas análises seminais e dosagens hormonais.

...à Merial Saúde Animal, particularmente na pessoa do Sr. Carlos Honorato, que, além de todo o suporte financeiro deste projeto, soube valorizar-me como profissional, apoiar-me e apostar no futuro de minha carreira.

## RESUMO

ALMEIDA, H. B. **Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina e tiroxina e longevidade de sêmen eqüino resfriado.** [Plasma concentrations of estradiol, testosterone, triiodothyronine and thyroxine and longevity of cooled equine semen]. 2004. 137 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Diversos fatores respondem por variações na viabilidade do sêmen eqüino e na sua qualidade espermática; em humanos, reportam-se correlações entre fatores endócrinos e parâmetros seminais, mas em eqüinos poucos estudos contribuem para esta correlação. Para se investigar eventuais correlações entre hormônios sexuais e tireoideanos com as características seminais físicas e morfológicas, além de longevidade seminal, foram mensuradas as concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> de garanhões e analisadas tais características espermáticas no momento da colheita seminal e após 24, 48 e 72 hs de armazenamento a 5°C. 05 garanhões férteis em idade reprodutiva foram submetidos à colheita de sêmen (2 vezes/semana) e sangue (1 vez/semana, a cada 6 horas) durante 6 semanas. Estradiol, testosterona, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> foram analisados por RIE. Após a colheita, o sêmen foi analisado e resfriado a 5°C, com análises subseqüentes após 24, 48 e 72 hs de armazenamento. O sêmen foi avaliado quanto às características seminais físicas e morfológicas, além de integridade de membrana. Significativas (p<0.05) diferenças foram observadas entre os animais quanto às concentrações hormonais; o estradiol mostrou as maiores variações entre indivíduos, embora todos os resultados tenham se mostrado compatíveis aos valores de referência da literatura. Logo após a colheita, não se observou diferenças

significativas ( $p < 0.05$ ) para vigor e motilidade total/progressiva, em exceção ao ganhão 4, que apresentou significativa menor motilidade progressiva inicial. Após 24, 48 e 72 hs de resfriamento, diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) foram observadas entre os ganhões; os menores índices de vigor/motilidade progressiva foram observados nos ganhões 1 e 4. Diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) também foram observadas entre os animais para as características espermáticas morfológicas e integridade de membrana. Análises de covariância e correlações não demonstraram correspondência entre concentrações hormonais, longevidade espermática e características seminais físicas/morfológicas, tendo “tempo de resfriamento” e “indivíduos” como fatores. Correlação positiva foi observada entre motilidade progressiva/vigor e espermatozóides vivos com acrossomo intacto ( $r = 0,70$  e  $r = 0,71$ , respectivamente); em analogia, correlação negativa foi encontrada entre motilidade progressiva/vigor e espermatozóides com acrossomo intacto ( $r = -0,70$  e  $r = -0,72$ , respectivamente), indicando que, vivos ou mortos, apresentar acrossomo intacto é fator crítico para a viabilidade espermática mesmo após diferentes tempos de armazenamento em resfriamento. Os resultados mostram que a longevidade do sêmen eqüino provavelmente não é diretamente afetada por razões hormonais primárias; o mesmo pode ser considerado para morfologia espermática. Por outro lado, a longevidade do sêmen eqüino parece ser diretamente influenciada pela integridade de membrana espermática e eventualmente fatores bioquímicos, metabólicos e enzimáticos.

Palavras-chave: ganhões, sêmen animal, hormônios sexuais, hormônios da tireóide.

## ABSTRACT

ALMEIDA, H. B. **Plasma concentrations of estradiol, testosterone, triiodothyronine and thyroxine and longevity of cooled equine sêmen.** [Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina e tiroxina e a longevidade de sêmen eqüino resfriado]. 2004. 137 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Several factors respond for variations of equine semen viability and sperm quality; in humans, scientific reports try to correlate endocrine issues and sperm parameters. In horses, few studies contribute to this correlation. In order to investigate eventual correlations between sexual and thyroid hormones with physical and morphologic characteristics and also longevity of equine semen, were measured plasma concentrations of estradiol, testosterone,  $T_3$  and  $T_4$  of stallions and analyzed physical and morphologic characteristics and membrane integrity of spermatozoa at the moment of collection and after 24, 48 and 72 hours of storage at 5°C. Five fertile stallions in reproductive age had semen (twice a week) and blood (once a week, every 6 hours) collected during 6 weeks. Estradiol, testosterone,  $T_3$  and  $T_4$  were analyzed by RIA. After collection, semen was analyzed and cooled at 5°C, with further analyses after 24, 48 and 72 hours of storage. Semen analysis consisted in physical, morphologic and membrane integrity characteristics. Significant ( $p<0.05$ ) differences were observed among stallions when compared for plasma hormonal concentrations; estradiol showed the greater variations between individuals, despite all results were compatible to reference values in literature. Just after collection, no significant differences ( $p<0.05$ ) were observed for vigor and total/progressive motility, in exception to stallion 4, that presented a significant lower initial progressive motility. After 24, 48 and 72 hours of storage, significant differences ( $p<0.05$ ) were observed among stallions; lowest values

of vigor/progressive motility were observed for stallions 1 and 4. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were also observed among stallions for morphologic characteristics of sperm and membrane integrity. Analyses of covariance and correlations showed no correspondence among hormonal plasma concentrations, sperm longevity and physical/morphologic characteristics, having time of storage and individuals as factors. Meanwhile, a positive correlation was observed among progressive motility/vigor and live sperm with intact acrosome ( $r = 0.70$  and  $r = 0.71$  respectively); in analogy, a negative correlation was found among progressive motility/vigor and dead sperm with intact acrosome ( $r = -0.70$  and  $r = -0.72$  respectively), indicating that neither being live or dead, but having acrosome membrane intact is a critical factor for spermatozoa's viability even after different times of storage at cooling temperatures. Results show that longevity of equine semen is probably not directly affected by primary hormonal reasons; the same can be considered for sperm morphology. Otherwise, longevity of equine semen seems to be directly influenced by sperm membrane integrity and eventually by biochemical, metabolic and enzymatic factors.

Key words: stallions, cooled semen, sexual hormones, thyroid hormones.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	CONTROLE ENDÓCRINO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA.....	14
2.1.1	Testosterona.....	17
2.1.2	Estradiol.....	21
2.2	TIREÓIDE E FISILOGIA TIREOIDEANA.....	24
2.2.1	Hormônios Tireoideanos e a Função Reprodutiva.....	26
2.2.2	Hormônios Tireoideanos em Eqüinos.....	31
2.3	ANÁLISE SEMINAL EM GARANHÕES.....	35
2.4	VIABILIDADE ESPERMÁTICA E INTEGRIDADE DE ACROSSOMO.....	41
2.5	QUALIDADE E VIABILIDADE DO SÊMEN EQÜINO RESFRIADO.....	43
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	53
3.1	GERAIS.....	53
3.2	ESPECÍFICOS.....	53
4	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	54
4.1	MATERIAIS.....	54
4.2	MÉTODOS.....	54
4.2.1	Avaliação Prévia dos Animais.....	55
4.2.2	Manejo dos Animais.....	55
4.2.3	Colheita de Sangue.....	56
4.2.4	Dosagens das Concentrações Plasmáticas Hormonais.....	57
4.2.5	Controle de Qualidade dos Radioimunoensaios.....	57
4.2.6	Colheitas de Sêmen.....	58
4.2.7	Resfriamento Seminal.....	58
4.2.8	ANÁLISES SEMINAIS.....	59
4.2.8.1	Técnicas de Análise Seminal Física.....	60
4.2.8.2	Técnicas de Análise Seminal Morfológica.....	61
4.2.8.3	Técnicas de Análise de Integridade de Membrana.....	62

4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5	<b>RESULTADOS</b> .....	64
5.1	Raça, Idade e Peso Corporal.....	64
5.2	Concentrações Plasmáticas Hormonais.....	64
5.3	Características Seminais Físicas.....	65
5.4	Morfologia Espermática.....	76
5.5	Integridade de Membrana.....	83
5.6	Análises de Covariâncias e Correlações.....	91
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	94
6.1	Idade e Peso Corporal.....	94
6.2	Testosterona e Estradiol.....	97
6.3	Hormônios Tiroideanos.....	100
6.4	Características Seminais.....	105
6.5	Correlações entre Concentrações Plasmáticas Hormonais e Características Seminais.....	108
6.6	Correlações entre Características Seminais e Integridade de Membrana.....	111
6.7	Possíveis Fatores Interferentes na Longevidade de Sêmen Equino Resfriado.....	112
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	119
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	121

## 1 INTRODUÇÃO

Há muito que a reprodução eqüina têm sido pródiga colaboradora da teriogenologia animal. Neste aspecto, vale lembrar o início do desenvolvimento da ultrasonografia veterinária, os grandes avanços obtidos na inseminação artificial e transferência de embriões, relevantes estudos concernentes à dinâmica folicular e, impossível não citar, modelos e padrões endócrinos típicos à espécie, quesitos estes de fundamental importância à reprodução animal como um todo e que encontraram na espécie eqüina modelo de estudo único.

De acordo com relatos lendários, há milhares de anos nas escaldantes areias dos desertos árabes, padreadores de elevado valor zootécnico da indescritível raça Árabe mostravam-se como objeto de desejo de beduínos interessados em promover melhoramento genético de suas tropas; entretanto, muitos clãs eram rivais entre si, impossibilitando qualquer contato cordial que permitisse tal aproximação entre éguas e garanhões. Conhecedores de que a “gênese de tudo” residia no “precioso líquido” dos garanhões, a alternativa mais viável para a obtenção do mesmo passou a consistir nos roubos realizados furtivamente entremeio às trevas desérticas (ABCCA, 2002).

Lenda ou não, percebe-se que o interesse em métodos viáveis de conservação de sêmen na espécie eqüina é escopo antigo de estudo. Entretanto, não somente a viabilidade, mas também a qualidade do sêmen conservado e sua conseqüente capacidade de fertilização, têm sido intensamente investigadas por parte da comunidade científica ao longo dos últimos anos (GRAHAM, 1996). O resfriamento e transporte de sêmen à temperatura de 5°C para posterior inseminação artificial em éguas têm sido prática rotineira na criação de eqüinos (JASKO et al., 1991),

apresentando resultados vantajosos quando comparados aos obtidos com sêmen congelado, visto o alto custo da criopreservação e baixa fertilidade de sêmen de garanhões submetidos a esta técnica (KLUG, 1989).

Diferentes garanhões apresentam diferentes características seminais físicas e morfológicas (GOËTZE, 1987) na dependência de raça, idade, manejo, alimentação, repouso sexual, mas principalmente particularidades individuais. Apesar de não constituir em método seguro de prognóstico da capacidade fecundante de determinado garanhão, a motilidade espermática se mostra extremamente útil na avaliação da viabilidade e longevidade dos espermatozóides (PAPA, 1987).

Sabe-se que diversos são os fatores influenciadores sobre a viabilidade e qualidade espermática, principalmente no tocante à motilidade; dentre eles podemos citar os diferentes protocolos de resfriamento e congelamento seminal, além de fatores físicos, morfológicos, bioquímicos, histoquímicos e metabólicos inerentes ao espermatozóide e suas membranas (TROEDSSON et al., 1998). Mais recentemente têm se descrito que patologias espermáticas, bem como integridade de membrana, podem se constituir em fatores críticos à viabilidade espermática e, conseqüentemente, à fertilidade de garanhões (BLACH et al., 1988; JASKO et al., 1992).

Entretanto, pouco se sabe sobre a importância e impacto do perfil hormonal nestes aspectos; na espécie humana, diversos trabalhos discorrem sobre viabilidade espermática e fertilidade *versus* perfis endócrinos, fato não observado com freqüência e intensidade na espécie eqüina (ABALOVICH et al., 1999).

A testosterona é o elemento essencial à manutenção e restabelecimento da função espermatogênica de cavalos adultos, sendo capaz, isoladamente, de manter de forma qualitativa, a espermatogênese completa (INOUE et al., 1993). A grande

quantidade de estrógenos produzidos pelo testículo eqüino atua na maturação funcional dos espermatozóides e fertilidade, além de agir diretamente sobre o desenvolvimento das células de Leydig (HOFFMAN; LANDECK, 1999). Embora artigos descrevam consistentemente padrões e perfis típicos de destes hormônios sexuais na espécie eqüina, suas interrelações com a fertilidade são pouco conhecidas.

Embora sejam relacionadas diversas alterações na esfera reprodutiva em animais portadores de hipo ou hipertireoidismo de diversas espécies domésticas (MCDONALD; PINEDA, 1989), pouco se sabe sobre os efeitos diretos dos hormônios tireoideanos no testículo humano e animal, bem como eventuais relações com a viabilidade e qualidade espermática nestas espécies.

Por tais razões este trabalho teve por objetivo conhecer mais proximamente eventuais correlações existentes entre hormônios sexuais e tireoideanos com a longevidade de sêmen eqüino resfriado, procurando responder às seguintes hipóteses experimentais:

- Há correlações entre as concentrações plasmáticas de hormônios sexuais e tireoideanos com as principais características físicas e morfológicas dos espermatozóides eqüinos?
- Há correlações entre concentrações plasmáticas de hormônios sexuais e tireoideanos com a longevidade espermática do sêmen eqüino, após seu resfriamento a 5°C?

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Bem conhecido e documentado pela literatura técnica mundial é o fato de que o perfeito e normal funcionamento da função reprodutiva do garanhão, inclusa a espermatogênese, é estritamente dependente do eixo hipotalâmico-pituitário-testicular, envolvendo sincronia fina entre controles endócrinos de liberação e mecanismos de “feed-back” hormonais, e mesmo modulações parácrinas e autócrinas.

### **2.1 Controle Endócrino da Função Reprodutiva do Garanhão**

A glândula pineal, principal fonte da amina indólica melatonina, foi pela primeira vez reconhecida por anatomistas gregos, que a reputaram como uma espécie de válvula responsável pelo “fluxo dos pensamentos”. Mais tarde, René Descartes expandiu tal idéia, propondo que a pineal seria responsável pela “tradução” de mensagens cerebrais para a execução de ações músculo-esqueléticas: surgia o primeiro conceito de transmissor neuroendócrino (SHARP; CLEAVER, 1993). Hoje se sabe que esta glândula tem papel fundamental na mediação dos efeitos do fotoperíodo sobre a reprodução, através da citada melatonina, que por sua vez é resultante do catabolismo da serotonina. A síntese e secreção de melatonina são muito elevadas durante a escuridão e a duração desta secreção elevada é estreitamente correspondente à extensão do período de escuridão (HAFEZ, 1996; SOUZA, 1999).

A melatonina é de particular importância para a determinação do ciclo reprodutivo anual relacionado à duração da luminosidade diária em animais que tenham atividade sexual com base estacional, como ovinos, caprinos e veados, que se reproduzem em fotoperíodos decrescentes, ou eqüinos, furões e lebres, que se reproduzem sob fotoperíodo crescente (SOUZA, 1999).

Nos eqüinos, a atividade elétrica resultante da fotoestimulação na retina é conduzida através de fibras nervosas especializadas diretamente ao núcleo supraquiasmático hipotalâmico; uma vez alcançada a pineal, esta converte tais impulsos elétricos em sinais hormonais por mecanismos ainda desconhecidos no eqüino, que toma a forma de ritmo circadiano de produção de melatonina. Tal transmissão neuroendócrina promove a secreção de melatonina durante os períodos de escuridão e inibição da secreção da mesma durante períodos de maior luminosidade.

A melatonina pode agir diretamente sobre as células da hipófise anterior ou ainda em outros locais no cérebro para influenciar a atividade hipofisária, pois há receptores de melatonina em grande número na *pars tuberalis* da hipófise e também em outros locais específicos do cérebro, como hipocampo e septo lateral (LINCOLN, 1992). A partir desta ação, a melatonina possivelmente influencia a atividade neural no hipotálamo médio-basal ou em áreas adjacentes, estimulando a liberação de peptídeos regulatórios.

Uma vez recebido devido estímulo, o hipotálamo do garanhão secreta Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) em padrões pulsáteis, por sua vez responsável pela estimulação da produção e secreção de gonadotrofinas, ou seja, Hormônio Luteinizante (LH) e Hormônio Folículo Estimulante (FSH). No testículo, as células de Leydig são estimuladas a produzir e secretar estrógenos e testosterona através do LH,

sempre em proporção dose-resposta. Já o FSH liga-se à célula de Sertoli, estimulando-a a secretar inibina, ativina, proteínas ligadoras de andrógenos (ABP) e outros fatores necessários à espermatogênese (ROSER, 2001).

Por outro lado, proteínas testiculares e hormônios esteróides modulam a secreção de GnRH, LH e FSH através dos mencionados mecanismos de “feed-back”: testosterona inibindo GnRH, porém sem efeito sobre LH, e estrógenos exercendo efeito de “feed back” positivo sobre LH ao nível pituitário. Tanto testosterona quanto estrógenos parecem exercer controle negativo sobre a liberação de FSH no ganhão (ROSER, 2001).

De acordo com diversas revisões disponíveis na literatura, a testosterona mostra-se como elemento essencial à manutenção e restabelecimento da função espermatogênica no testículo de animais adultos. Muito embora o FSH pareça mostrar influência sobre a quantidade de espermatozóides produzidos, a testosterona é capaz, isoladamente, de manter qualitativamente a espermatogênese completa (GANJAM; KENNEY, 1975; INOUE et al., 1993; IRVINE; ALEXANDER, 1988).

O testículo eqüino, diferentemente de em outras espécies, produz grandes quantidades de estrógenos, que apresentam preponderante papel no mecanismo de produção espermática ao lado da testosterona e do FSH; tal papel reside na necessidade de estrógenos para a maturação funcional dos espermatozóides e fertilidade, além de ação sobre o desenvolvimento das células de Leydig e modulação de sua esteroideogênese (HOFFMAN; LANDECK, 1999; NADEN; AMANN; SQUIRES, 1990).

Ultimamente têm-se sugerido que o testículo talvez seja o principal sítio de disfunções reprodutivas no ganhão; tal hipótese se respalda nos fatos de que

garanhões inférteis apresentam concentrações significativamente menores de testosterona como resposta a desafios com gonadotrofina coriônica humana (hCG) em altas doses (10.000 UI) e de que disfunções hipotalâmicas-pituitárias não parecem ser problemas primários. Tecidos testiculares de garanhões férteis, inférteis e subférteis foram analisados quanto à atividade de ligação de receptores para LH e demonstrou-se que o número e afinidade destes receptores não declinaram em casos de menor fertilidade (ROSER; HUGHES, 1992).

Sendo assim, a hipótese atualmente mais aceita para casos de infertilidade ou subfertilidade idiopática em garanhões, reside em desordens testiculares de caráter parácrino e/ou autócrino, causados por agentes diversos tais quais toxinas, drogas, medicamentos, estresse, esteróides exógenos, nutrição inadequada e fatores genéticos; estas desordens levam a perturbações testiculares envolvendo disfunções tanto em células de Leydig e Sertoli quanto em células germinativas. Por sua vez, tais disfunções podem tanto levar à degeneração testicular com subfertilidade e infertilidade diretamente relacionada, quanto a desbalanço hormonal significativo, que em última análise resulta indiretamente na mesma circunstância final desfavorável (ROSER, 2001).

### **2.1.1 Testosterona**

Conforme já anteriormente discutido, a testosterona é essencial para a manutenção e restauração da espermatogênese nos testículos de animais adultos (MATSUMOTO, 1989; WEINBAUER; NIESCHLAG, 1993) em sinergia à secreção de

FSH. De acordo com Zirkin et al. (1994), a testosterona isoladamente é capaz de manter qualitativamente a completa espermatogênese, enquanto que o papel do FSH parece residir na influência quantitativa dos espermatozoides produzidos aos níveis pré e pós-meióticos. Neste aspecto, Hinojosa et al. (2001) reportam que pouco se sabe sobre o controle endócrino da reprodução de garanhões envolvendo andrógenos testiculares e gonadotrofinas, estas consideradas como elementos centrais na regulação da espermatogênese e libido.

Ganjam e Kenney (1975) compararam as concentrações séricas de andrógenos totais, testosterona e estrógenos totais em garanhões normais e criptorquídicos, demonstrando que as concentrações de andrógenos totais se mostraram significativamente mais baixas em animais bilateralmente criptorquídicos que nos demais grupos.

Mais tarde, Inoue et al. (1993) determinaram as concentrações plasmáticas de testosterona e estrógenos em garanhões classificados como normais ou inférteis (azoospermicos), com resultados significativamente diferentes entre os grupos. Animais azoospermicos demonstraram testosterona sérica significativamente mais baixa que garanhões normais, comprovando que a mensuração deste hormônio pode fornecer sensível índice da função endócrina testicular de garanhões.

Hoffmann e Landeck (1999), no sentido de reunir maiores informações sobre a função gonadal de garanhões, também avaliaram as concentrações séricas e seminais de esteróides testiculares, assim como sua distribuição no ejaculado. Para testosterona, o esteróide livre dominante no plasma sangüíneo, a concentração obtida foi de  $570,6 \pm 1,43$  pg/mL, denotando alta correlação com estradiol plasmático, cuja concentração observada foi de  $31,1 \pm 1,16$  pg/mL. Também se observou alta correlação entre

estrógenos plasmáticos e seminais, sendo que o principal esteróide livre no plasma seminal foi a estrona.

No que concerne às variações nas concentrações plasmáticas de testosterona em função de estação do ano, bem como outros fatores influenciadores como idade e maturidade sexual, diversos trabalhos têm sido publicados.

Burns et al. (1982) descrevem que garanhões expostos a períodos crescentes de fotoperíodo denotam significativo aumento das concentrações séricas de testosterona, assim como também de dehidroepiandrosterona (DHA), androstenediona e estrona no início da estação reprodutiva, enquanto que concentrações de estradiol  $17\beta$  e de estrógenos totais mostraram-se similares em ambos grupos.

Braun et al. (1996) também descrevem que as concentrações séricas de testosterona mostraram-se, em seu estudo, mais baixas no período fora da estação reprodutiva, assim como Clay et al. (1988), que encontraram variações definidas pelo fotoperíodo para testosterona, FSH e LH plasmáticos. Entretanto, contrariamente a estes resultados, Stewart e Roser (1998), analisando aspectos relacionados à idade em machos entre 02 meses e 25 anos de idade, não encontraram nenhuma variação nas concentrações plasmáticas de testosterona em função da estação reprodutiva; entretanto, à medida que a idade dos animais aumentava, sua concentração plasmática também se elevava até a maturação testicular. A partir de então nenhum efeito de idade pôde ser observado nos garanhões adultos, assim como nenhuma diferença também pôde ser observada entre animais férteis e subférteis quanto à concentração plasmática de testosterona.

No mesmo ano em que Clay et al. (1988) publicaram trabalho mostrando diferenças estacionais significativas nas concentrações de testosterona, Cox, Redhead

e Jawad (1988) também publicaram trabalho análogo, em que o padrão plasmático de testosterona apresentou marcada tendência estacional, com picos de concentração durante a primavera e valores mais baixos durante o inverno. Contrariando estes resultados, Thompson et al. (1985) publicaram artigo em que mostraram não ter havido diferenças no padrão de secreção de testosterona, LH e FSH em ambas estações (reprodutiva e não reprodutiva); além do mais, de acordo com o padrão de secreção demonstrado ao longo do período experimental, os resultados indicaram que apenas a colheita de uma única amostra de sangue pode ser representativa para sinalizar a concentração global destes hormônios, uma vez que, diferentemente de outras espécies domésticas, as gonadotropinas e a testosterona do garanhão variam de forma muito menos pulsátil.

Já Amann (1993) publicou tabela em que demonstra variação de até 25% nas concentrações de testosterona obtidas entre diversos garanhões durante as estações reprodutiva e não reprodutiva, com valores variando entre 27 ng/mL (estação não reprodutiva) e 36 ng/mL (estação reprodutiva), lembrando que tais dados foram compilados de diversos estudos publicados anteriormente e, portanto, não tendo sido determinada significância estatística para estes valores.

Vale lembrar que a concentração total de 17 $\beta$ -hidroxi-andrógeno no sangue emergente dos testículos através da veia testicular é aproximadamente 45 vezes maior que a concentração no sangue presente na veia jugular; durante os intervalos em que as células de Leydig estão sob máxima estimulação de LH endógeno, as concentrações de testosterona na veia testicular podem exceder 500 ng/mL, ou aproximadamente 100 vezes a concentração típica de testosterona colhida na veia jugular (Amann, 1993).

### 2.1.2 Estradiol

O testículo do garanhão possui a habilidade de sintetizar andrógenos como a testosterona, dihidrotestosterona e androstenediona, assim como grandes quantidades de estrógenos. Quando comparado a machos de outras espécies de mamíferos, os garanhões demonstram produção de estrona e estradiol em larga escala, sendo que estrógenos conjugados, como o sulfato de estrona e o sulfato de estradiol 17 $\beta$  também foram isolados do tecido testicular (LANG et al., 1998).

Roser (1994), reportou concentrações de estradiol de 71,9 pg/mL e 44,6 pg/mL para garanhões normais e inférteis respectivamente, enquanto que Lang (1998) descreve valores análogos variando entre 41,2 a 118 pg/mL na primavera e 52,7 a 107,7 pg/mL no inverno para garanhões com histórico de fertilidade normal. Wallach, Pickett e Nett (1983), uma vez tendo encontrado concentrações de estradiol significativamente mais baixas em garanhões impotentes quando comparadas com concentrações de garanhões normais, inferiram que impotência pode estar baseada em baixas concentrações de estradiol e LH; por outro lado, Burns et al. (1982), não encontraram variações de fertilidade relacionadas a concentrações de estrona ou estradiol, ao contrário de LH que demonstrou aparente relação com a fertilidade.

Braun et al. (1996) reporta valores maiores de estradiol plasmático no período de primavera e verão, enquanto que tal diferença não pôde ser observada para o plasma seminal. Neste estudo, as concentrações mensais médias de estradiol no sangue e no plasma seminal giraram em torno de 27,4 pg/mL e 45,3 pg/mL, respectivamente.

De acordo com recentes evidências de que a causa idiopática de subfertilidade/infertilidade em garanhões pode estar sediada aos níveis de receptor ou

de pós-receptor de hormônio luteinizante (LH) nos testículos, Motton e Roser (1997) mensuraram as concentrações plasmáticas de LH, FSH, estradiol e testosterona, não encontrando diferenças significativas entre garanhões férteis e subférteis; entretanto, valores mais baixos destes hormônios foram observados entre garanhões inférteis. Analogamente, Stewart e Roser (1998) mensuraram concentrações plasmáticas de diversos hormônios em machos eqüinos entre 02 meses e 25 anos de idade, encontrando concentrações maiores proporcionais à idade até a maturação sexual; a partir de então, nenhuma diferença pôde ser observada entre garanhões adultos e entre estações reprodutivas no tocante ao estradiol e demais hormônios. Apenas inibina e estradiol plasmáticos demonstraram menores concentrações em animais inférteis, neste estudo.

Hoffman e Landeck (1999), também mensuraram as concentrações séricas e seminais dos esteróides testiculares; o estradiol plasmático, cuja concentração plasmática observada foi de  $31,1 \pm 1,16$  pg/mL, denotou alta correlação com a testosterona plasmática, conforme já citado.

Embora estudos demonstrem e reconheçam o importante papel dos estrógenos na fisiologia reprodutiva do garanhão, ainda não se conhece definitivamente o papel dos mesmos na espermatogênese, controle endócrino da reprodução e qualidade seminal. Especula-se que dois tipos celulares distintos estejam envolvidos na produção de estrógenos e testosterona, uma vez que os estudos de Lang et al. (1998) demonstraram pequena correlação entre testosterona e estradiol, assim como Thompson et al. (1979), Thompson, Pickett e Nett (1978) e Eisenhauer et al. (1994). Provavelmente os estrógenos atuam através de mecanismos de "feed-back" concentração-dependentes para regular a via esteroideogênica.

Recentemente, um grande aumento de dados indicativos do envolvimento dos estrógenos no macho, bem como de sua potencial modulação parácrina/autócrina têm sido apresentados à comunidade científica (ROSER, 2001). Estudos atuais têm demonstrado que tanto as células germinativas como as células de Leydig e Sertoli, expressam genes para síntese de aromatase e de receptores estrogênicos, sugerindo que estrógenos são necessários para a maturação funcional dos espermatozoides e fertilidade, assim como para o desenvolvimento e modulação da esteroidogênese das células de Leydig (ROSER, 2001).

Também preocupados com as implicações e envolvimento dos estrógenos na fertilidade de garanhões, Reaside e Christie (1997) procuraram mensurar as concentrações do principal estrógeno do sangue, o sulfato de estrona ( $E_1S$ ), no plasma seminal e também nos espermatozoides. Analisando ejaculados de cinco garanhões, concluíram que altas concentrações de  $E_1S$  no sangue periférico são refletidas em altos níveis, ainda que menores que os plasmáticos, de esteróides no ejaculado. Inoue et al. (1993) demonstraram que concentrações séricas de testosterona e estrógenos totais podem refletir sensível índice da função endócrina de garanhões, uma vez que em seu estudo encontraram menores níveis destes hormônios em animais castrados e imaturos quando comparados a garanhões maduros e inférteis; machos azoospérmicos também revelaram menores concentrações de estrógenos totais que garanhões adultos.

Relevante revisão envolvendo anormalidades endócrinas e terapias hormonais realizada por Douglas e Umphenor (1992) descreve que dosagens rotineiras de estrógenos, testosterona,  $T_4$  (tiroxina), insulina, FSH e LH podem fornecer importantes dados sobre a eficiência reprodutiva dos garanhões. Segundo os autores, tais análises, em conjunto a outros dados clínicos dos animais, podem ser fatores críticos para o

sucesso do manejo reprodutivo dos haras. De acordo com este estudo, parece haver significativa relação entre baixas concentrações de estrógenos totais/altas concentrações de FSH com subfertilidade associada a oligospermia e degeneração testicular.

## 2.2 Tireóide e Fisiologia Tireoideana

Responsável por sistemas endócrinos distintos, através das células foliculares e parafoliculares, a glândula tireóide localiza-se imediatamente abaixo da laringe em porção anterior à traquéia, topograficamente lateral à mesma (AHRÉN, 1986).

Constituída de massas teciduais distintas, porém conectadas entre si, a tireóide mostra-se de formas multivariadas nas diferentes espécies domésticas, sendo conectadas por istmo no cão e no gato; é substancialmente lobada nos eqüinos, onde istmo apenas circunstancial pode ser observado, contrariamente aos bovinos, em que amplo tecido parenquimatoso caracteriza tal istmo conectivo. Apenas nas espécies humana e suína pode-se observar a glândula tireoideana em forma mais compacta recobrando a traquéia (DYCE; SACK; WENSING, 1997).

Como órgão endócrino, a tireóide sintetiza e secreta hormônios através das já citadas células foliculares, que aderidas entre si circundam o espaço glandular coloidal; o outro tipo celular típico da tireóide é composto pelas células parafoliculares, que se apresentam entremeadas às células foliculares e têm como função principal sintetizar e secretar polipeptídeos como a somatostatina e a calcitonina. Os principais hormônios tireoideanos são a tiroxina ( $T_4$ ) e a triiodotironina ( $T_3$ ). A tiroxina é o produto da iodetação do aminoácido tirosina nas células foliculares; o iodo se fixa à tirosina

- Aumento na proteólise de tireoglobulina armazenada nas células foliculares e a conseqüente liberação de hormônios tireoideanos na circulação sangüínea.

Os hormônios tireoideanos apresentam funções similares, porém atuam diferentemente em células-alvo no organismo animal. Vale ressaltar que os mesmos, uma vez na corrente sangüínea, ligam-se a proteínas carreadoras como a TBG (Globulina Ligante de Hormônios Tireoideanos) e a transtirretina, fazendo com que concentrações séricas de  $T_3$  e  $T_4$  apenas reflitam os valores hormonais ligados às proteínas carreadoras (KAPTEIN; HAYS; FERGUSON, 1994). Desta forma, dentre os efeitos gerais dos hormônios tireoideanos nos organismos vivos, podemos citar (CAPEN; MARTIN, 1989):

- Regulação do metabolismo basal;
- Estimulação da síntese de proteínas;
- Aumento dos processos de glicólise, gliconeogênese e absorção intestinal de glicose;
- Estimulação da atividade cárdio-circulatória através de batimentos cardíacos, débito cardíaco e fluxo sangüíneo;
- Desenvolvimento neuronal e aumento da transmissão nervosa em células neurais.

### **2.2.1 Hormônios Tireoideanos e a Função Reprodutiva**

Diversas citações correlacionam o hipotireoidismo à infertilidade em humanos. Jackson (1982) reportou algumas interações entre hormônios tireoideanos e a função reprodutiva, uma vez que o próprio TRH pode ser observado em tecidos eminentemente reprodutivos como a próstata, vesículas seminais, epidídimo e até mesmo na placenta humana. Por outro lado, tratando-se de hormônio hipofisário, o

TRH também estimula em seu sítio de ação a liberação de prolactina conjuntamente ao TSH. Segundo Hafez (1959) e Parkinson e Follett (1995) os hormônios da tireóide parecem ser necessários para a expressão da refratariedade ou do ritmo reprodutivo endógeno.

Vasta literatura envolvendo casos de hipo/hipertireoidismo pode ser encontrada na espécie humana e em espécies domésticas; na primeira, por exemplo, descreve-se que indivíduos apresentando elevação significativa em suas concentrações séricas normais de hormônios tireoideanos podem apresentar significativa redução em sua testosterona livre, levando a quadros de impotência sexual e até mesmo ginecomastia em homens, além de perturbações ovulatórias em mulheres (JOHNSON; GRACE; PROBST, 1987). Chandrasekhar et al. (1985), por outro lado, descrevem que casos de hipotireoidismo talvez não estejam relacionados à infertilidade em homens, mas que aumento das concentrações séricas de  $T_4$  e  $T_3$  pode influenciar sobremaneira na espermatogênese.

Em espécies domésticas também se relacionam alterações na esfera reprodutiva em animais portadores de hipo/hipertireoidismo. Tais disfunções hormonais podem levar a quadros de diminuição da libido e menor concentração espermática nos machos, além de irregularidades ou mesmo ausência de ciclos estrais e baixos índices de concepção em fêmeas (MCDONALD; PINEDA, 1989).

A carência total de hormônios tireoideanos suprime a função reprodutiva normal em carneiros (DICKSON, 1996), enquanto que a tireoidectomia, de acordo com Parkinson e Follett (1995), abole modificações estacionais na atividade reprodutiva nesta espécie, indicando um requerimento de hormônios tireoideanos para a expressão normal destes modelos. No macho ovino, a tireoidectomia resulta em diminuição do

crescimento testicular, espermatogênese alterada e queda de libido, com redução estacional na qualidade seminal associada ao hipotireoidismo (DICKSON, 1996). Em contraste, Cooke (1996) afirma que estes hormônios não têm ação sobre o testículo adulto, pois o hipotireoidismo apresenta mínimos efeitos sobre a morfologia testicular ou a produção de testosterona, havendo pequenas quantidades de receptores para estes hormônios nos testículos adultos de ovinos. Brooks et al. (1964) também não encontraram interferência da tireoidectomia na espermatogênese de carneiros adultos, assim como Chandrasekhar et al. (1986).

No que tange à espécie ovina, em que muitos trabalhos envolvendo hormônios e função reprodutiva podem ser encontrados, é importante citar as estreitas relações entre concentrações plasmáticas destes hormônios e a estação do ano. Riis (1983) e Webster (1991) encontraram níveis maiores de  $T_4$  durante o inverno do que no verão, enquanto que Menegatos et al. (1994) verificaram a existência de modificações na concentração de  $T_4$  correlacionadas com o aumento ou diminuição do fotoperíodo, sendo mais elevados em fotoperíodos crescentes em relação a decrescentes. Salem et al. (1991) reportam valores médios de  $T_3$  significativamente mais altos no inverno do que no verão, exatamente de forma análoga aos achados de Okab et al. (1993) na espécie ovina. Sendo assim, corroborados ainda pelo estudo de Griffin et al. (1962), em que se observou aumento na atividade de produção hormonal pela tireóide nos meses mais frios do ano, estes estudos sugerem estreita relação entre secreções da tireóide e hipófise no controle do sistema reprodutivo, provavelmente através da regulação das gonadotrofinas hipofisárias.

Cães hipotireoideos podem apresentar diminuição na libido e menor produção espermática segundo Chester (1987). Chastain (1983), por exemplo, descreve caso de

cão hipotireoideo congênito apresentando significativa diminuição do número de espermátides nos túbulos seminíferos; em 20% destes nenhuma espermátide pôde ser observada. Nachreiner (1986), também descreve que aproximadamente 45% dos cães subférteis apresentam diminuição dos hormônios tireoideanos.

Na fêmea canina, baixos níveis de  $T_3$  e  $T_4$  têm sido relacionados a alterações na ciclicidade estral, como prolongamento do anestro reprodutivo e redução do período de estro; menores taxas de concepção, maior ocorrência de abortamentos precoces e produção espontânea de leite também são observadas em cadelas. Neste último caso, especula-se que ocorra por aumento da produção de prolactina, bloqueando-se, conseqüentemente, a secreção e ação das gonadotrofinas (CHESTER, 1987).

Também se demonstrou que o hipotireoidismo em ratas adultas induz a hiperprolactinemia nesta espécie; Tohei, Watanabe e Voogt (2000) mostraram que a proporção de fêmeas hipotireoideas apresentando pseudogestação foi significativamente maior que naquelas consideradas eutireoideas.

Ainda em ratos, Armada et al. (2001) relatam que ratas hipotireoideas apresentam menor peso ovariano e uterino que animais do grupo controle, além de pouco desenvolvimento folicular e intensas irregularidades estrais, muito embora nenhuma correlação possa ter sido encontrada nas dosagens séricas de gonadotrofinas, estradiol e progesterona. Tal fato suporta a hipótese de que hormônios tireoideanos podem mostrar efeito direto no desenvolvimento folicular, porém sem afetar a produção de esteróides sexuais pelo ovário. De fato, receptores para  $T_3$  foram encontrados nas células da granulosa de suínos (WAKIN; RAMANI; RAO, 1987) e humanos (WAKIN et al., 1996).

Nunca se demonstraram efeitos diretos dos hormônios tireoideanos no testículo humano, assim como se conhece quanto aos ovários. Indiretamente, porém, tal relação têm sido descrita. Homens com hipertireoidismo apresentam menor concentração espermática, motilidade total normal, porém motilidade progressiva significativamente menor que homens eutireoideos (JANNINI; ULISSE; D'ARMIENTO, 1995). Opostamente, adultos com hipotireoidismo denotam diminuição no volume do ejaculado, na motilidade progressiva e também na porcentagem cumulativa de formas jovens, porém sem alterações na densidade espermática ou porcentagem de espermatozoides com morfologia normal; neste estudo, não houve alterações nos níveis de testosterona e gonadotropinas (HERNANDEZ; GARCIA; DIEZ, 1990).

Abbatichio et al. (1981) já procuravam correlacionar a responsividade *in vivo* entre os hormônios tireoideanos e a atividade testicular em homens férteis e ditos inférteis; em seus estudos, encontraram estreita correlação entre níveis de  $T_4$  e contagem espermática e porcentagem de espermatozoides móveis, porém esta mesma observação não pôde ser validada para  $T_3$  e para o Índice de Tiroxina Livre ( $ITL_4$ ).

O epitélio seminífero do testículo pré-púbere também é responsivo aos hormônios tireoideanos; receptores nucleares para  $T_3$  são encontrados nas células de Sertoli de diversas espécies animais, onde o  $T_3$  promove sua diferenciação e alterações na sua capacidade proliferativa e secretória. Desta forma, conjuntamente ao FSH, o hormônio  $T_3$  deve ser considerado como o maior regulador endócrino do desenvolvimento do epitélio seminífero testicular (JANNINI; ULISSE; D'ARMIENTO, 1995). Jannini, em 1990, também demonstrou que em ratos neonatos há altos níveis de receptores para hormônios tireoideanos nas células de Sertoli; entretanto, na fase pós-natal há significativa diminuição destes receptores, que se tornam mínimos no adulto.

Esta ligação entre hormônios tireoideanos e o desenvolvimento das células de Sertoli também é relatada por Francavilla (1991), que demonstra imaturidade destas células à microscopia eletrônica em jovens ratos hipotireoideos.

### **2.2.2 Hormônios Tireoideanos em Eqüinos**

Nunca se reportaram, cientificamente, anormalidades reprodutivas em éguas tireoidectomizadas, porém muitos veterinários de campo têm citado grandes progressos clínicos sob o âmbito da fertilidade após haverem suplementado éguas com hormônios tireoideos exógenos. Ainda não se publicou experimento em que se comprove uma estreita relação entre o teste diagnóstico e a abordagem terapêutica de infertilidade causada por desordem de origem tireoidea (NACHREINER; HYLAND, 1993).

As concentrações hormonais relativas à função tireoideana normal em éguas variam consideravelmente de laboratório para laboratório; parte do problema se deve à ampla gama de unidades de medida utilizadas (ng/dL, ng/mL, nmol/L, etc.). Em geral, as concentrações séricas normais dos hormônios tireoideanos em éguas são: T<sub>4</sub>, 0,6 a 32 nmol/L; T<sub>3</sub>, 0,4 a 1,5 nmol/L. Poucas éguas inférteis têm apresentado concentrações destes hormônios abaixo destes níveis (NACHREINER; HYLAND, 1993).

Muitos estudos foram conduzidos no sentido de se estabelecer níveis plasmáticos basais dos hormônios tireoideanos em eqüinos, bem como de seu perfil típico, tanto em animais jovens como em cavalos adultos. Chen e Riley (1981) trabalharam com potros neonatos (idades entre 1,5 a 4 meses) e cavalos adultos entre 2 a 25 anos de idade de diversas raças e demonstraram que neonatos apresentam concentrações séricas de T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub> (4,02 µg/dL e 192,90 ng/dL, respectivamente)

superiores aos de cavalos adultos (1,76  $\mu$ g/dL e 98,69 ng/dL, respectivamente); neste estudo, garanhões apresentaram níveis de  $T_3$  discretamente maiores que a média obtida entre machos castrados e fêmeas.

Anderson, Nixon e Akasha (1988) também mensuraram níveis de  $T_3$  e  $T_4$  total e livre em diversas espécies, dentre elas a eqüina; as concentrações séricas de  $T_4$  total,  $T_4$  livre,  $T_3$  total e  $T_3$  livre observados foram de 15,00 ng/mL, 5,90 pg/mL, 677,00 pg/mL e 3,22 pg/mL, respectivamente; analogamente ao estudo de Chen e Riley (1981),  $T_4$  livre também se comportou com concentrações séricas mais altas em garanhões do que em outros grupos dentro da mesma espécie (égua e potros) e mesmo dentre outras espécies, como bovinos, ovinos, caprinos e suínos.

Com a finalidade de se determinar as concentrações plasmáticas de  $T_3$ ,  $T_4$  e  $T_4$  livre em repouso, após administração de TSH e após administração de fenilbutazona em animais hípidos, Sojka, Johnson e Bottoms (1993) procuraram investigar o melhor teste laboratorial para o diagnóstico de hipotireoidismo em eqüinos, uma vez que o TSH atua estimulando a secreção de hormônios tireóideos e a fenilbutazona possui ação inibitória sobre a mesma. Os valores séricos basais encontrados para os hormônios citados variaram entre: 0,21 a 0,80 ng de  $T_3$ /mL, 6,20 a 25,10 ng de  $T_4$ /mL e 0,07 a 0,47 ng de  $T_4$  livre/dL; uma vez que ambos  $T_3$  e  $T_4$  aumentaram sobremaneira após a aplicação intravenosa de 5 IU de TSH, e que a fenilbutazona foi capaz apenas de inibir  $T_4$ , mas não  $T_3$ , os autores concluíram que a estimulação com TSH parece ser o método diagnóstico mais recomendado em casos de suspeita de hipotireoidismo em eqüinos.

Lothrop e Nolan (1986) encontraram valores basais de  $T_4$  e  $T_3$  de 24,40 ng/mL e 0,44 ng/mL, respectivamente, similares aos encontrados por Sojka, Johnson e Bottoms

(1993). As concentrações séricas de  $T_4$  e  $T_3$  publicados por Duckett, Manning e Weston (1989) também corroboram os valores dos autores anteriormente citados; estes autores encontraram picos médios de  $T_3$  em  $54,06 \pm 14,02$  ng/dL às 08:00 da manhã, significativamente menores que à meia-noite, cuja média foi de  $38,71 \pm 10,81$  ng/dL. A concentração média máxima de  $T_4$  foi obtida às 16:00 horas ao nível de  $2,43 \pm 0,81$  •g/dL e a mínima às 04:00h em  $1,79 \pm 0,63$  •g/dL.

Messer et al. (1995) reportam concentrações basais de  $T_3$  total,  $T_3$  livre,  $T_4$  total e  $T_4$  livre em  $1,02 \pm 0,16$  nmol/L,  $2,05 \pm 0,33$  pmol/L,  $19,87 \pm 1,74$  nmol/L e  $11,55 \pm 0,70$  pmol/L, respectivamente, obtidas em 06 eqüinos adultos hígdos, considerados eutireoideos com base em resposta ao teste padrão de estimulação com TSH.

Malinowski et al. (1996) conduziram interessante estudo com a finalidade de se determinar possíveis variações de concentração plasmática de  $T_3$ ,  $T_4$ , IGF-I (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina) e de IGFBP (Proteínas Ligadoras de IGF), em função do crescimento, maturidade sexual e idade. Colheram amostras de sangue de potras e éguas "trotadoras" (Standardbreds) com idades variando entre 0 a 14 dias, 1 a 9 meses, 5 a 8 anos e 16 a 22 anos; em um segundo experimento, mediram as mesmas variáveis em 08 raças diferentes, de diferentes tamanhos corpóreos, ou seja, de cavalos miniatura a Friesians. As concentrações plasmáticas de  $T_3$  decresceram continuamente de 7,9 ng/mL do nascimento até os 06 meses de idade (0,9 ng/mL) e então pouca variação foi observada entre os 09 meses (0,7 ng/mL) e os 16-22 anos de idade (0,5 ng/mL); similarmente,  $T_4$  declinou de 233 ng/mL ao nascimento, para 49 ng/mL aos 14 dias de idade e variou de 09 a 35 ng/mL entre todos os outros grupos de idades maiores. Neste estudo, embora tenha havido grandes diferenças inter-raciais

quanto às concentrações hormonais, não se observou diferenças quanto ao tamanho corporal.

Poucos estudos envolvendo correlações entre níveis de hormônios tireoideanos e a função reprodutiva na espécie eqüina, são encontrados na literatura. Tal afirmação é particularmente verdadeira quando nos referimos ao macho eqüino, uma vez que alguns estudos foram realizados no sentido de se avaliar efeitos reprodutivos das fêmeas e suas eventuais interrelações com hormônios tireoideanos.

Para avaliar as características seminais de garanhões tiroideotomizados, Lowe et al. (1975) coletaram semanalmente sêmen de garanhões que sofreram retirada cirúrgica da tireóide aos 18 meses de idade, comparando-a ao sêmen de garanhões-controle, dos 25 aos 39 meses de idade. Embora o estado induzido de hipotireoidismo tenha causado efeitos negativos sobre a libido e estado geral dos animais, as características seminais, histologia testicular e fertilidade não foram afetadas pelo procedimento.

Lowe et al. (1987) também avaliaram o comportamento reprodutivo de éguas normais e éguas tiroideotomizadas ao longo de duas estações reprodutivas. Quando comparadas a três éguas não tiroideotomizadas consideradas como grupo controle, três outras éguas tiroideotomizadas com a idade de 1,5 ano mostraram-se letárgicas, com membros posteriores edemaciados e pelagem ruim e espessa. Uma vez expostas ao garanhão durante o estro, tais éguas apresentaram responsividade normal ao garanhão, e muito pouco refratárias ao mesmo quando em anestro. Entretanto, características como tempo de duração do estro, pico de LH e pico de progesterona no dia 07 após a ovulação não variaram entre os grupos estudados.

Com finalidade de se avaliar a eventual associação entre concentrações de  $T_4$  séricas com as taxas de prenhez após 15 a 16 dias da ovulação e possíveis benefícios da suplementação com hormônios tireoideanos no aumento da fertilidade, Gutierrez, Riddle, e Bramlage (2002) publicaram trabalho envolvendo 329 éguas clinicamente normais. Estes animais revelaram concentrações de  $T_4$  variando entre 4,5 e 53,9 mg/dL, tendo sido suplementadas éguas consideradas com baixos níveis de  $T_4$ ; não se detectou qualquer associação significativa entre níveis de  $T_4$  e taxas de prenhez aos 15 e 16 dias pós-ovulação, tampouco a suplementação de éguas com baixos níveis de  $T_4$  promoveu qualquer efeito na melhora da fertilidade das mesmas.

### 2.3 Análise Seminal em Garanhões

Há mais de meio século, diversos autores vêm descrevendo grandes variações quanto ao volume dos ejaculados na espécie eqüina; Papa (1987), em sua brilhante revisão sobre os parâmetros normais do ejaculado eqüino, cita Götze (1949), que encontrou valores médios de 101,5 mL/ejaculado em raças de “sangue quente” (Hannoverana, Trackener, Oldenburg, Holsteiner, Westfalen, Orloff etc) e 47,5 mL/ejaculado na raça Puro Sangue Inglês (PSI); segundo este autor, diversos fatores estão relacionados a esta variação, entre eles raça, particularidades individuais, tempo após última cobertura, idade, tempo de repouso sexual, época do ano, alimentação, manejo etc. Papa (1987) também descreve que Aehnelt (1950) observou grandes variações entre ejaculados eqüinos, obtendo valores desde 15 até 450 mL, “padronizando” valores entre 80 e 100 mL como volumes médios de referência. Quanto à possível relação com fertilidade, Dowsett e Pattie (1982) demonstraram que o volume

do ejaculado, desde que em níveis iguais ou acima dos padrões normais de fertilidade, não influencia isoladamente nos índices de fertilidade, mas pode interferir quando houver uma variação na somatória de vários outros parâmetros espermáticos. Estes autores encontraram volumes médios dos ejaculados de 63,6 mL e 43,4 mL para garanhões de fertilidade comprovada e de baixa fertilidade, respectivamente.

Apesar de não constituir em seguro e definitivo parâmetro para se prognosticar a capacidade fecundante do sêmen eqüino, a motilidade espermática continua se mostrando extremamente útil na avaliação da viabilidade dos espermatozóides (PAPA, 1987). Comparando as raças de “sangue quente” com a raça PSI, o já citado autor Aehnelt (1950) observou médias em porcentagem de motilidade total de 63 e 83%, respectivamente, enquanto que Werhahn (1978) encontrou 61% de motilidade total das ditas raças de “sangue quente”. No que se refere à época do ano, Pickett, Faulkner e Sutherland (1970) não obtiveram diferenças significativas entre as estações do ano (motilidade total média de 73%), enquanto que Van der Holst (1975) encontrou porcentagens médias de motilidade maiores na estação de monta, ou seja, primavera e verão. Já Squires, Pickett e Amann (1979) demonstraram que porcentagens maiores de motilidade espermática são encontradas em garanhões entre 4 e 6 anos (63,1%), enquanto que animais mais jovens (2 a 3 anos) e animais mais velhos (9 a 16 anos) demonstram menores porcentagens de motilidade total (55,0 e 59,9%, respectivamente). Quanto à relação entre motilidade e fertilidade, Voss, Pickett e Squires (1981) demonstraram não haver tal relação em garanhões, desde que apresentem valores médios iguais ou acima dos padrões normais (motilidade igual ou superior a 70%).

Assim como os demais parâmetros do ejaculado eqüino, a concentração espermática também apresenta grandes variações (PAPA, 1987). Götze (1949) encontrou resultados na ordem de 80 a 200 x 10<sup>6</sup> espermatozóides por mL de ejaculado (sptz/mL), enquanto que Aehnelt (1950) e Bielanski (1950) obtiveram resultados médios de 338 x 10<sup>6</sup> e 132 x 10<sup>6</sup> sptzs/mL, respectivamente. Outros autores, em trabalhos clássicos, também encontraram valores médios semelhantes, em sptz/mL, como Cornwell et al. (1972) 302 x 10<sup>6</sup>, Pickett et al. (1976) 281 x 10<sup>6</sup>, Werhahn (1978) 200 x 10<sup>6</sup> e Dowsett (1979) 164 x 10<sup>6</sup>; Dowsett e Pattie (1982) encontraram valores médios de 178 x 10<sup>6</sup> e 154 x 10<sup>6</sup> sptz/mL, para garanhões com fertilidade comprovada e garanhões de baixa fertilidade, respectivamente.

Diversos autores também reportam grandes variações no número total de espermatozóides no ejaculado, variações estas dependentes de inúmeros fatores (PAPA, 1987). Götze (1949), Cornwell et al. (1972), Pickett et al. (1976), Werhahn (1978), Sullivan e Pickett (1975) e Swierstra, Gebauer e Pickett (1975) reportaram valores de 6,0 x 10<sup>9</sup>, 11,3 x 10<sup>9</sup>, 14,7 x 10<sup>9</sup>, 26,3 x 10<sup>9</sup>, 11,0 x 10<sup>9</sup> e 7,0 x 10<sup>9</sup> sptzs, respectivamente; Amann et al. (1979) demonstraram valores de 6,4 e 4,2 x 10<sup>9</sup> sptzs respectivamente, para garanhões de 5-16 e 2-4 anos de idade, enquanto que Squires, Pickett e Amann (1979) encontraram valores de 1,8, 3,6 e 4,5 x 10<sup>9</sup> sptzs para garanhões de 2 a 3, 4 a 6 e 9 a 16 anos de idade, respectivamente.

Ainda de acordo com Papa (1987), muitos pesquisadores, ao longo dos anos, vêm tentando correlacionar as características morfológicas espermáticas de garanhões com a fertilidade. Bielanski (1975) encontrou diferenças entre a freqüência de defeitos maiores e menores em diversos ejaculados de diversos garanhões; este mesmo autor encontrou, assim como Henrikse (1966) e Dott (1975), correlação negativa entre

fertilidade e a percentagem de patologias espermáticas, diferentemente de Voss, Pickett e Squires (1981) que não encontraram correlações entre fertilidade e percentagem de espermatozóides anormais. Papa (1987) descreve em sua revisão que os fatores que podem influenciar a presença de patologias espermáticas podem estar ligados desde a espermatogênese até o armazenamento e posterior ejaculação do sêmen, além do excessivo uso do garanhão, aumento de temperatura epididimária por febre, perda de termorregulação testicular, além de fatores individuais ligados à idade do garanhão.

poro Werhahn (1978) dividiu garanhões de “sangue quente” em três faixas etárias, a saber: 3 a 5, 6 a 10 e acima de 11 anos, demonstrando que os maiores níveis de patologias (46,6 e 62,0%, respectivamente) são observados em animais em tenra idade de maturidade sexual e animais senis, diferentemente de animais já demonstrando a devida maturidade sexual (38,4%). Bielanski et al. (1982) afirmaram ser possível prognosticar a fertilidade dos garanhões antes da estação de monta, desde que estes se apresentem de acordo com condições sexuais normais, como concentração e motilidade espermáticas dentro dos padrões de referência e menos de 10% de gotas citoplasmáticas, 30% de cauda enrolada, 3% de cabeças destacadas e 1% de outras formas patológicas. Analogamente, Mies Filho (1987) descreve que este tipo de “prognóstico” reprodutivo pode ser válido para animais portadores de patologias espermáticas entre 25 e 30% (sendo que até 10% de defeitos maiores e 20% de defeitos menores), mas que torna-se muito subjetivo ao passo que muitas variáveis podem interferir no julgamento da amostra seminal, como raça, idade, época do ano e fatores individuais.

Jasko et al. (1992), avaliaram as características seminais morfológicas e de movimentação do ejaculado de 99 garanhões, comparando-as aos índices de fertilidade destes garanhões. Animais apresentando baixa fertilidade média durante as estações reprodutivas avaliadas, demonstraram baixos valores médios de motilidade total e progressiva, menor velocidade média de células móveis e significativamente menor percentual de espermatozóides morfolologicamente normais. Por outro lado, em garanhões com fertilidade normal, demonstraram que as características mais altamente correlatas com fertilidade foram: motilidade espermática total e progressiva, porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais e porcentagem de espermatozóides móveis através de análises computadorizadas.

Dois anos antes, Jasko, Lein e Foote (1990) publicaram estudo semelhante, também com 99 garanhões. A análise de dados reprodutivos e a classificação morfológica espermática revelaram significativa correlação entre o percentual de espermatozóides morfolologicamente normais e a fertilidade estimada por ciclo reprodutivo dos garanhões estudados. Além do mais, os percentuais de espermatozóides classificados como portadores de defeitos maiores (cabeças anormais, gota proximal e peças intermediárias anormais) se mostraram negativamente correlacionados à fertilidade de forma significativa. Aparentemente, um grande percentual de espermatozóides com defeitos maiores ou outros defeitos em combinação aos defeitos maiores pode ser associado à intensa redução de fertilidade.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da sazonalidade reprodutiva sobre a qualidade seminal e concentrações plasmáticas hormonais entre outros parâmetros em garanhões férteis e subférteis, Roser e Hughes (1992) analisaram o sêmen destes garanhões quanto a volume, concentração, motilidade, pH e morfologia. Comparados a

garanhões férteis, animais subférteis demonstraram concentrações plasmáticas de gonadotropinas significativamente maiores, porém similares entre os grupos para a testosterona. O número total de espermatozóides móveis (motilidade progressiva) foi menor em garanhões subférteis em ambas estações reprodutivas.

Naden, Amann e Squires (1990) se mostraram preocupados em estabelecer relações entre concentrações hormonais e características seminais de garanhões. Estes pesquisadores avaliaram as variações hormonais de cavalos machos desde 08 até 100 semanas de idade, mensurando LH, FSH e testosterona plasmáticos, além de comportamento sexual e características seminais. Neste estudo, alta correlação foi encontrada entre o aumento dos níveis hormonais plasmáticos e qualidade seminal, assim como produção seminal diária e "output" seminal diário com o passar da idade desde a infância e puberdade até a fase adulta.

Através da hipótese de que animais "imunizados" contra GnRH podem apresentar supressão da função testicular, Malmgren et al. (2001) investigaram tal efeito sobre as concentrações hormonais periféricas, comportamento sexual e qualidade seminal em garanhões. Ao final do experimento observou-se que animais submetidos à imunização com GnRH demonstraram significativa queda nos níveis de testosterona plasmática, assim como intenso decréscimo na qualidade seminal (volume, concentração, motilidade e morfologia).

## 2.4 Viabilidade Espermática e Integridade de Acrossomo

A membrana plasmática do espermatozóide é composta por uma dupla camada lipídica que, além do colesterol, possui muitos fosfolípídeos polares e proteínas que atuam como bomba de íons para mover cálcio, sódio e outros íons para fora da célula; estas proteínas também aumentam as associações com células do trato reprodutor feminino e atuam como receptores de ligação entre espermatozoides e ovócito (GRAHAM, 1996).

Muitos fatores alteram a fluidez ou a flexibilidade das membranas plasmáticas, como, por exemplo, a temperatura. O resfriamento induz a mudanças estruturais dos fosfolípídios do estado líquido para o estado cristalino, impedindo sua movimentação lateral e resultando na formação de regiões ou domínios cristalinos (QUINN, 1985; JASKO, 1994); resta-se somente discretas regiões de lipídios em estado líquido, onde o agrupamento das proteínas no interior destes domínios lipídicos leva ao aumento da permeabilidade da membrana e diminuição da função metabólica.

Durante o processo de criopreservação do sêmen, ou mesmo de seu simples resfriamento com vistas a seu transitório armazenamento, o choque térmico sofrido pelo sêmen desde 37 até 5°C pode induzir à danos irreversíveis nas células espermáticas, como alterações no padrão normal de motilidade, danos metabólicos, perda de componentes intracelulares, desequilíbrio na concentração de íons (pela diminuição da formação de ATP e perda da capacidade de bombeamento de sódio e potássio) e morte celular (AMANN; PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996; SOUZA, 2001).

Desta forma, muitos estudos têm sido conduzidos no sentido de se melhorar a visualização dos danos acrossomais de membrana, através da avaliação microscópica

em contraste de fase, ou de interferência diferencial, destas alterações induzidas pelo processo de resfriamento e criopreservação seminal (BLACH et al., 1988). Entretanto, uma vez que o acrossomo do espermatozóide do garanhão é pequeno e compacto, ele não pode ser adequadamente avaliado por estes métodos, pois se torna inviável a acurada identificação de todos os danos do acrossomo induzidos pelo processo de resfriamento e/ou criopreservação (VOSS; PICKETT; SQUIRES, 1981).

Diversas técnicas empregando corantes supravitais têm sido desenvolvidas para uma adequada avaliação simultânea da viabilidade espermática e da integridade acrossomal do espermatozóide eqüino (e de outras espécies) em microscopia óptica (MERKIES et al., 2000). Kovács et al. (2000) avaliaram a aplicabilidade do método de coloração descrito por Kovács e Foote (1992) em sêmen eqüino criopreservado, onde todos os tipos celulares foram perfeita e claramente distingüidos, inclusive a integridade da membrana da cauda do espermatozóide. Através deste método de coloração, além de espermatozóides vivos e mortos, também puderam ser detectados e identificados as seguintes classes de espermatozóides: vivos com acrossomo intacto, vivos com acrossomo lesado, mortos com acrossomo intacto e mortos com acrossomo lesado (SOUZA, 2001).

Informações simultâneas sobre a viabilidade e a integridade da membrana do acrossomo são muito relevantes para a avaliação global da função geral da célula espermática; é por tal razão que muitas técnicas de marcação com sondas fluorescentes têm sido empregadas para facilitar a visualização do acrossomo em diversas espécies, uma vez que as mesmas fornecem meios para detectar componentes específicos dentro de uma célula com acurada sensibilidade e seletividade (SOUZA, 2001). Além do mais, tais técnicas de microscopia de

fluorescência podem ser correlacionadas com os parâmetros de motilidade espermática pela utilização de análise computadorizada de sêmen (CASA). Arruda (2000) utilizou o *Pisum sativum* (FITC-PSA/H258) em espermatozóides criopreservados de eqüinos segundo a técnica descrita por Casey et al. (1993) e correlacionou os resultados obtidos em microscopia de fluorescência com os parâmetros de motilidade espermática através da citada análise computadorizada de sêmen (CASA); as correlações encontradas foram: vivos com acrossomo intacto e motilidade progressiva,  $r=0,33$  ( $p<0,01$ ), mortos com acrossomo lesado e motilidade progressiva,  $r=-0,16$  ( $p<0,05$ ) e total de espermatozóides vivos e motilidade progressiva,  $r=0,26$  ( $p<0,01$ ).

## **2.5 Qualidade e Viabilidade do Sêmen Eqüino Resfriado**

São indiscutíveis as vantagens econômicas que a inseminação artificial, na espécie eqüina, pode proporcionar a criadores e mesmo veterinários (BRINSKO; VARNER, 1993). Ao longo dos anos, foi possível perceber-se que não somente vantagens econômicas, mas também sanitárias e genéticas poderiam ser levadas aos plantéis de diferentes raças em todo o mundo. Neste contexto surge a importância e necessidade do armazenamento e transporte de sêmen, uma vez que o mesmo, desde que realizado de forma adequada, pode reduzir significativamente os custos do transporte da égua com seu potro para cobertura ou inseminação, ou até mesmo transporte do próprio garanhão. A conservação e armazenamento de sêmen eqüino também se fazem relevantes em circunstâncias que permitam a coleta e inseminação de determinadas éguas no mesmo dia, porém a inseminação de outras em dias posteriores devido a momentos ovulatórios distintos (SQUIRES et al., 1999).

A qualidade seminal de garanhões observada imediatamente após a colheita é variável de indivíduo a indivíduo; variações nos quesitos volume, concentração, motilidade, vigor e também nas características físicas e morfológicas do sêmen podem ser significativas em diferentes animais quando observado a fresco, mesmo sendo todos os animais considerados férteis. Entretanto, a despeito destas observações, os índices de fertilidade do sêmen utilizado a fresco é relativamente alto na espécie eqüina. À medida que se procura realizar o armazenamento do sêmen através do resfriamento para sua inseminação *a posteriori*, tais índices de fertilidade decrescem significativamente (KLUG, 1989).

Diversas variáveis estão envolvidas com a viabilidade do sêmen resfriado, desde o tipo de diluidor a ser utilizado na amostra seminal (JASKO et al., 1993), protocolo de resfriamento do sêmen e taxa de resfriamento do mesmo (DEMICK; VOSS; PICKETT, 1976), até diferentes sistemas ou metodologias de transporte (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984). Além do mais, uma série de outras variáveis inerentes ao próprio espermatozóide e suas características de membranas devem ser consideradas, assim como variações hormonais em cada indivíduo.

Uma vez que a estrutura básica da membrana plasmática de qualquer célula segue o modelo do "mosaico fluido" proposto por Singer e Nicholson (1972), a membrana plasmática do espermatozóide também é formada uma dupla camada lipídica entremeada por moléculas de proteínas, cujas funções diferem regionalmente ao longo da estrutura do espermatozóide. Bombas iônicas são responsáveis pelo equilíbrio das concentrações intra e extracelulares de íons, assim como a camada lipídica responsabiliza-se pela permeabilidade de diferentes substâncias e fluidez da membrana plasmática como um todo (AMANN; PICKETT, 1987). À medida que sofre

resfriamento, ocorre significativa disfunção de enzimas metabólicas e alterações na permeabilidade desta membrana, levando a perdas de integridade de membrana e decrescente motilidade e viabilidade dos espermatozóides (AMANN; GRAHAM, 1993).

Ao analisarmos economicamente, o transporte de sêmen pode promover significativa redução dos custos da inseminação artificial em comparação à monta natural. Neste sentido, diversas investigações científicas vêm sendo realizadas com sêmen resfriado na tentativa de aumento da qualidade e viabilidade espermática *in vitro* (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1987; SILVA FILHO et al., 1994). Entretanto, reconhece-se que a metodologia clássica para manutenção da viabilidade espermática e também de sua capacidade fecundante é o armazenamento do sêmen a 5°C, por períodos de 24 a 48 horas (DE VRIES, 1987; BRINSKO; VARNER, 1992; KLUG, 1992).

Jasko et al. (1988) compararam as taxas de prenhez entre sêmen recém coletado e sêmen resfriado a 4°C por 24 horas, obtendo índices considerados aceitáveis de 76,65 e 56,00%, respectivamente. Dez anos mais tarde, Shore et al. (1998) compararam os índices de fertilidade obtidos com inseminação artificial utilizando-se sêmen resfriado por 24 horas a 5°C *versus* sêmen resfriado por 24 e 48 horas a 5°C; em ambos grupos experimentais os índices de fertilidades foram os mesmos, ou seja, de 67%. Squires et al. (1998) também realizaram experimento análogo, porém testando diferentes doses inseminantes, não encontrando taxas de prenhez significativamente distintas entre si para éguas inseminadas com sêmen resfriado após 24 horas nas diferentes doses inseminantes testadas.

Heiskanen et al. (1994) testaram os resultados de inseminação artificial com sêmen de garanhões resfriados a 5°C por aproximadamente 40 horas, utilizando dois extensores seminais (Kenney e Kenney modificado); os extensores utilizados,

combinados ao protocolo de resfriamento empregado, foram responsáveis por uma taxa de prenhez média de 73% (87% para o grupo Kenney e 60% para o grupo Kenney modificado), bastante adequada ao uso de sêmen eqüino por mais de dois dias.

Embora a inseminação artificial com sêmen resfriado seja uma realidade à reprodução eqüina já há muitos anos, as taxas de prenhez ainda podem ser muito baixas na dependência da qualidade do sêmen de diferentes cavalos; tais variações são relacionadas sobremaneira às condições metabólicas dos espermatozóides, suprimento energético dos mesmos e também aos efeitos causados às características de motilidade dos espermatozóides eqüinos (devidos às condições de armazenamento como meio e temperatura). Fatores de extrema relevância ao tratarmos de fertilidade são as relações existentes entre a mesma e as características físicas e morfológicas dos espermatozóides, assim como parâmetros seminais de motilidade e concentração.

Pattie e Dowsett (1982) publicaram artigo científico analisando retrospectivamente dados de fertilidade de 47 garanhões oriundos de "studs" comerciais na Austrália e sua relação com as características seminais; as características mais claramente associadas à porcentagem de gestações por serviço foram: volume total, volume livre de gel, concentração espermática, número total de espermatozóides e número total de espermatozóides vivos. Os autores deste estudo, à época, concluíram que parâmetros mínimos para estas características necessitam melhor observação para que se predize a viabilidade reprodutiva de garanhões.

Jasko et al. (1992) compararam a motilidade espermática e características seminais à fertilidade em 64 garanhões; neste estudo, garanhões com fertilidade inferior à média de sua estação reprodutiva apresentaram motilidade total e progressiva significativamente menor, assim como menor porcentagem de espermatozóides

morfologicamente normais. Para ambas categorias de gananhões analisadas (corrida e trotadores), as características seminais e os padrões de fertilidade demonstraram alta correlação estatística; as características seminais mais correlacionadas à fertilidade foram motilidade total e progressiva, porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais e análise computadorizada da porcentagem de espermatozóides móveis.

Ainda Jasko et al. (1992) também procuraram estabelecer relações entre classificações morfológicas espermáticas e fertilidade de gananhões. Estudando retrospectivamente 66 gananhões, observaram significativa correlação entre a porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais por ejaculado, com a fertilidade por ciclo; adicionalmente, a porcentagem de espermatozóides apresentando defeitos maiores (cabeças anormais, gota proximal e peças intermediárias anormais) foi inversamente correlata à fertilidade por ciclo analisada. Ao que parece em gananhões, a alta porcentagem de espermatozóides com defeitos maiores ou outros defeitos em combinação com defeitos menores é associada à redução de fertilidade.

Graham (1996) descreve que avaliações seminais de rotina em gananhões devem incluir, no mínimo, análise do volume seminal, concentração espermática e motilidade progressiva quando se pretende introduzir machos de forma satisfatória em determinada estação reprodutiva. Uma vez que técnicas de resfriamento e criopreservação induzem à ocorrência de redução da longevidade e funcionalidade das células espermáticas, o autor cita que, para a manutenção de níveis adequados e aceitáveis de fertilidade com estas técnicas de resfriamento e criopreservação, são necessárias amostras seminais com padrões prévios mínimos.

obtido. Torres-Boggino et al. (1995) também realizaram inferências semelhantes quanto à relação entre características seminais e fertilidade, mas também incluíram nesta relação a adequabilidade destas amostras seminais ao armazenamento em refrigeração e criopreservação. Cinco ejaculados de cada um dos quatro garanhões do estudo foram analisados quanto a volume seminal total, concentração espermática, morfologia espermática e porcentagem de espermatozóides móveis, enquanto que dados sobre fertilidade foram calculados a partir de dados das últimas três estações de monta. Os ejaculados foram resfriados a 5°C e analisados quanto a motilidade nos momentos 0, 24, 48 e 72 horas; também foram criopreservados e avaliados quanto à integridade de membrana antes e após o procedimento. Diferenças estatísticas significativas foram observadas entre os garanhões para volumes seminais livres de gel, porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais, integridade de membrana e fertilidade; diferenças também foram observadas entre garanhões no quesito longevidade espermática, sendo que os melhores resultados foram obtidos entre animais com maior motilidade progressiva inicial. Neste aspecto, vale lembrar, no entanto, que em estudo focando a repetibilidade de características seminais de garanhões, Pattie e Dowsett (1982) concluem que, caso a análise seminal denote características abaixo do padrão desejável, há a necessidade de se coletar mais uma ou duas amostras antes de se classificar o garanhão como portador de boa fertilidade ou não.

Com a finalidade de se avaliar a habilidade de diferentes “containers” em preservar a motilidade de espermatozóides eqüinos, Brinsko et al. (2000) compararam diferentes taxas de resfriamento e temperaturas de armazenamento destes “containers” expostos a diferentes temperaturas ambientes. Neste estudo, elevada correlação foi

obtida entre diminuição de motilidade e resfriamento a temperaturas a partir de 4°C; temperatura ambiente e taxas de resfriamento entre 20 e 8°C não afetaram a motilidade total, motilidade progressiva e velocidade curvilinear. Os resultados deste trabalho sugerem que o sêmen eqüino é apto a tolerar ampla gama de taxas de resfriamento e temperaturas de armazenamento, sem prejuízos à sua qualidade e viabilidade.

Sendo assim, fatores seminais bioquímicos e hormonais podem estar relacionados à viabilidade e longevidade espermática. O plasma seminal contém fatores estimuladores da motilidade espermática que podem ser divididos em dois grandes grupos. Um deles seria constituído por fatores de ativação catalítica, como certos íons, nucleotídeos e ativadores específicos, provavelmente de origem protéica, encontrados em diversas glândulas acessórias, principalmente na próstata. O outro grupo seria formado por nutrientes que fornecem a energia metabólica exigida para a motilidade e a sobrevivência dos espermatozóides (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). Por outro lado, o plasma seminal não é um meio ideal para armazenar espermatozóides (JASKO et al., 1991). Diversos trabalhos em eqüinos indicam que altas concentrações de plasma seminal podem ter efeitos deletérios sobre a motilidade espermática após armazenamento por períodos prolongados (JASKO et al., 1991; MAGESTRINI et al., 1995; PICKETT et al., 1975; VARNER et al., 1987).

Braun et al. (1994) examinaram os efeitos do plasma seminal sobre as características de motilidade de espermatozóides eqüinos ejaculados e epididimários durante armazenamento a 5°C, e concluíram que a motilidade espermática durante o resfriamento é diretamente afetada após a exposição dos espermatozóides ao plasma seminal. Brinsko et al. (2000), preocupados neste mesmo aspecto quanto à possível influência do plasma seminal sobre a pequena tolerância ao resfriamento e

armazenamento do sêmen de determinados garanhões, promoveram centrifugação e parcial remoção do plasma seminal em seu estudo; encontraram claros benefícios desta técnica para garanhões cujos ejaculados apresentavam pobre tolerância ao resfriamento e armazenamento através das técnicas de rotina de diluição e envase, especialmente em casos de armazenamento por mais de 24 horas.

Em outro experimento, Vianna et al. (2002) objetivaram verificar a influência do plasma seminal na motilidade espermática após o resfriamento (4°C) e após o congelamento. Para tanto, utilizaram 4 garanhões, dois com motilidade espermática superior pós-resfriamento (75% e 73% de motilidade progressiva) e pós-congelamento (35% e 40% de motilidade progressiva) e dois considerados com baixa motilidade após o resfriamento (40% e 46%) e após o congelamento de sêmen (3% e 1%). O sêmen dos 4 reprodutores foi centrifugado e 90% do plasma seminal retirado. O sêmen dos garanhões considerados de melhor qualidade foi re-suspenso com o plasma dos garanhões considerados de qualidade inferior até uma concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL e diluído. Procedeu-se da mesma forma, porém em ordem inversa. As amostras de sêmen foram resfriadas e congeladas. Os autores observaram uma melhora na motilidade progressiva dos espermatozoides dos garanhões considerados de qualidade inferior após a adição do plasma seminal daqueles considerados de melhor qualidade, tanto no sêmen resfriado como no congelado, e concluíram que o plasma seminal tem influência na motilidade de células espermáticas nos diferentes tratamentos térmicos impostos no processamento de sêmen.

Espermatozoides mortos teriam algum tipo de influência na motilidade total ou na integridade de membrana de espermatozoides vivos? Para testar esta hipótese, Brinsko et al. (2003) analisaram amostras seminais adicionadas a diferentes percentuais de

espermatozóides vivos quanto a motilidade total e progressiva, assim como velocidade curvilinear de amostras espermáticas a fresco e resfriadas a 5°C após 24 horas. A presença de mais de 75% de espermatozóides mortos não afetou características de motilidade em ambos casos, embora a velocidade curvilinear e integridade de membrana tenham se revelado inferiores ao grupo controle; adicionalmente, esta integridade de membrana apresentou alta correlação positiva à motilidade total e motilidade progressiva, tanto nas amostras a fresco como nas resfriadas.

A maior parte de todos os estudos envolvendo resfriamento de sêmen eqüino demonstra que, na dependência de variações individuais, os espermatozóides mantêm alta capacidade de fertilização se resfriados a 5°C e inseminados depois de transcorridas 24 horas; entretanto, caso o armazenamento ocorra por tempo superior a 48 horas, esta capacidade de fertilização declina sobremaneira (BRUEMMERT et al., 2001).

Uma grande variedade de fatores pode afetar negativamente a motilidade espermática de sêmen submetido a resfriamento, como tipo de diluidor, tipo de antibiótico, temperatura de armazenamento e quantidade de plasma seminal presente; entretanto pouco se tem feito no sentido de avaliação do grau de denaturação da cromatina espermática. De acordo com Love et al. (2002), alguns espermatozóides podem possuir motilidade adequada, porém apresentar deformidades morfológicas ou cromatínicas que comprometem e limitam sua capacidade fecundante, principalmente quando submetidos a longos períodos de armazenamento em refrigeração. Assim sendo, delinearam experimento em que avaliaram as taxas de denaturação do DNA espermático de garanhões férteis e inférteis, cujo sêmen foi submetido a diferentes temperaturas de resfriamento (5, 20 e 37°C). A 20 e 37°C, em garanhões férteis, houve

significativo aumento no grau de denaturação da cromatina espermática, fato não ocorrente à 5°C, indicativo de manutenção da qualidade desta cromatina por mais de 46 horas. Entretanto, entre animais subférteis, a susceptibilidade à denaturação ou declínio na qualidade da cromatina aumentou entre 20 e 31 horas de armazenamento à 5°C; tais resultados levaram aos autores concluir que provavelmente o DNA espermático de garanhões subférteis pode declinar com muito mais intensidade que o DNA de animais férteis.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Gerais

Avaliar possíveis correlações entre concentrações plasmáticas de triiodotironina ( $T_3$ ), tiroxina ( $T_4$ ), testosterona e estradiol, com características físicas e morfológicas e longevidade de sêmen de garanhões resfriados a  $5^\circ\text{C}$ .

#### 3.2 Específicos

- 1) Analisar o padrão plasmático de  $T_3$ ,  $T_4$ , testosterona e estradiol de garanhões;
- 2) Avaliar possíveis correlações entre as concentrações plasmáticas dos hormônios citados e eventuais diferenças significativas nas características espermáticas físicas e morfológicas;
- 3) Avaliar possíveis correlações entre as concentrações plasmáticas dos hormônios citados e longevidade espermática, transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a  $5^\circ\text{C}$ ;

## 4 MATERIAL E MÉTODO

Pira

Doc Os materiais utilizados no experimento encontram-se abaixo relacionados.

Me

### 4.1 Materiais

- 05 garanhões férteis em idade reprodutiva;
- 01 vagina artificial modelo Missouri composta por revestimento externo de couro flexível e camisa sanitária interna de látex lavável;
- 01 centrífuga de alta rotação<sup>1</sup>, 01 resfriadora automática de sêmen<sup>2</sup> e 02 microscópios de contraste de fase com aumentos de 100<sup>3</sup> e 1000<sup>4</sup> x;
- Kits de radioimunoensaio para dosagens de estradiol, testosterona, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> em duplicata<sup>5</sup> e 01 contador de radiação gama<sup>6</sup>;
- Conjuntos de tubos de ensaio/agulhas para coleta de amostras sangüíneas para ensaios hormonais (sistema Vacutainer®) e tubos plásticos de 01 mL tipo “Eppendorf” para armazenamento e congelamento de plasma sangüíneo;
- Diluidor seminal<sup>7</sup> e materiais de consumo e suporte diversos;
- Corantes Trypan Blue 0,4 %, Giemsa, Formaldeído 37% e Neutral Red.

### 4.2 Métodos

O experimento foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina

1.Fanem, mod.20; 2.Minitub; 3.Carl Zeiss ICS Standart 254; 4.Reichert-Zetopan; 5.Coat-A-Count® Diagnostic Products Corporation (DPC®); 6.Cobra® Autogamma; 7. Max Sêmen, EHG Agrofarma.

Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), Campus Pirassununga, SP (coletas de sêmen, sangue e análises seminais) e Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus São Paulo, SP.

#### 4.2.1 Avaliação Prévia dos Animais

Os garanhões foram criteriosamente avaliados sob os âmbitos clínico e andrológico, para a exclusão de eventuais problemas reprodutivos que pudessem comprometer o trabalho. Os animais apresentavam-se isentos de alterações de ordem reprodutiva, demonstrando histórico favorável de fertilidade e qualidade espermática.

#### 4.2.2 Manejo dos Animais

Os garanhões foram mantidos no Setor de Eqüideocultura da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), SP, recebendo alimentação de rotina consistindo em ração concentrada adequada para sua categoria (garanhões em manutenção) e feno de *coast-cross* (*Cynodon dactylon*). Apresentavam também vacinação atualizada contra tétano, influenza, herpesvírus e raiva, bem como vermifugação a cada quatro meses com ivermectina.

### 4.2.3 Colheita de Sangue

Para as dosagens de testosterona, as amostras de sangue foram colhidas uma vez por semana a cada 06 horas (devido às variações circadianas deste hormônio), sempre nos mesmos horários em cada animal (aproximadamente às 07:30h., 13:30h., 19:30h. e 01:30h.), através de venopunção jugular a vácuo, durante um período de 06 semanas, perfazendo um total de 120 amostras sangüíneas colhidas para este hormônio. Para as dosagens de estradiol,  $T_3$  e  $T_4$ , as amostras de sangue foram colhidas semanalmente sempre no mesmo horário cada animal (aproximadamente às 07:30h.), também através de venopunção jugular a vácuo, durante um período de 06 semanas, perfazendo um total de 30 amostras sangüíneas colhidas para os citados hormônios.

Após colheita em tubos heparinizados de 10 mL, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 RPM durante 5 minutos para separação do plasma, sendo este recolhido e acondicionado em tubos plásticos tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, devidamente identificados e fracionados em 2 alíquotas; em seguida, as amostras foram armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As amostras de plasma foram convenientemente transportadas para o Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH), onde permaneceram congeladas até o momento das dosagens.

#### 4.2.4 Dosagens das Concentrações Plasmáticas Hormonais

As concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina ( $T_3$ ) e tiroxina ( $T_4$ ) foram determinadas através de técnica de Radioimunoensaio (RIE) em fase sólida. Neste método, o hormônio contido no plasma é retido em anticorpo aderido à parede do tubo ("fase sólida"). Sem necessidade de extração prévia, os hormônios marcados com  $^{125}\text{I}$  são usados como competidores, e a radioatividade remanescente é medida em contador gama.

As amostras foram transferidas do freezer ( $-18^\circ\text{C}$ ) para o refrigerador ( $4^\circ\text{C}$ ) até seu descongelamento. Os reagentes, tubos e amostras foram mantidos em temperatura ambiente ( $21^\circ\text{C}$ ) com antecedência de 30 minutos ao início do ensaio. O volume de reagente utilizado para as amostras e os controles (todos em duplicata) foi de  $100\ \mu\text{L}$ .

Após a adição dos hormônios marcados, os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 3 horas e, a seguir, o sobrenadante foi removido por decantação. Os tubos foram levados ao contador de radiação gama e os resultados das contagens convertidos em  $\text{pg/mL}$  (estradiol),  $\text{ng/dL}$  (testosterona),  $\text{ng/mL}$  ( $T_3$ ) e  $\text{mg/dL}$  ( $T_4$ ). Todas as amostras do experimento foram dosadas em duplicata.

#### 4.2.5 Controle de Qualidade dos Radioimunoensaios.

Os controles de qualidade dos radioimunoensaios (RIE) para dosagem (em duplicata) das concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona,  $T_3$  e  $T_4$  contendo valores baixos e altos para os cálculos dos coeficientes de variação inter-ensaio (inferior

a 10%) e intra-ensaio (inferior a 15%) foram os seguintes:

- Estradiol: coeficientes de variação intra-ensaio para valores baixos e altos e sensibilidade de 9,00, 2,95 e 93,20%, respectivamente;
- Testosterona: coeficientes de variação intra-ensaio para valores baixos e altos e sensibilidade de 14,01, 9,41 e 93,05%, respectivamente;
- T<sub>3</sub>: coeficientes de variação intra-ensaio para valores baixos e altos e sensibilidade de 7,54, 0,18 e 93,20%, respectivamente;
- T<sub>4</sub>: coeficientes de variação intra-ensaio para valores baixos e altos e sensibilidade de 12,86, 3,43 e 92,70%, respectivamente;

#### **4.2.6 Colheitas de Sêmen**

Os 05 garanhões foram submetidos à colheita de sêmen através de vagina artificial modelo Missouri, com o auxílio de “égua-manequim” em estro, devidamente contida fisicamente para que riscos de acidentes fossem evitados.

Duas colheitas de sêmen semanais, durante três semanas foram realizadas antes do início do experimento para o “nivelamento biológico” do sêmen de cada garanhão. As colheitas foram realizadas durante um período de 06 semanas (12 ejaculados/animal), perfazendo um total de 60 ejaculados analisados.

#### **4.2.7 Resfriamento Seminal**

O resfriamento do sêmen foi realizado em resfriadora automática de sêmen, calibrada pelo fabricante para alcançar temperatura estável de manutenção à 5°C

através de taxa de resfriamento de aproximadamente  $0,1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ .

#### 4.2.8 Análises Seminais

As características seminais consideradas e analisadas foram: volume livre de gel (mL), concentração ( $10^6$  sptzs/mL), total de espermatozóides no ejaculado ( $10^9$  sptzs), motilidades total e progressiva (%), vigor (1 a 5), características morfológicas patológicas (%) e integridade de membrana (%).

As análises seminais foram realizadas em quatro momentos distintos, a saber:

- Tempo 0h: imediatamente após a colheita de sêmen dos garanhões foram analisados volume livre de gel, concentração, total de espermatozóides no ejaculado, vigor, motilidade total e motilidade progressiva;
- Tempos 24, 48 e 72hs: transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento do sêmen oriundo de cada colheita de cada garanhão, foram analisados vigor e motilidade progressiva.

Em cada um dos quatro momentos distintos acima descritos, para cada colheita seminal de cada garanhão, foram realizadas lâminas com coloração específica para as avaliações morfológicas (patologias) do sêmen. As características morfológicas consideradas (%) foram defeitos maiores e menores de cabeça e cauda, defeitos de peça intermediária e o total de defeitos.

Para fins de análise da integridade de membrana acrossômica, os espermatozóides foram agrupados em quatro categorias: a) vivos com acrossomo intacto; b) vivos com acrossomo lesado; c) mortos com acrossomo lesado e d) mortos com acrossomo intacto.

#### 4.2.8.1 Técnicas de Análise Seminal Física

O volume livre de gel de cada ejaculado foi medido em provetas graduadas até 200 mL.

A concentração dos ejaculados foi determinada através de Câmara de Neubauer e o número de espermatozóides registrado em mL após diluição em que se utilizou 1,9 mL de água destilada e 0,1 mL de sêmen.

O número total de espermatozóides ejaculados (em bilhões) foi calculado mediante multiplicação do resultado do volume de cada ejaculado em mL, pelo número de células espermáticas /mL.

A atividade de movimento dos espermatozóides foi medida sobre lâmina microscópica aquecida a 35-37°C, onde se depositou uma gota de sêmen imediatamente recoberta por uma lamínula; o exame foi realizado através de microscopia de contraste de fase, com o resultado emitido em porcentagem (0 a 100%). O vigor espermático foi analisado segundo escala padronizada (1 a 5), onde o menor valor (1) representa espermatozóides com vigor mínimo e o maior valor (5) representa espermatozóides com vigor máximo.

#### 4.2.8.2 Técnicas de Análise Seminal Morfológica

Para a análise da morfologia espermática o sêmen foi diluído e fixado em formol salino tamponado. Cada amostra de sêmen foi avaliada utilizando-se a técnica da câmara úmida, sendo que uma gota do sêmen diluído foi depositada sobre lâmina, coberta por lamínula e analisada em microscópio de contraste de fase (marca Carl Zeiss, modelo ICS-Standard 25) com aumento de 1000x sob óleo de imersão. A avaliação morfológica espermática foi procedida com a contagem de 200 espermatozóides, analisando-se as alterações de forma e estrutura e classificando-as conforme a seguir:

1) Defeitos Maiores: acrossoma (destacado, *knobbed*, lesado); gota protoplasmática proximal; cabeça: (subdesenvolvida, cauda enrolada na cabeça, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal, coloração anormal, contorno anormal, *pouch formation*); formas teratológicas (duas caudas, duas peças intermediárias, entre outros); peça intermediária (fibrilação, fratura total e parcial, edema, pseudogota); cauda (fortemente dobrada ou enrolada, dobrada com gota protoplasmática distal anexa);

2) Defeitos Menores: cabeça (delgada, gigante, curta, larga, pequena normal, isolada normal); inserções abaxial, retroaxial e oblíqua; gota protoplasmática distal; cauda (enrolada, dobrada).

#### 4.2.8.3 Técnicas de Análise de Integridade de Membrana

A morfologia espermática foi analisada a partir de esfregaços confeccionados em lâminas microscópicas, coradas pelo método a seguir, descrito por Souza (2001). Foram examinadas 200 células espermáticas de cada esfregaço e os resultados registrados em porcentagem com a classificação das patologias.

Uma gota de 0,8 mL do corante *Trypan Blue* 0,2 % (*Trypan Blue* 0,4% diluído em NaCl 1:1) foi adicionada a uma gota de igual volume de sêmen, sobre uma lâmina e homogeneizada com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Na superfície da mesma lâmina foi realizado um esfregaço; a lâmina foi seca ao ar a temperatura ambiente e em posição próxima da vertical. Após a secagem, foi procedida a fixação por 2 minutos em solução de formaldeído e vermelho neutro (86 mL de HCl 1,0 N + 14 mL de formaldeído 37% + 0,2 g de vermelho neutro). Após o período de fixação, ambos os lados da lâmina foram lavados com água destilada corrente e em seguida as lâminas foram coradas em solução de 7,5% de Giemsa por 2 a 4 horas ou de um dia para o outro. A lâmina foi novamente lavada em água destilada corrente e seca ao ar. A avaliação foi realizada em microscópio óptico, em aumento de 1.000 vezes com lâmina sob lamínula em placa aquecida. Conforme citado, para fins de análise os espermatozóides foram agrupados em quatro categorias, apresentando as seguintes colorações, a saber: a) vivos com acrossomo intacto: azul claro na região pós acrossomal e rosa na região do acrossomo; b) vivos com acrossomo lesado: azul claro na região pós acrossomal e violeta claro, violeta escuro ou branco na região do acrossomo; c) mortos com acrossomo lesado: violeta escuro na região pós acrossomal e do acrossomo ou violeta escuro na região

pós acrossomal e violeta claro na região do acrossomo e d) mortos com acrossomo intacto: violeta escuro na região pós acrossomal e rosa na região do acrossomo.

### 4.3 Análise Estatística

Estatística descritiva foi utilizada para cálculo de valores de tendência central (médias) e variabilidade (erro padrão da média) para o seguinte conjunto de variáveis: idade e peso dos animais, concentrações hormonais, parâmetros seminais físicos e parâmetros seminais morfológicos. Sendo assim, os resultados foram expressos através de média  $\pm$  erro padrão da média de cada variável.

Foram utilizadas análises de variância (ANOVA) e correlações simples para as correspondências entre concentrações hormonais plasmáticas, longevidade espermática e características seminais físicas e morfológicas, fixando-se tempo de resfriamento do sêmen. Os dados foram analisados empregando-se o programa Stat-View<sup>®</sup> (SAS Institute, Inc. 1998). Quando o principal efeito foi significativo, as médias foram comparadas individualmente pelo teste de *Fisher*. A hipótese testada foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Raça, idade e peso corporal

Os dados relativos às raças, idades ( $\pm$  EPM) e pesos corporais ( $\pm$  EPM) dos garanhões encontram-se relacionados na tabela 1.

Tabela 1 – Raças, idades (anos) e pesos corporais (kg) de garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga - jul 2003

Garanhão	Raça	Idade (anos)	Peso (kg)
1	Brasileiro de Hipismo	14	574
2	Appalloosa	5	490
3	Árabe	14	464
4	Árabe	14	410
5	Brasileiro de Hipismo	5	592
Médias $\pm$ EPM		10,4 $\pm$ 2,2	506 $\pm$ 34,1

### 5.2 Concentrações Plasmáticas Hormonais

As concentrações plasmáticas (médias  $\pm$  EPM) de estradiol, testosterona, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> dos garanhões avaliados ao longo do período experimental encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações plasmáticas (médias  $\pm$  DPM) de estradiol, testosterona, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> de garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Estradiol (pg/mL)	Testosterona (ng/dL)	T <sub>3</sub> (ng/mL)	T <sub>4</sub> (mg/dL)
1	245,14 $\pm$ 21,64 <sup>a</sup>	77,01 $\pm$ 20,45 <sup>a</sup>	50,79 $\pm$ 5,98 <sup>a</sup>	1,11 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
2	261,53 $\pm$ 57,16 <sup>a</sup>	74,63 $\pm$ 29,28 <sup>a</sup>	52,60 $\pm$ 8,55 <sup>a</sup>	0,64 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>
3	197,98 $\pm$ 24,27 <sup>b</sup>	32,00 $\pm$ 9,58 <sup>b</sup>	38,00 $\pm$ 6,52 <sup>b</sup>	0,77 $\pm$ 0,26 <sup>b, c</sup>
4	192,22 $\pm$ 18,08 <sup>b</sup>	78,53 $\pm$ 24,94 <sup>a</sup>	47,70 $\pm$ 14,30 <sup>a</sup>	1,00 $\pm$ 0,13 <sup>b, c</sup>
5	88,72 $\pm$ 5,60 <sup>c</sup>	63,00 $\pm$ 12,47 <sup>a</sup>	53,89 $\pm$ 5,86 <sup>a</sup>	1,44 $\pm$ 0,37 <sup>d</sup>

Médias seguidas de mesma letra, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ )

### 5.3 Características Seminais Físicas

Os valores totais (médias  $\pm$  EPM) de volume, concentração e número total de espermatozoides por ejaculado, observados no tempo 0h, encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Totais de volume, concentração e número total de espermatozoides por ejaculado (médias  $\pm$  EPM) no tempo 0h, de garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Volume (mL)	Concentração (10 <sup>6</sup> sptz/mL)	Total de sptz/ejaculado (10 <sup>9</sup> sptz)
1	80,41 $\pm$ 7,51 <sup>a</sup>	156,25 $\pm$ 21,49 <sup>a</sup>	9,81 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>
2	45,41 $\pm$ 4,35 <sup>b</sup>	183,12 $\pm$ 23,05 <sup>a</sup>	8,07 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>
3	23,95 $\pm$ 1,72 <sup>c</sup>	334,58 $\pm$ 33,98 <sup>b</sup>	7,99 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup>
4	56,91 $\pm$ 3,74 <sup>b</sup>	148,12 $\pm$ 36,01 <sup>a</sup>	8,48 $\pm$ 2,30 <sup>a</sup>
5	57,25 $\pm$ 2,25 <sup>b</sup>	185,62 $\pm$ 16,35 <sup>a</sup>	10,26 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>

Médias seguidas de mesma letra, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ )

As motilidades total e progressiva, bem como vigor, observados imediatamente após a colheita de sêmen (tempo 0h) em cada garanhão, encontram-se apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Totais de vigor, motilidade total e motilidade progressiva (médias  $\pm$  DPM) no tempo 0h, de garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Vigor (1 - 5)	Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)
1	3,41 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	74,16 $\pm$ 3,76 <sup>a</sup>	60,00 $\pm$ 5,70 <sup>a</sup>
2	3,62 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	76,25 $\pm$ 3,06 <sup>a</sup>	60,00 $\pm$ 5,70 <sup>a</sup>
3	3,91 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	78,33 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>	65,41 $\pm$ 5,30 <sup>a</sup>
4	3,00 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	73,33 $\pm$ 3,41 <sup>a</sup>	49,16 $\pm$ 7,36 <sup>b</sup>
5	3,45 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	73,50 $\pm$ 3,44 <sup>a</sup>	60,83 $\pm$ 6,05 <sup>a</sup>

Médias seguidas de mesma letra, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ )

As motilidades progressivas (médias  $\pm$  EPM), observadas em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C, encontram-se apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 – Motilidades progressivas (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0, 24, 48 e 72h de resfriamento em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Motilidade Progressiva (%)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	60,00 $\pm$ 5,70 <sup>a,A</sup>	37,08 $\pm$ 11,17 <sup>a,B</sup>	26,66 $\pm$ 12,00 <sup>a,C</sup>	18,33 $\pm$ 13,38 <sup>a,D</sup>
2	60,00 $\pm$ 5,70 <sup>a,A</sup>	59,58 $\pm$ 6,89 <sup>b,A</sup>	52,50 $\pm$ 6,51 <sup>b,A</sup>	41,25 $\pm$ 6,27 <sup>b,B</sup>
3	65,41 $\pm$ 5,30 <sup>a,A</sup>	58,75 $\pm$ 6,44 <sup>b,A</sup>	45,41 $\pm$ 8,57 <sup>b,B</sup>	35,83 $\pm$ 7,85 <sup>b,C</sup>
4	49,16 $\pm$ 7,36 <sup>b,A</sup>	35,00 $\pm$ 5,64 <sup>a,B</sup>	22,91 $\pm$ 10,65 <sup>a,C</sup>	12,08 $\pm$ 8,12 <sup>a,D</sup>
5	60,83 $\pm$ 6,05 <sup>a,A</sup>	58,33 $\pm$ 6,15 <sup>b,A</sup>	46,25 $\pm$ 6,84 <sup>b,B</sup>	30,41 $\pm$ 10,88 <sup>b,C</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ).

Os valores de vigor (médias  $\pm$  EPM), observados em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C, encontram-se apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 – Vigor (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0, 24, 48 e 72h de resfriamento em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Vigor (1 – 5)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	3,41 $\pm$ 0,13 <sup>a,A</sup>	2,33 $\pm$ 0,49 <sup>a,B</sup>	1,83 $\pm$ 1,5 <sup>a,C</sup>	1,50 $\pm$ 0,41 <sup>a,C</sup>
2	3,62 $\pm$ 0,26 <sup>a,A</sup>	2,83 $\pm$ 0,38 <sup>a,A</sup>	2,45 $\pm$ 0,33 <sup>b,A,B</sup>	2,12 $\pm$ 0,13 <sup>b,B</sup>
3	3,91 $\pm$ 0,34 <sup>a,A</sup>	2,95 $\pm$ 0,25 <sup>a,B</sup>	2,45 $\pm$ 0,33 <sup>a,B</sup>	2,08 $\pm$ 0,20 <sup>b,C</sup>
4	3,00 $\pm$ 0,35 <sup>a,A</sup>	2,25 $\pm$ 0,26 <sup>a,A</sup>	2,12 $\pm$ 0,13 <sup>a,A,B</sup>	1,70 $\pm$ 0,40 <sup>a,B</sup>
5	3,45 $\pm$ 0,40 <sup>a,A</sup>	2,79 $\pm$ 0,39 <sup>a,A</sup>	2,37 $\pm$ 0,41 <sup>b,A,B</sup>	2,04 $\pm$ 0,24 <sup>b,B</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ).

As motilidades progressivas de cada um dos garanhões avaliados, nos tempos 0, 24, 48 e 72 hs em conjunto às médias das concentrações plasmáticas de estradiol encontram-se apresentadas no gráfico 1.

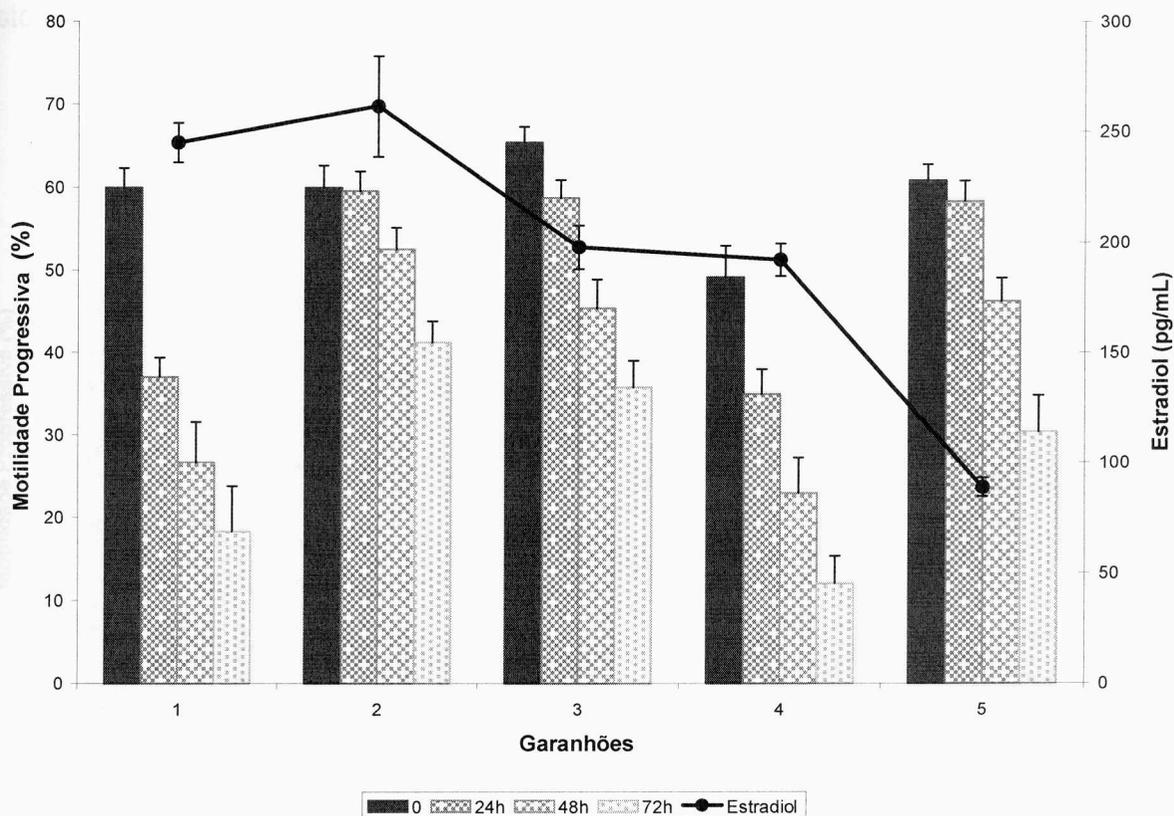


Gráfico 1 – Motilidade progressiva (médias  $\pm$  EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de estradiol (médias  $\pm$  EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

As motilidades progressivas de cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C em conjunto às médias das concentrações plasmáticas de testosterona, encontram-se apresentadas no gráfico 2.

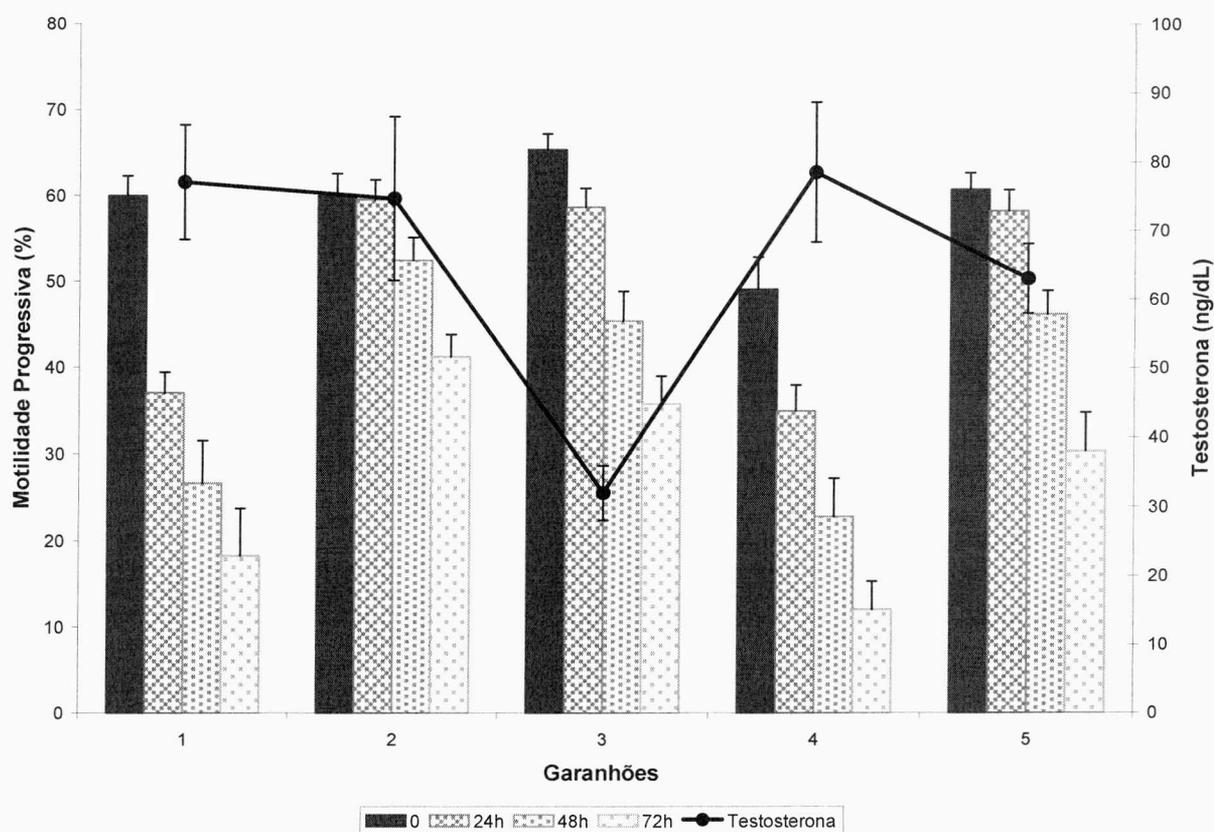


Gráfico 2 – Motilidade progressiva (médias  $\pm$  EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de testosterona (médias  $\pm$  EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

As motilidades progressivas, observadas em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C em conjunto às médias das concentrações plasmáticas de T<sub>3</sub> encontram-se apresentadas no gráfico 3.

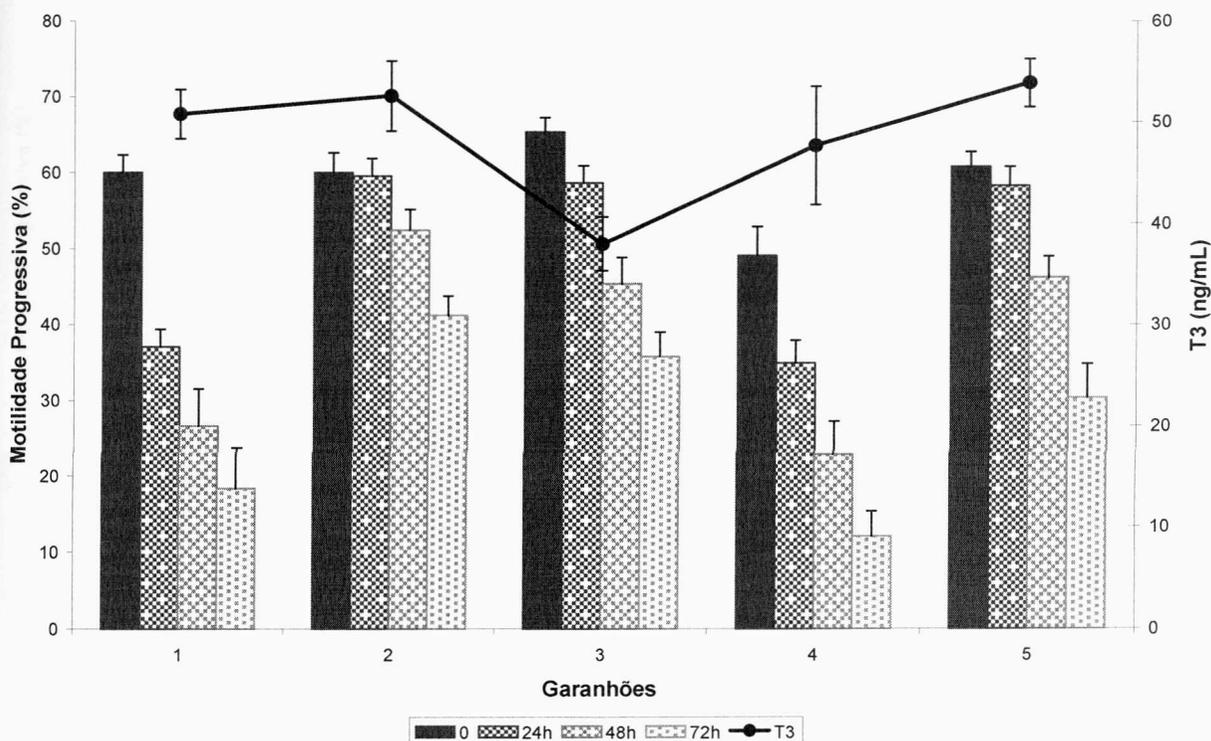


Gráfico 3 – Motilidade progressiva (médias ± EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de T<sub>3</sub> (médias ± EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

As motilidades progressivas, observadas em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C em conjunto às médias das concentrações plasmáticas de T<sub>4</sub> encontram-se apresentadas no gráfico 4.

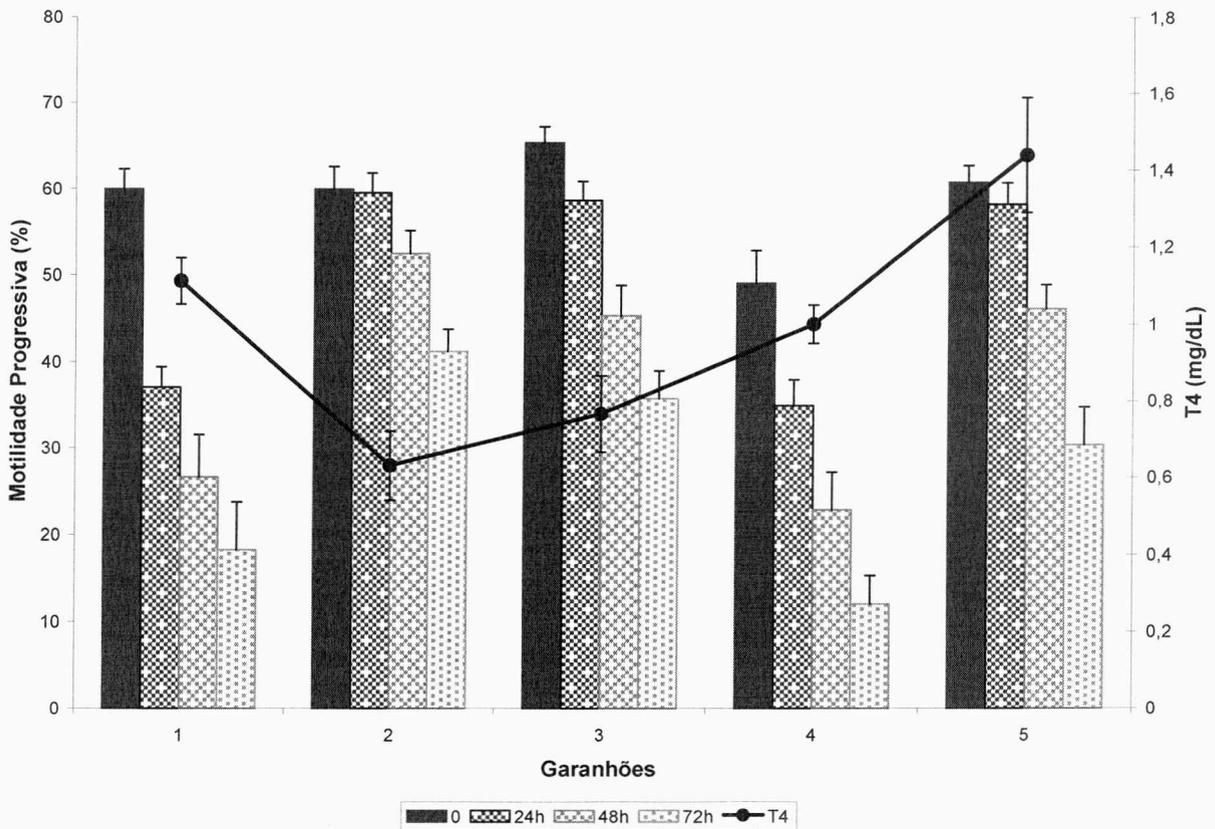


Gráfico 4 – Motilidade progressiva (médias ± EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de T<sub>4</sub> (médias ± EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

O vigor, observado em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C em conjunto às médias das concentrações plasmáticas de estradiol encontra-se apresentado no gráfico 5.

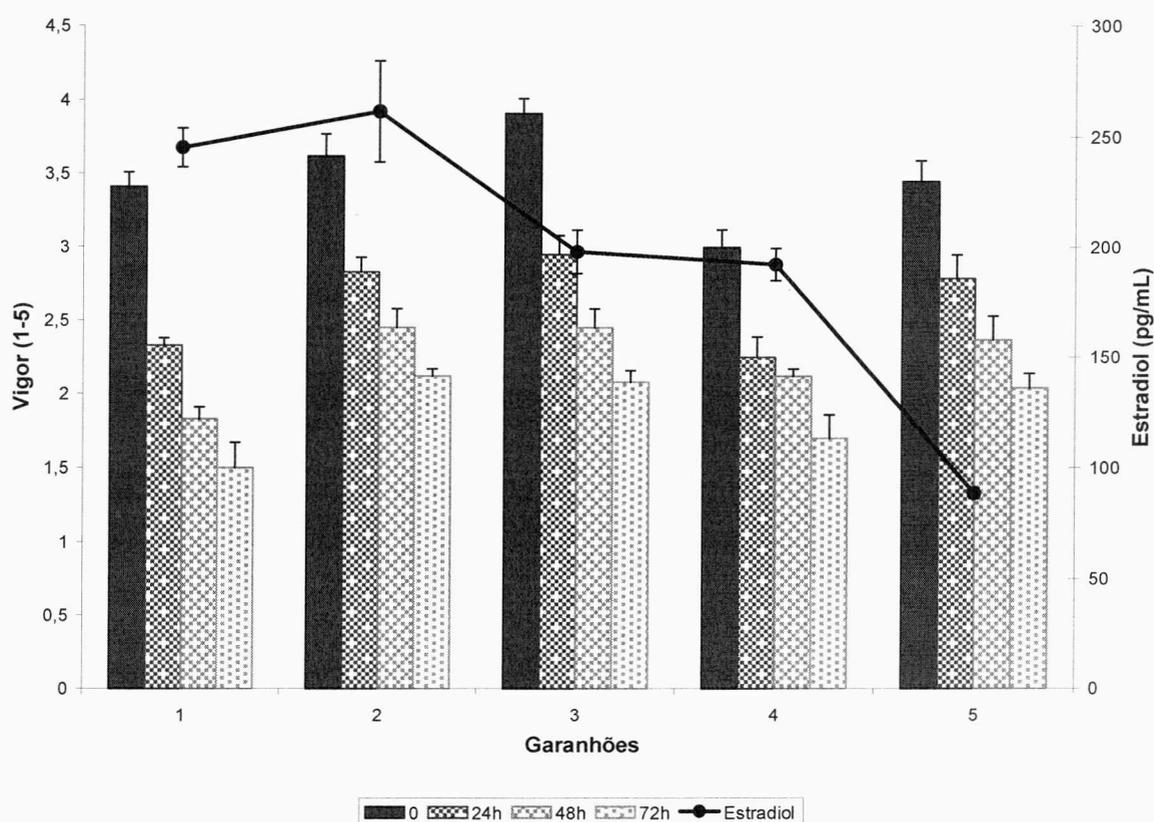


Gráfico 5 – Vigor (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de estradiol (médias  $\pm$  EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

O vigor, observado em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C em conjunto às médias das concentrações plasmáticas de testosterona encontra-se apresentado no gráfico 6.

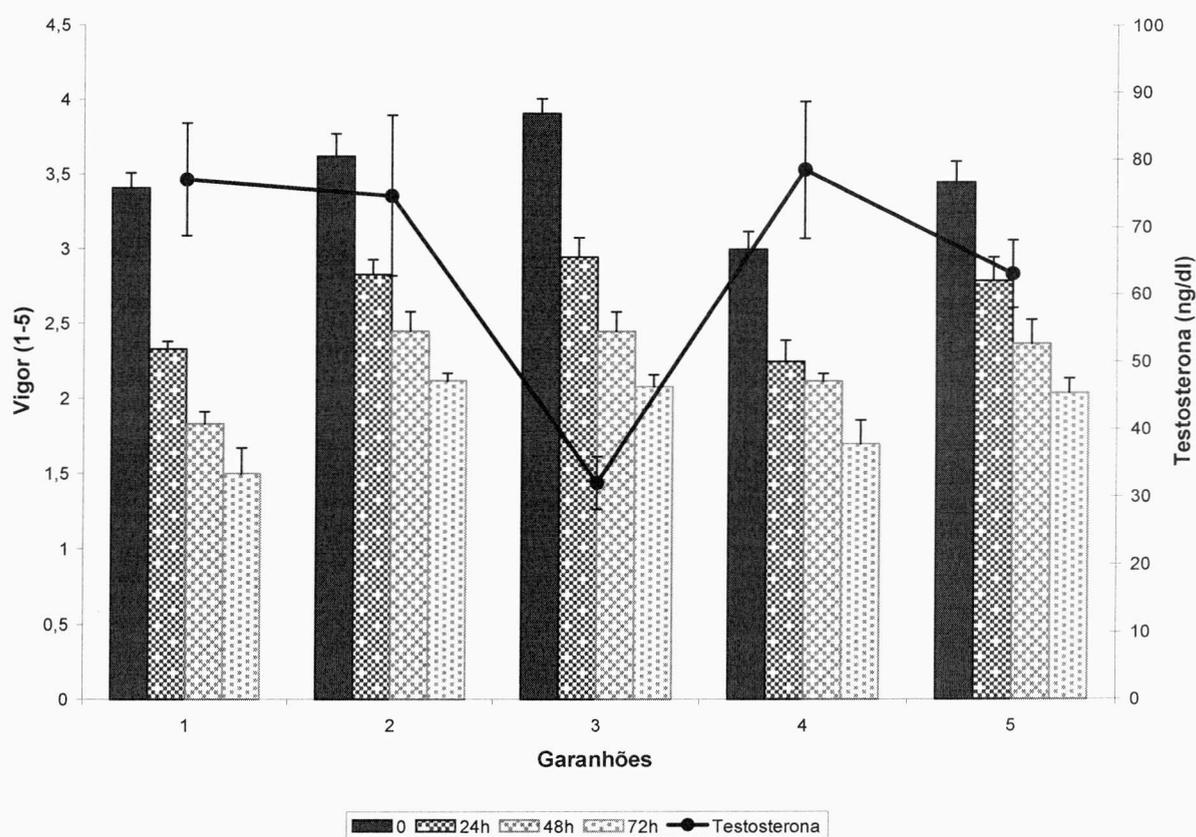


Gráfico 6 – Vigor (médias  $\pm$  EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de testosterona (médias  $\pm$  EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

O vigor, observado em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento a 5° C em conjunto às médias das concentrações plasmáticas de T<sub>3</sub> encontra-se apresentado no gráfico 7.

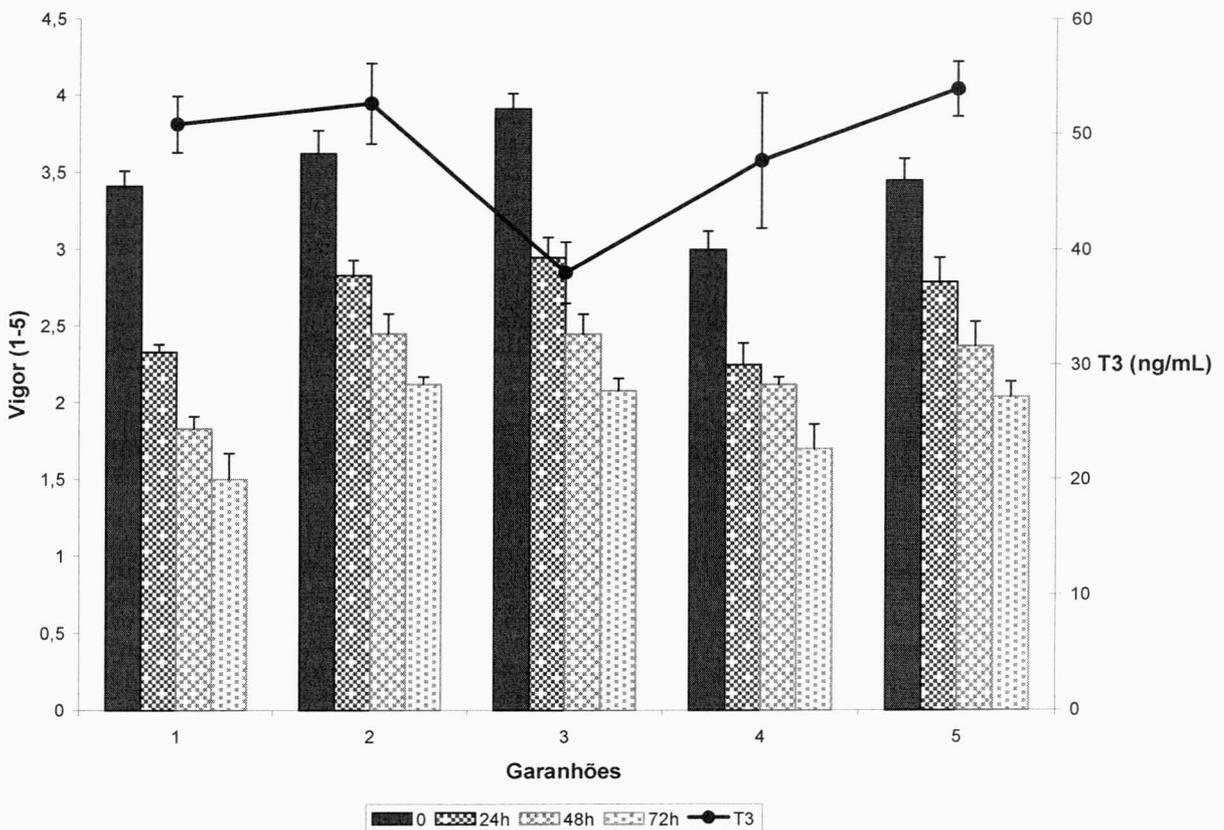


Gráfico 7 – Vigor (médias ± EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de T<sub>3</sub> (médias ± EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

O vigor, observado em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento a 5° C em conjunto às médias das concentrações plasmáticas de T<sub>4</sub> encontra-se apresentado no gráfico 8.

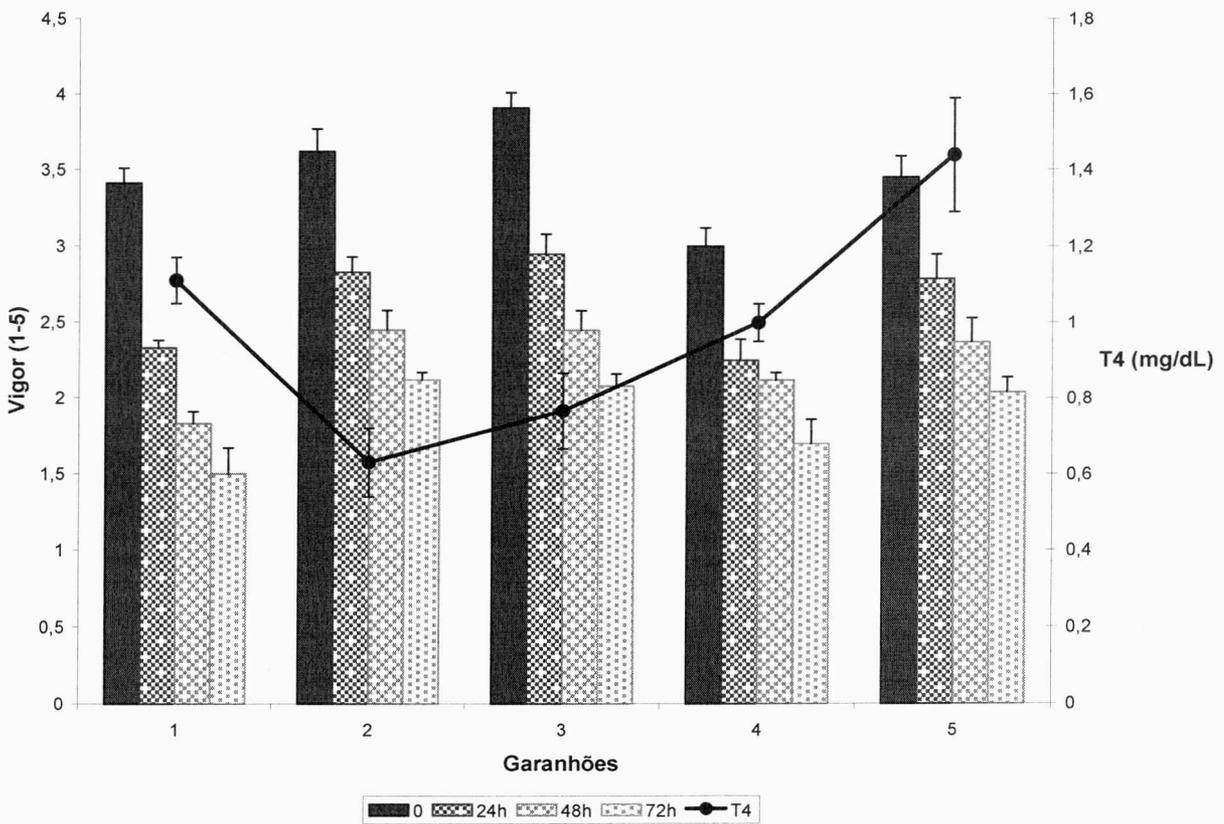


Gráfico 8 – Vigor (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de T<sub>4</sub> (médias  $\pm$  EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

#### 5.4 Morfologia Espermática

Os valores correspondentes aos totais de defeitos maiores de cabeça (médias  $\pm$  EPM), observados em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 7.

Tabela 7 – Total de defeitos maiores de cabeça (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24hs, 48hs e 72hs em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Defeitos Maiores de Cabeça (%)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	1,67 $\pm$ 0,33 <sup>a,A</sup>	1,00 $\pm$ 0,31 <sup>a,B</sup>	1,00 $\pm$ 0,26 <sup>a,B</sup>	1,16 $\pm$ 1,67 <sup>a,B</sup>
2	1,40 $\pm$ 0,24 <sup>a,A</sup>	0,66 $\pm$ 0,21 <sup>b,B</sup>	1,00 $\pm$ 0,36 <sup>a,A</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b,C</sup>
3	0,50 $\pm$ 0,34 <sup>b,A</sup>	1,33 $\pm$ 0,61 <sup>c,B</sup>	0,83 $\pm$ 0,40 <sup>a,A</sup>	0,50 $\pm$ 0,29 <sup>c,A</sup>
4	0,66 $\pm$ 0,33 <sup>b,A</sup>	1,50 $\pm$ 0,34 <sup>c,B</sup>	0,83 $\pm$ 0,40 <sup>a,A</sup>	2,00 $\pm$ 0,36 <sup>d,C</sup>
5	1,00 $\pm$ 0,26 <sup>c,A</sup>	0,83 $\pm$ 0,30 <sup>b,A</sup>	0,83 $\pm$ 0,40 <sup>a,A</sup>	0,33 $\pm$ 0,21 <sup>c,B</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Os valores correspondentes aos totais de defeitos menores de cabeça (médias  $\pm$  EPM), observados em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 8.

Tabela 8 – Total de defeitos menores de cabeça (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24hs, 48hs e 72hs em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Defeitos Menores de Cabeça (%)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	0,75 $\pm$ 0,25 <sup>a,A</sup>	0,63 $\pm$ 0,24 <sup>a,A</sup>	0,36 $\pm$ 0,15 <sup>a,B</sup>	0,33 $\pm$ 0,18 <sup>a,B</sup>
2	2,09 $\pm$ 0,56 <sup>b,A</sup>	0,63 $\pm$ 0,20 <sup>a,B</sup>	0,60 $\pm$ 0,22 <sup>b,B</sup>	0,11 $\pm$ 0,11 <sup>b,C</sup>
3	1,25 $\pm$ 0,25 <sup>c,A</sup>	0,58 $\pm$ 0,22 <sup>a,B</sup>	0,54 $\pm$ 0,20 <sup>b,B</sup>	0,25 $\pm$ 0,16 <sup>a,C</sup>
4	0,83 $\pm$ 0,32 <sup>a,A</sup>	0,91 $\pm$ 0,28 <sup>b,A</sup>	0,54 $\pm$ 0,36 <sup>b,B</sup>	0,41 $\pm$ 0,14 <sup>a,C</sup>
5	3,08 $\pm$ 0,51 <sup>d,A</sup>	1,00 $\pm$ 0,30 <sup>b,B</sup>	0,81 $\pm$ 0,29 <sup>c,C</sup>	0,91 $\pm$ 0,28 <sup>c,C</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ).

Os valores correspondentes aos totais de defeitos maiores de cauda (médias  $\pm$  EPM) observados em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 9.

Tabela 9 – Total de defeitos maiores de cauda (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24hs, 48hs e 72hs em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Defeitos Maiores de Cauda (%)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	2,16 $\pm$ 0,70 <sup>a,A</sup>	5,00 $\pm$ 0,70 <sup>a,B</sup>	5,16 $\pm$ 0,94 <sup>a,B</sup>	4,50 $\pm$ 1,05 <sup>a,C</sup>
2	4,80 $\pm$ 1,06 <sup>b,A</sup>	3,50 $\pm$ 1,11 <sup>b,B</sup>	4,00 $\pm$ 0,68 <sup>b,C</sup>	7,00 $\pm$ 1,58 <sup>b,D</sup>
3	3,00 $\pm$ 1,26 <sup>c,A</sup>	5,83 $\pm$ 0,83 <sup>c,B</sup>	5,00 $\pm$ 1,09 <sup>a,C</sup>	7,25 $\pm$ 0,48 <sup>b,D</sup>
4	2,00 $\pm$ 0,51 <sup>a,A</sup>	7,66 $\pm$ 1,66 <sup>d,B</sup>	7,83 $\pm$ 1,40 <sup>c,B</sup>	7,67 $\pm$ 2,12 <sup>b,B</sup>
5	2,83 $\pm$ 0,94 <sup>c,A</sup>	7,16 $\pm$ 0,80 <sup>d,B</sup>	5,33 $\pm$ 0,71 <sup>a,C</sup>	6,16 $\pm$ 0,60 <sup>c,D</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ).

Os valores correspondentes aos totais de defeitos menores de cauda (médias  $\pm$  EPM) observados em cada um dos gananhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 10.

Tabela 10 – Total de defeitos menores de cauda (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24hs, 48hs e 72hs em gananhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Defeitos Menores de Cauda (%)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	18,50 $\pm$ 3,63 <sup>a,A</sup>	7,63 $\pm$ 0,95 <sup>a,B</sup>	8,00 $\pm$ 1,85 <sup>a,B</sup>	4,33 $\pm$ 0,86 <sup>a,C</sup>
2	21,45 $\pm$ 3,39 <sup>a,A</sup>	9,45 $\pm$ 1,28 <sup>a,B</sup>	9,50 $\pm$ 1,31 <sup>a,B</sup>	12,33 $\pm$ 0,88 <sup>b,C</sup>
3	13,33 $\pm$ 3,68 <sup>b,A</sup>	7,66 $\pm$ 1,22 <sup>a,B</sup>	6,27 $\pm$ 0,66 <sup>b,B</sup>	5,00 $\pm$ 0,94 <sup>a,C</sup>
4	22,25 $\pm$ 3,65 <sup>a,A</sup>	4,16 $\pm$ 0,56 <sup>b,B</sup>	2,90 $\pm$ 0,56 <sup>c,C</sup>	2,41 $\pm$ 0,39 <sup>c,C</sup>
5	11,00 $\pm$ 2,36 <sup>b,A</sup>	14,83 $\pm$ 2,08 <sup>c,B</sup>	8,72 $\pm$ 1,85 <sup>a,C</sup>	9,25 $\pm$ 2,08 <sup>d,C</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Os valores correspondentes aos totais de defeitos de peça intermediária (médias  $\pm$  EPM) observados em cada um dos gananhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 11.

Tabela 11 – Total de defeitos de peça intermediária (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24hs, 48hs e 72hs em ganhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Ganhão	Defeitos de Peça Intermediária (%)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	5,00 $\pm$ 1,43 <sup>a,A</sup>	3,40 $\pm$ 1,03 <sup>a,B</sup>	3,33 $\pm$ 0,76 <sup>a,B</sup>	3,16 $\pm$ 0,60 <sup>a,B</sup>
2	2,60 $\pm$ 0,98 <sup>b,A</sup>	3,33 $\pm$ 0,33 <sup>a,B</sup>	3,00 $\pm$ 0,36 <sup>a,B</sup>	2,75 $\pm$ 0,85 <sup>b,A</sup>
3	5,00 $\pm$ 1,39 <sup>a,A</sup>	2,66 $\pm$ 0,55 <sup>b,B</sup>	2,50 $\pm$ 0,50 <sup>b,B</sup>	2,50 $\pm$ 0,86 <sup>b,B</sup>
4	20,83 $\pm$ 2,60 <sup>c,A</sup>	13,66 $\pm$ 1,90 <sup>c,B</sup>	13,00 $\pm$ 1,06 <sup>c,B</sup>	14,83 $\pm$ 1,83 <sup>c,C</sup>
5	6,83 $\pm$ 1,60 <sup>d,A</sup>	6,33 $\pm$ 1,11 <sup>d,A</sup>	5,66 $\pm$ 1,17 <sup>d,B</sup>	6,16 $\pm$ 0,65 <sup>d,C</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Os valores correspondentes aos totais de defeitos (médias  $\pm$  EPM) observados em cada um dos ganhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 12.

Tabela 12 – Total de defeitos (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24hs, 48hs e 72hs em ganhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Ganhão	Total de Defeitos (%)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	34,33 $\pm$ 3,21 <sup>a,A</sup>	27,27 $\pm$ 2,22 <sup>a,B</sup>	22,18 $\pm$ 2,10 <sup>a,B</sup>	18,25 $\pm$ 0,88 <sup>a,C</sup>
2	36,18 $\pm$ 3,33 <sup>a,A</sup>	21,00 $\pm$ 1,00 <sup>a,B</sup>	19,50 $\pm$ 1,59 <sup>a,B</sup>	22,22 $\pm$ 1,36 <sup>a,B</sup>
3	28,41 $\pm$ 4,36 <sup>b,A</sup>	26,00 $\pm$ 1,34 <sup>a,A</sup>	20,81 $\pm$ 1,04 <sup>a,B</sup>	18,50 $\pm$ 1,61 <sup>a,B</sup>
4	54,66 $\pm$ 3,22 <sup>c,A</sup>	34,50 $\pm$ 1,13 <sup>b,B</sup>	27,45 $\pm$ 1,65 <sup>b,C</sup>	30,33 $\pm$ 1,52 <sup>b,B,C</sup>
5	33,92 $\pm$ 2,51 <sup>a,A</sup>	38,50 $\pm$ 3,07 <sup>b,B</sup>	27,90 $\pm$ 2,75 <sup>b,A</sup>	27,83 $\pm$ 2,32 <sup>b,A</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ).

As porcentagens relativas ao total de defeitos espermáticos de cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C em conjunto às médias das concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> encontram-se apresentadas nos gráficos 9 a 12.

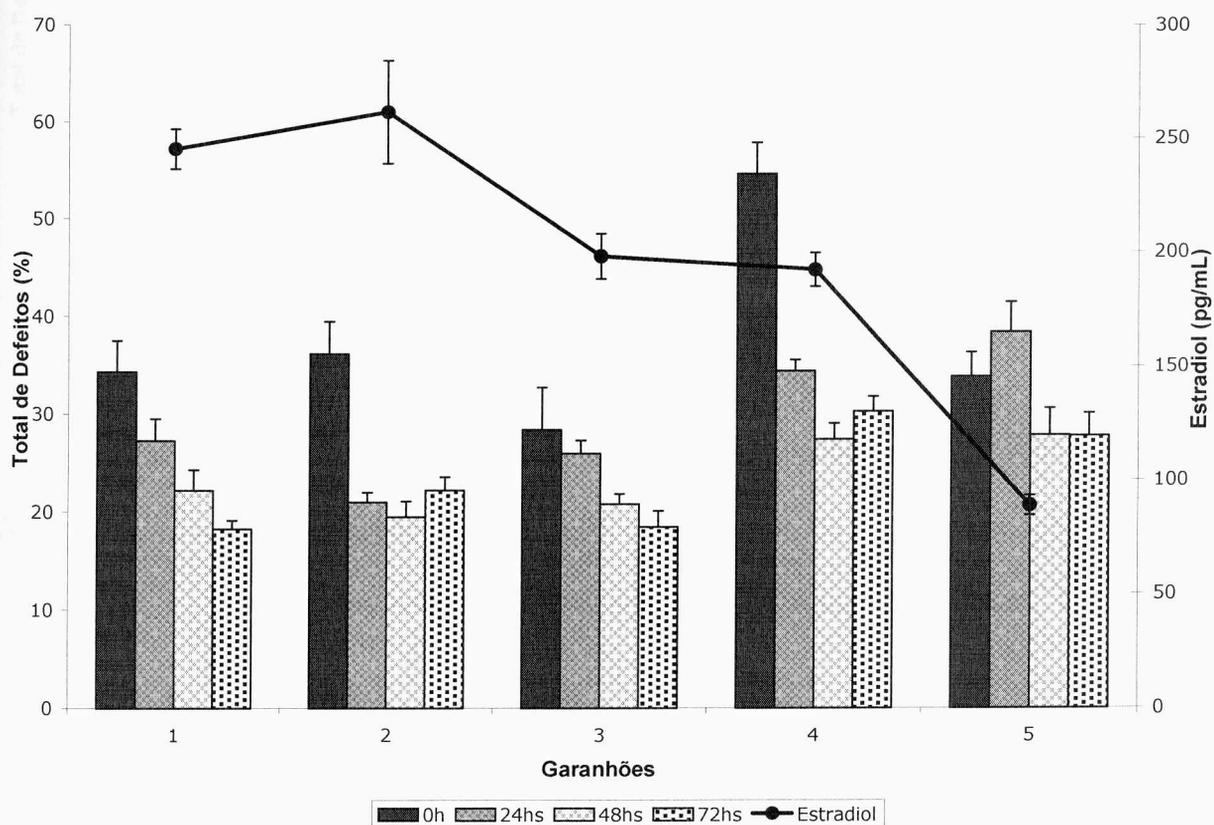


Gráfico 9 – Totais de defeitos (médias ± EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de estradiol (médias ± EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

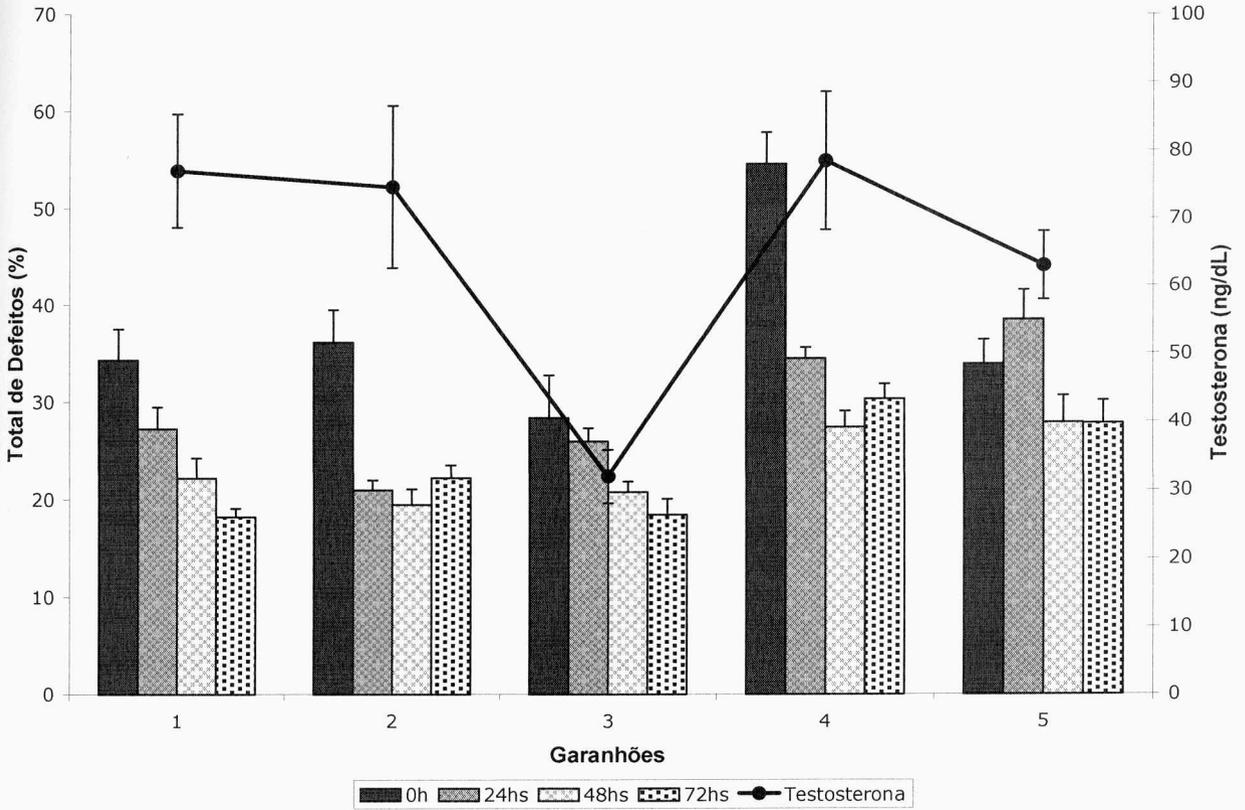


Gráfico 10 – Totais de defeitos (médias ± EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de testosterona (médias ± EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

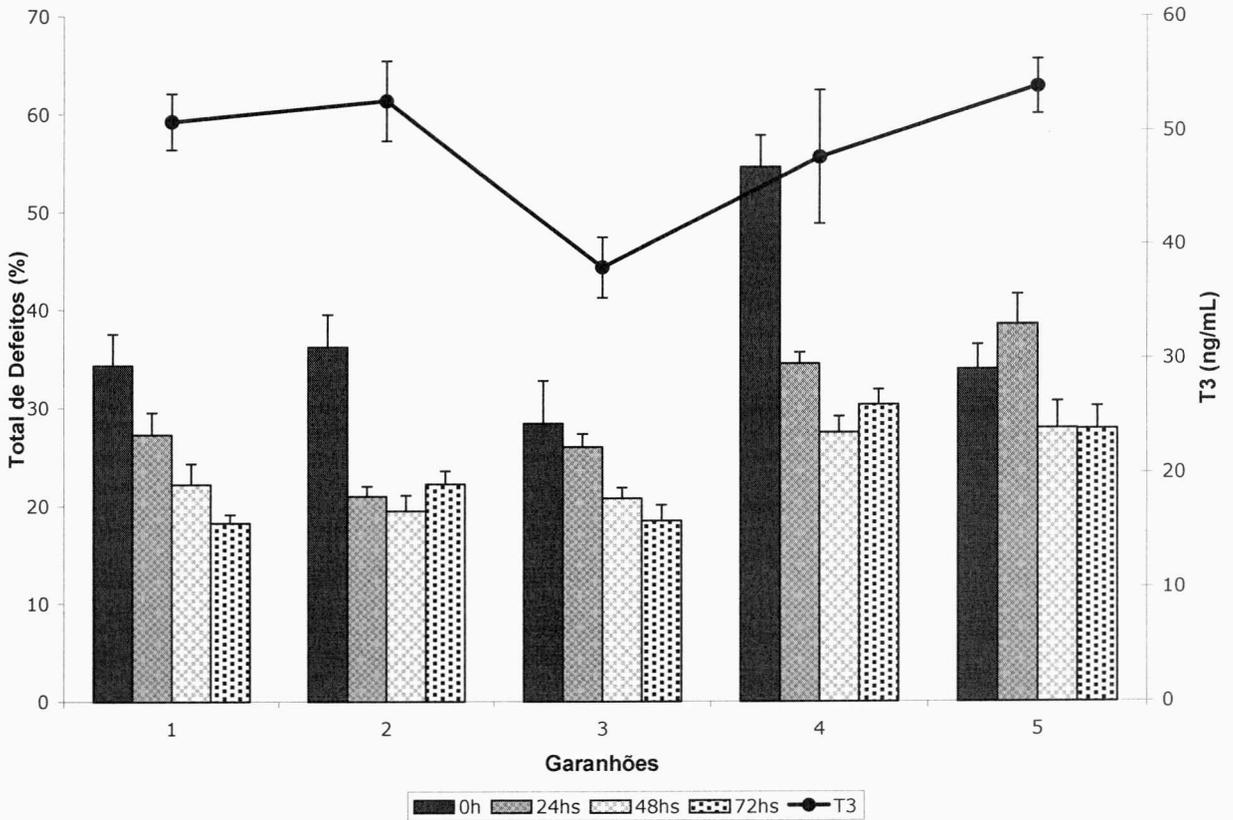


Gráfico 11 – Totais de defeitos (médias  $\pm$  EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de T<sub>3</sub> (médias  $\pm$  EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

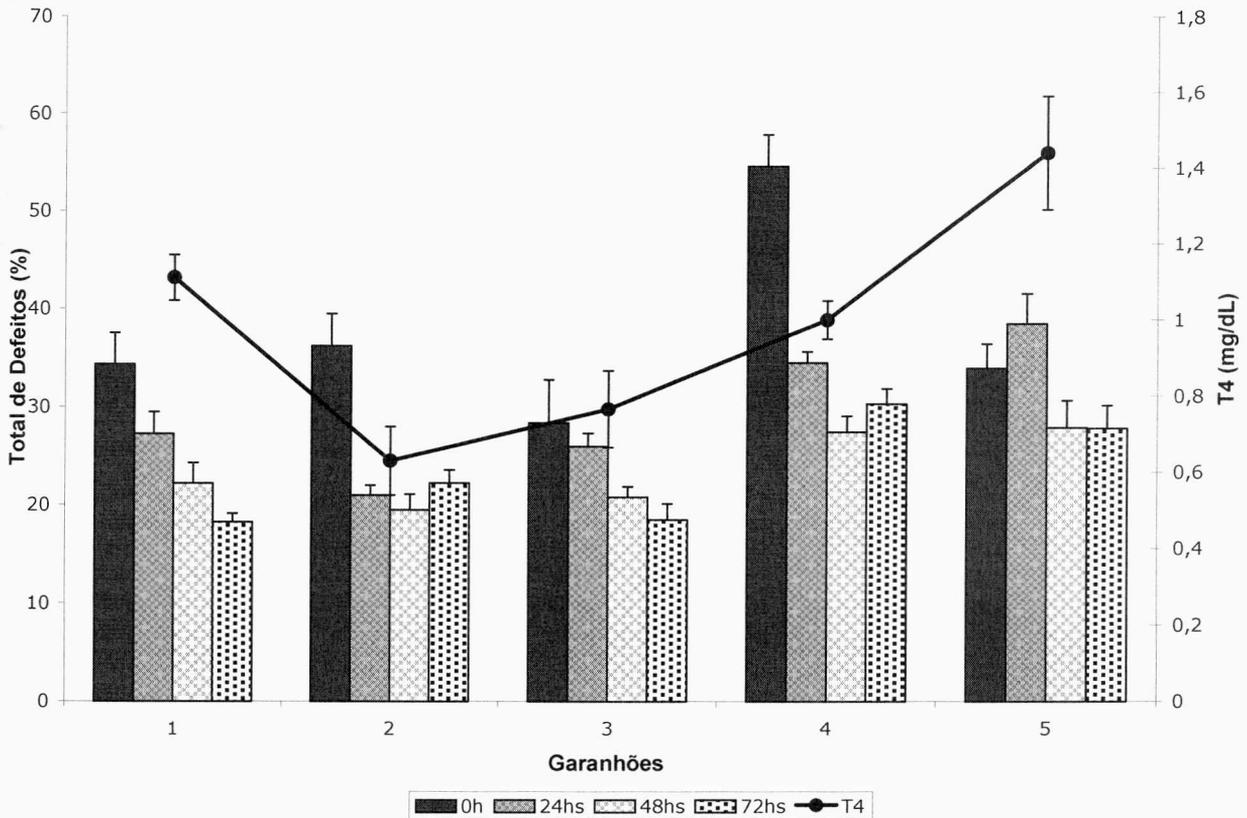


Gráfico 12 – Totais de defeitos (médias  $\pm$  EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de T<sub>4</sub> (médias  $\pm$  EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

### 5.5 Integridade de Membrana

Os valores (médias  $\pm$  EPM) correspondentes aos totais de espermatozoides vivos com acrossomo intacto (VAI), observados em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 13.

Tabela 13 – Total de espermatozóides vivos com acrossomo intacto (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24, 48 e 72hs em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Espermatozóides Vivos Com Acrossomo Intacto (%)				
Garanhão	0h	24hs	48hs	72hs
1	76,33 $\pm$ 3,72 <sup>a,A</sup>	48,43 $\pm$ 4,28 <sup>a,B</sup>	43,50 $\pm$ 6,98 <sup>a,B</sup>	34,28 $\pm$ 5,85 <sup>a,C</sup>
2	75,33 $\pm$ 3,85 <sup>a,A</sup>	49,57 $\pm$ 3,54 <sup>a,B</sup>	47,50 $\pm$ 5,13 <sup>a,B</sup>	36,28 $\pm$ 4,13 <sup>a,C</sup>
3	77,00 $\pm$ 1,29 <sup>a,A</sup>	52,42 $\pm$ 4,23 <sup>a,B</sup>	42,16 $\pm$ 3,57 <sup>a,C</sup>	30,85 $\pm$ 2,97 <sup>a,D</sup>
4	68,83 $\pm$ 2,00 <sup>b,A</sup>	41,14 $\pm$ 3,72 <sup>b,B</sup>	35,83 $\pm$ 3,75 <sup>b,C</sup>	29,43 $\pm$ 5,55 <sup>b,D</sup>
5	72,16 $\pm$ 4,01 <sup>a,A</sup>	54,43 $\pm$ 3,71 <sup>a,B</sup>	37,83 $\pm$ 7,04 <sup>b,C</sup>	22,71 $\pm$ 4,50 <sup>b,D</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ).

As porcentagens de espermatozóides vivos com acrossomo intacto (VAI) de cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen (0h) e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C em conjunto às médias das concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> encontram-se apresentadas nos gráficos 13 a 16.

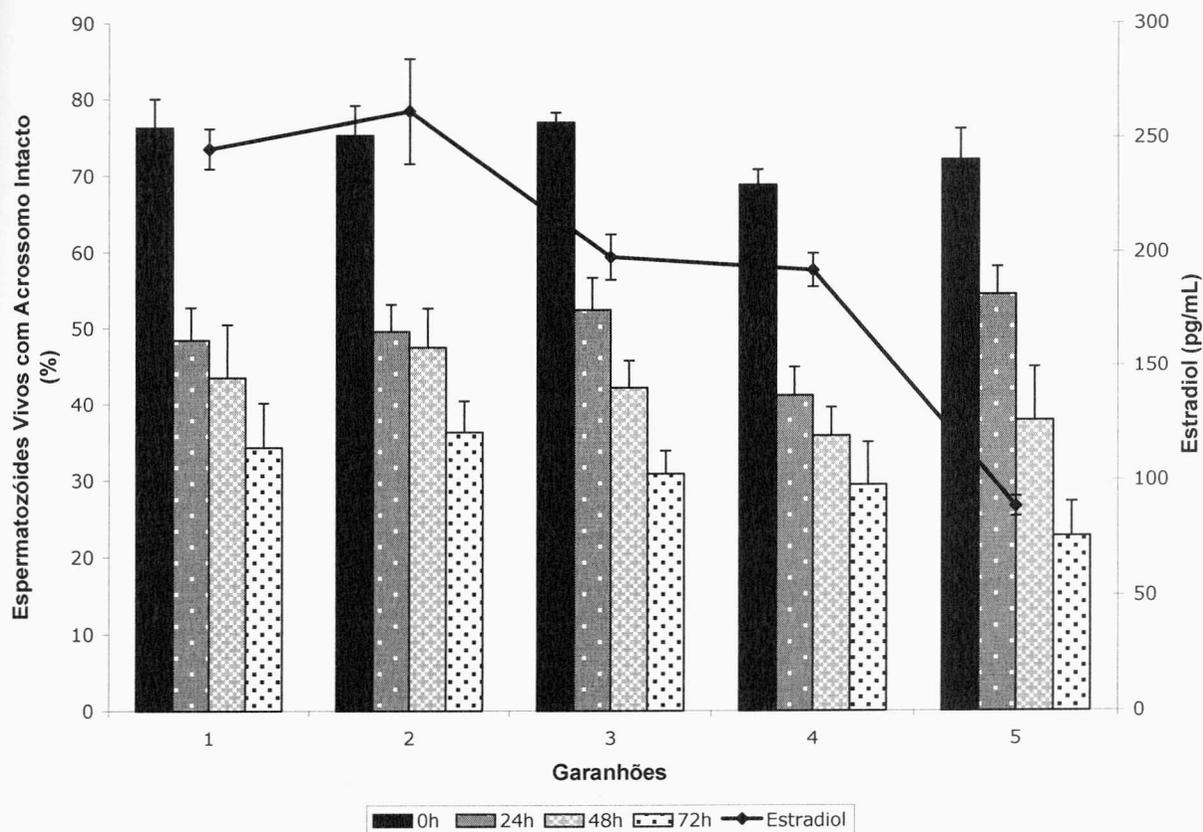


Gráfico 13 – VAI (médias ± EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de estradiol (médias ± EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

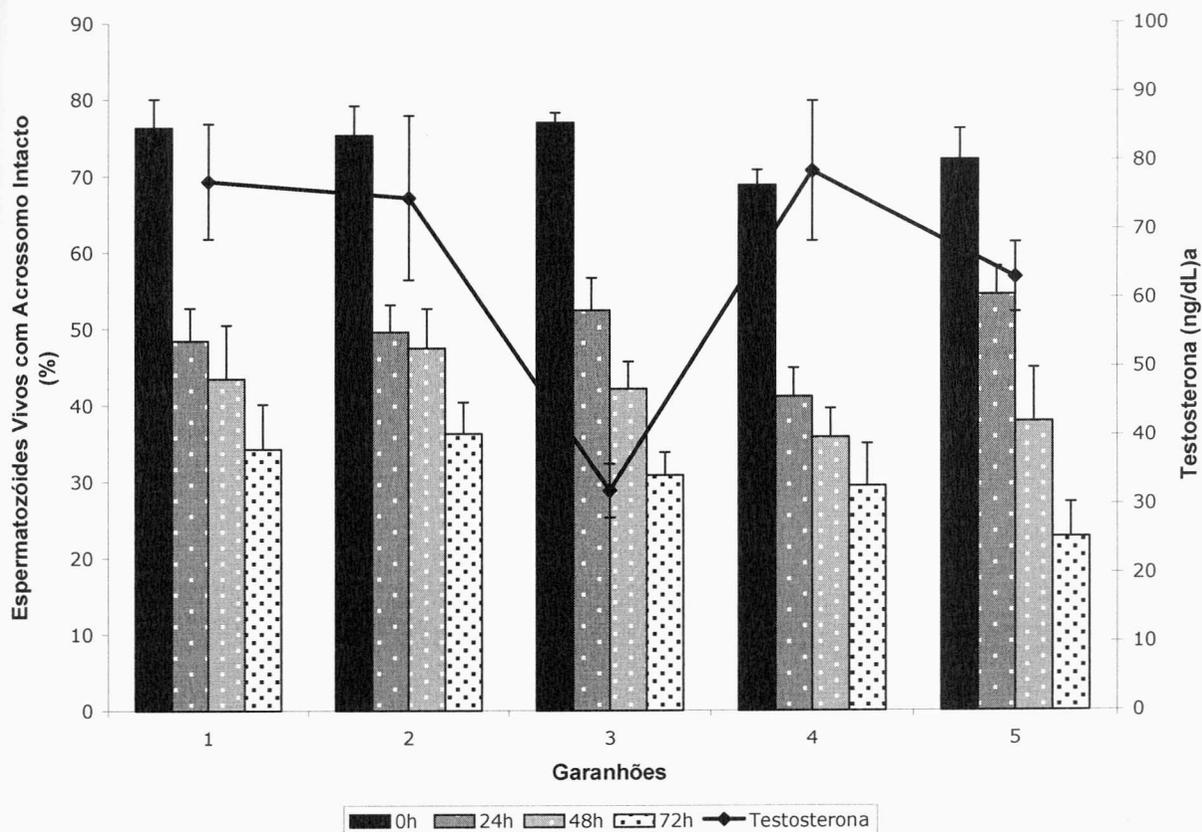


Gráfico 14 – VAI (médias ± EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de testosterona (médias ± EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

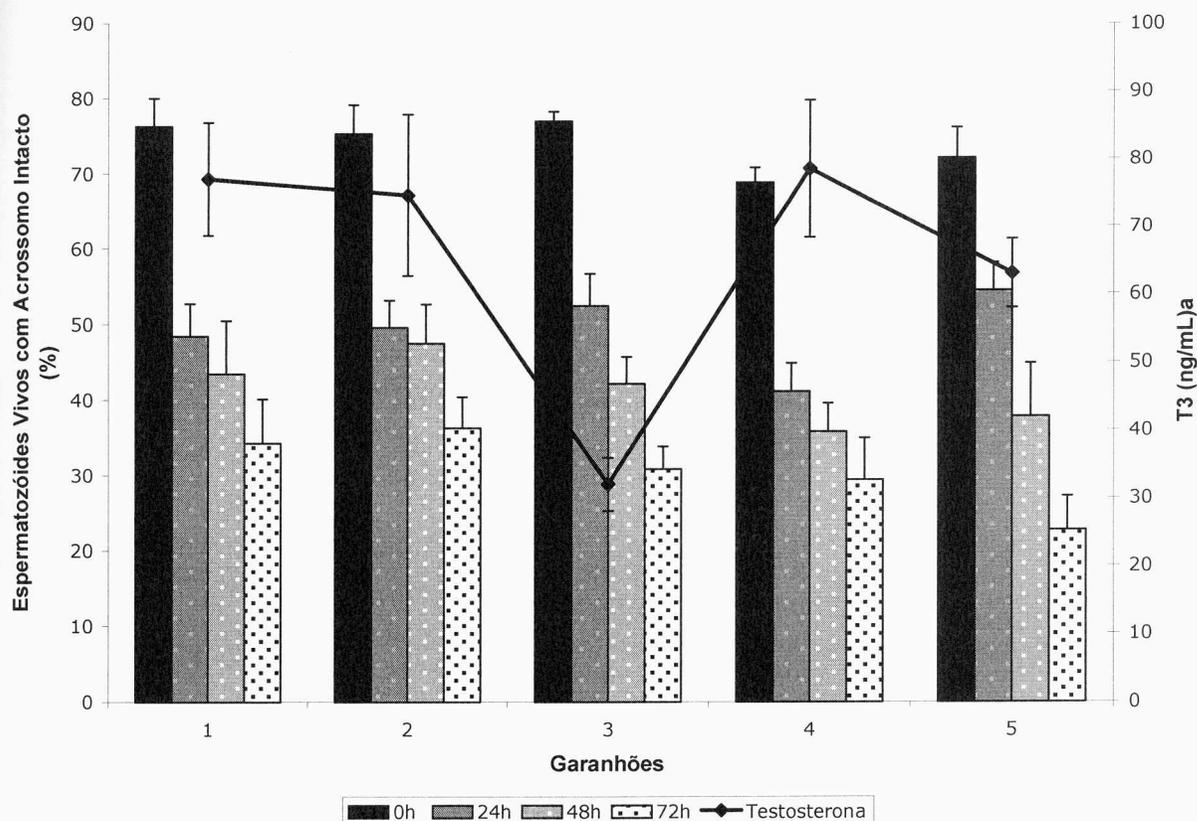


Gráfico 15 – VAI (médias  $\pm$  EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de  $T_3$  (médias  $\pm$  EPM) em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

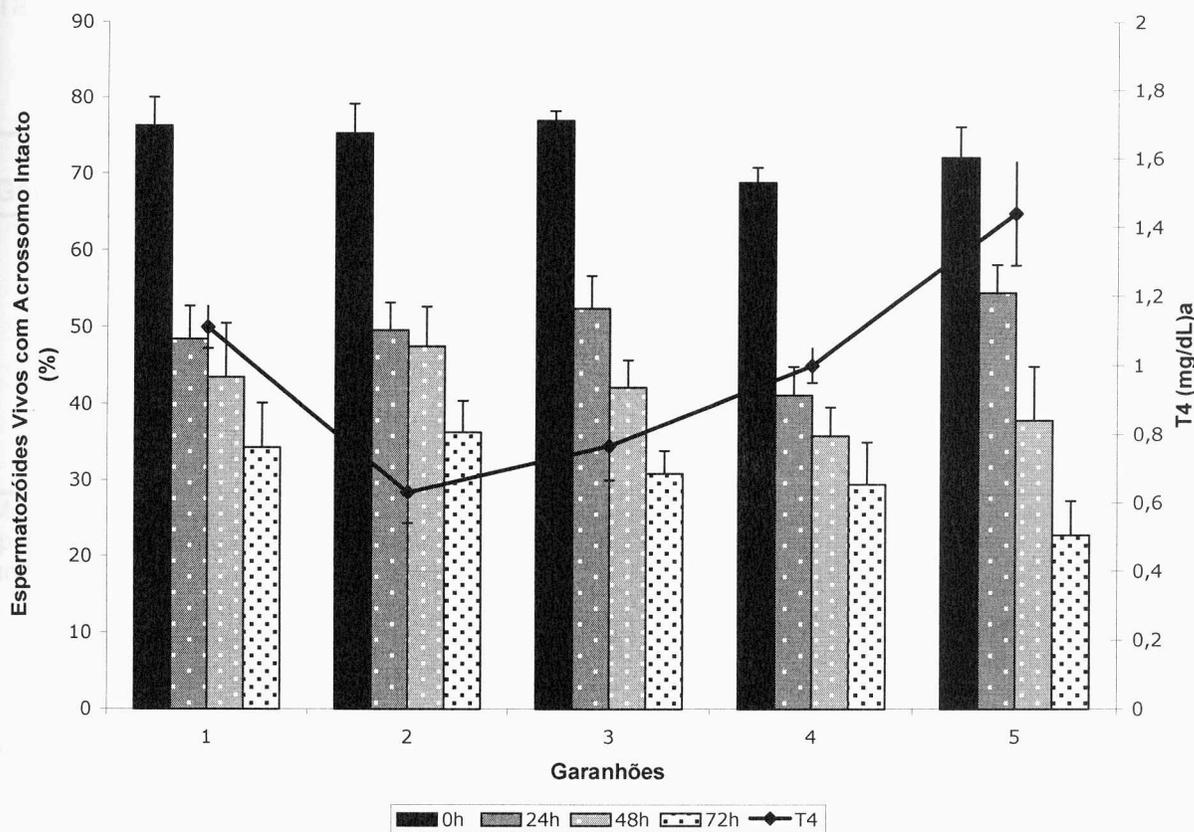


Gráfico 16 – VAI (médias ± EPM) no tempo 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento e concentração plasmática de T<sub>4</sub> (médias ± EPM) em ganhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Os valores (médias ± EPM) correspondentes aos totais de espermatozoides vivos com acrossomo intacto (VAI), observados em cada um dos ganhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 14.

Tabela 14 – Total de espermatozóides vivos com acrossomo intacto (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24, 48 e 72hs em gananhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Espermatozóides Vivos Com Acrossomo Intacto (%)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	76,33 $\pm$ 3,72 <sup>a,A</sup>	48,43 $\pm$ 4,28 <sup>a,B</sup>	43,50 $\pm$ 6,98 <sup>a,B</sup>	34,28 $\pm$ 5,85 <sup>a,a,C</sup>
2	75,33 $\pm$ 3,85 <sup>a,A</sup>	49,57 $\pm$ 3,54 <sup>a,B</sup>	47,50 $\pm$ 5,13 <sup>a,B</sup>	36,28 $\pm$ 4,13 <sup>a,C</sup>
3	77,00 $\pm$ 1,29 <sup>a,A</sup>	52,42 $\pm$ 4,23 <sup>a,B</sup>	42,16 $\pm$ 3,57 <sup>a,C</sup>	30,85 $\pm$ 2,97 <sup>a,D</sup>
4	68,83 $\pm$ 2,00 <sup>b,A</sup>	41,14 $\pm$ 3,72 <sup>b,B</sup>	35,83 $\pm$ 3,75 <sup>b,C</sup>	29,43 $\pm$ 5,55 <sup>b,D</sup>
5	72,16 $\pm$ 4,01 <sup>a,A</sup>	54,43 $\pm$ 3,71 <sup>a,B</sup>	37,83 $\pm$ 7,04 <sup>b,C</sup>	22,71 $\pm$ 4,50 <sup>b,D</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ).

Os valores (médias  $\pm$  EPM) correspondentes aos totais de espermatozóides vivos com acrossomo lesado (VAL), observados em cada um dos gananhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 hs de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 15.

Tabela 15 – Total de espermatozóides vivos com acrossomo lesado (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24, 48 e 72hs em gananhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Espermatozóides Vivos Com Acrossomo Lesado (%)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	1,83 $\pm$ 0,83 <sup>a,A</sup>	10,28 $\pm$ 2,35 <sup>a,B</sup>	7,33 $\pm$ 2,59 <sup>a,C</sup>	8,00 $\pm$ 1,39 <sup>a,C</sup>
2	4,16 $\pm$ 0,91 <sup>b,A</sup>	5,71 $\pm$ 2,07 <sup>b,B</sup>	6,50 $\pm$ 2,82 <sup>b,C</sup>	3,85 $\pm$ 1,30 <sup>b,A</sup>
3	1,33 $\pm$ 0,33 <sup>a,A</sup>	10,57 $\pm$ 2,71 <sup>a,B</sup>	7,16 $\pm$ 2,12 <sup>a,C</sup>	12,85 $\pm$ 2,65 <sup>c,D</sup>
4	2,16 $\pm$ 0,65 <sup>c,A</sup>	5,85 $\pm$ 2,05 <sup>b,B</sup>	6,50 $\pm$ 1,38 <sup>b,C</sup>	5,85 $\pm$ 1,40 <sup>d,B</sup>
5	6,00 $\pm$ 2,04 <sup>d,A</sup>	11,28 $\pm$ 2,48 <sup>a,B</sup>	11,83 $\pm$ 3,80 <sup>c,B</sup>	12,00 $\pm$ 2,39 <sup>c,B</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ).

Os valores (médias  $\pm$  EPM) correspondentes aos totais de espermatozóides mortos com acrossomo intacto (MAI), observados em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 16.

Tabela 16 – Total de espermatozóides mortos com acrossomo intacto (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24, 48 e 72hs em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Garanhão	Espermatozóides Mortos Com Acrossomo Intacto (%)			
	0h	24hs	48hs	72hs
1	18,16 $\pm$ 2,89 <sup>a,A</sup>	39,28 $\pm$ 3,32 <sup>a,B</sup>	45,66 $\pm$ 6,29 <sup>a,C</sup>	53,28 $\pm$ 7,15 <sup>a,D</sup>
2	18,50 $\pm$ 3,06 <sup>a,A</sup>	42,43 $\pm$ 2,99 <sup>a,B</sup>	43,33 $\pm$ 4,09 <sup>a,B</sup>	56,85 $\pm$ 4,29 <sup>a,C</sup>
3	20,16 $\pm$ 0,91 <sup>b,A</sup>	35,00 $\pm$ 4,17 <sup>b,B</sup>	48,50 $\pm$ 3,65 <sup>a,C</sup>	52,14 $\pm$ 3,52 <sup>a,D</sup>
4	27,50 $\pm$ 1,31 <sup>c,A</sup>	51,57 $\pm$ 2,25 <sup>c,B</sup>	55,50 $\pm$ 3,40 <sup>b,C</sup>	61,28 $\pm$ 4,24 <sup>b,D</sup>
5	19,66 $\pm$ 2,69 <sup>a,A</sup>	32,42 $\pm$ 5,00 <sup>b,B</sup>	45,83 $\pm$ 9,53 <sup>a,C</sup>	57,43 $\pm$ 6,65 <sup>a,D</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Os valores (médias  $\pm$  EPM) correspondentes aos totais de espermatozóides mortos com acrossomo lesado (MAL), observados em cada um dos garanhões avaliados, imediatamente após a colheita de sêmen e transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 5° C, encontram-se expressos na tabela 17.

Tabela 17 – Total de espermatozoides mortos com acrossomo lesado (médias  $\pm$  EPM) nos tempos 0h e transcorridas 24, 48 e 72 hs em garanhões submetidos a colheitas de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Espermatozoides Mortos Com Acrossomo Lesado (%)				
Garanhão	0h	24hs	48hs	72hs
1	3,66 $\pm$ 1,45 <sup>a,A</sup>	2,43 $\pm$ 0,57 <sup>a,B</sup>	3,50 $\pm$ 1,62 <sup>a,A</sup>	4,42 $\pm$ 1,82 <sup>a,C</sup>
2	2,00 $\pm$ 0,57 <sup>b, A</sup>	2,28 $\pm$ 0,64 <sup>a,A</sup>	2,66 $\pm$ 1,17 <sup>b, B</sup>	3,00 $\pm$ 1,04 <sup>b, C</sup>
3	1,50 $\pm$ 0,56 <sup>c, A</sup>	2,00 $\pm$ 0,43 <sup>a,B</sup>	2,16 $\pm$ 0,54 <sup>b, A</sup>	4,14 $\pm$ 2,17 <sup>a,C</sup>
4	1,50 $\pm$ 0,67 <sup>c, A</sup>	1,43 $\pm$ 0,48 <sup>b, A</sup>	2,16 $\pm$ 0,65 <sup>b, B</sup>	4,00 $\pm$ 1,70 <sup>a,C</sup>
5	2,16 $\pm$ 0,54 <sup>b, A</sup>	1,85 $\pm$ 0,50 <sup>b, B</sup>	4,50 $\pm$ 2,14 <sup>c, C</sup>	7,85 $\pm$ 3,34 <sup>c, D</sup>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, para cada coluna, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ); médias seguidas de mesma letra maiúscula, para cada linha, não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ).

## 5.6 Análises de Covariâncias e Correlações

As correlações existentes entre as concentrações plasmáticas de hormônios sexuais e tireoideanos observadas em cada um dos garanhões ao longo do período experimental, encontram-se apresentadas na tabela 18.

Tabela 18 – Correlações entre concentrações plasmáticas de hormônios sexuais e tireoideanos de garanhões submetidos à colheita de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

Parâmetros	Coefficiente de Correlação ( r )	Valor de p
Estradiol, Testosterona	0,35	< 0,0001
Estradiol, T4	-0,58	< 0,0001
T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub>	0,26	0,004

As correlações existentes entre padrões seminais físicos e as concentrações plasmáticas de hormônios sexuais e tireoideanos observadas em cada um dos garanhões avaliados imediatamente após a colheita de sêmen, encontram-se apresentadas na tabela 19.

Tabela 19 – Correlações entre características seminais físicas e concentrações plasmáticas de hormônios sexuais e tireoideanos de garanhões submetidos à colheita de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

<b>Parâmetros</b>	<b>Coefficiente de Correlação ( r )</b>	<b>Valor de p</b>
Volume, Testosterona	0,38	0,036
Concentração, Testosterona	-0,45	0,011

As correlações existentes entre as formas patológicas e concentrações hormonais de estradiol, testosterona, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> observadas em cada um dos garanhões avaliados, encontram-se apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20 – Correlações entre formas patológicas e concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, de garanhões submetidos à colheita de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

<b>Parâmetros</b>	<b>Coefficiente de Correlação ( r )</b>	<b>Valor de p</b>
Def. Menores Cab., Estradiol	-0,28	0,002
Def. Menores Cab., T <sub>4</sub>	0,20	0,024
Def. Menores Cauda, T <sub>3</sub>	0,22	0,015
Def. Peça Interm., Testosterona	0,24	0,009
Def. Peça Interm., Estradiol	-0,19	0,039
Total de Defeitos, Testosterona	0,27	0,003
Total de Defeitos, Estradiol	-0,19	0,033
Total de Defeitos, T <sub>4</sub>	0,23	0,013

As correlações existentes entre motilidade progressiva e vigor, e os parâmetros de integridade de membrana observadas em cada um dos garanhões avaliados encontram-se apresentadas na tabela 21.

Tabela 21 – Correlações entre motilidade progressiva e vigor, e características de integridade de membrana de garanhões submetidos à colheita de sêmen e sangue – Pirassununga – jul 2003

<b>Parâmetros</b>	<b>Coefficiente de Correlação ( r )</b>	<b>Valor de p</b>
Mot. Prog., VAI	0,70	< 0,0001
Mot. Prog., MAI	-0,70	< 0,0001
Vigor, VAI	0,72	< 0,0001
Vigor, MAI	-0,72	< 0,0001

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados observados serão discutidos, à luz da literatura consultada, segmentados em tópicos a seguir.

### 6.1 Idade e Peso Corporal

A diferença de idade observada entre os garanhões mais jovens (05 anos) e os mais velhos (14 anos), aparentemente não interferiu diretamente nos aspectos de dosagens hormonais, bem como características seminais; haja vista que os garanhões 3 e 5, que apresentaram as menores médias plasmáticas para estradiol e testosterona respectivamente, são animais apresentando idades, também respectivamente, de 05 e 14 anos. Stewart e Roser (1998), tendo estudado garanhões entre 02 e 25 anos de idade, reportam não haver efeito idade para garanhões adultos a partir de 04 anos, para concentrações plasmáticas de estrógenos e testosterona, assim como fertilidade. Por outro lado, Dowsett e Knott (1995), analisando o sêmen de 168 garanhões com idades variando entre 02 a 26 anos de idade, reportam significativa queda na qualidade espermática de garanhões com idades inferiores a 03 e superiores a 11 anos, sendo este efeito tanto maior quanto mais próximo do limite estudado (26 anos). Através de dados retrospectivos da performance reprodutiva de 27 garanhões islandeses em idade adulta reprodutiva, Davies Morel e Gunnarsson (2000) não encontraram efeitos deletérios de idade sobre a fertilidade destes animais. Analogamente Inoue et al. (1993) reportam concentrações plasmáticas de hormônios reprodutivos similares em garanhões férteis a partir de 04 anos de idade. Chen e Riley (1981), trabalhando com

hormônios tireoideanos, não reportam diferenças estatísticas significativas entre concentrações plasmáticas de tais hormônios em garanhões adultos e sexualmente maduros; estes dados são compatíveis com os achados de Breuhaus (2002), que trabalhou indistintamente com dosagens de hormônios reprodutivos e características seminais em animais considerados sexualmente maduros com idades entre 02 e 25 anos de idade.

Malinowski et al. (1996) em um primeiro experimento, colheram amostras de sangue de potras e éguas "trotadoras" (Standardbreds) com idades variando entre 0 a 14 dias, 1 a 9 meses, 5 a 8 anos e 16 a 22 anos; em um segundo experimento, mediram as mesmas variáveis em 08 raças diferentes, de diferentes tamanhos corpóreos, ou seja, de cavalos miniatura a Friesians. O  $T_3$  plasmático pouca variação apresentou entre os 09 meses (0,7 ng/mL) e os 16-22 anos de idade (0,5 ng/mL); similarmente, o  $T_4$  declinou de 233,0 ng/mL ao nascimento, para 49,0 ng/mL aos 14 dias de idade e variou de 9,0 a 35,0 ng/mL entre todos os outros grupos de idades maiores. Neste estudo não se observaram diferenças quanto ao tamanho corporal.

Embora vários autores discorram que diversas são as variáveis que interferem diretamente nas características seminais físicas e morfológicas (GÖETZE, 1949), estes se apresentam com menor amplitude de variação entre animais adultos sexualmente maduros; Squires, Pickett e Amann (1979) demonstraram que porcentagens maiores de motilidade espermática são encontradas em garanhões entre 4 e 6 anos (63,1%), enquanto que animais mais jovens (2 a 3 anos) e animais mais velhos (9 a 16 anos) demonstram menores porcentagens de motilidade total (55,0 e 59,9%, respectivamente).

Em nosso estudo não houve diferenças estatísticas significativas que pudessem denotar qualquer tendência entre os animais no tocante às características seminais físicas e morfológicas. Apenas quanto ao volume total de ejaculado observamos variações significativas para o animal 1, de 14 anos (maior volume com 80,41 mL) e o animal 3, também de 14 anos, com o menor valor, referenciado em 23,95 mL. Para os demais parâmetros, como concentrações espermáticas, totais de espermatozóides no ejaculado, vigor e motilidade total não se observaram variações significativas. Quanto à patologia espermática, embora pequenas diferenças estatísticas tenham sido observadas entre os indivíduos, não pudemos constatar tendências de idade ou raça; apenas o animal 4, de 14 anos de idade, apresentou nível de defeitos de peça intermediária e conseqüentemente de total de defeitos, acima da média dos demais animais, porém em limites "aceitáveis" conforme descrito na literatura (JASKO; LEIN; FOOTE, 1990; MIES FILHO, 1987;).

Também parece não ter havido significativas diferenças entre os cinco animais quanto ao item biótipo/peso corporal, devendo ser considerado neste aspecto o fator raça, que determina o biótipo e conseqüentemente o peso corporal. Diferenças significativas entre as dosagens hormonais de estradiol, testosterona,  $T_3$  e  $T_4$  foram observadas entre indivíduos de mesma raça, e não de raças diferentes. Dowsett e Knott (1995) observaram variações significativas na qualidade espermática em garanhões de 09 raças distintas, mas entre diversos outros autores, considerando-se animais de biótipo similar, efeitos de idade, sazonalidade e manejo parecem mostrar-se mais preponderantes neste tipo de avaliação (BRAUN et al., 1996; CLAY et al., 1989; CLAY; CLAY, 1992; DUSEK, 1980; PICKETT; FAULKNER; SUTHERLAND; 1970; PICKETT; FAULKNER; VOSS, 1975; THOMPSON et al., 1977; THOMPSON et al., 1978).

## 6.2 Testosterona e Estradiol

Diversos autores mensuraram as concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol de garanhões em diferentes estações reprodutivas e circunstâncias (fertilidade, idade, raças). Como exemplo, Ganjam e Kenney (1975) compararam as concentrações séricas de andrógenos totais, testosterona e estrógenos totais em garanhões normais e criptorquídicos, demonstrando que os níveis de andrógenos totais se mostraram significativamente mais baixos em animais bilateralmente criptorquídicos que nos demais grupos. Inoue et al. (1993) também determinaram as concentrações plasmáticas de testosterona e estrógenos em garanhões normais e inférteis (azoospermicos), com resultados significativamente diferentes entre os grupos; animais azoospermicos demonstraram testosterona sérica significativamente mais baixa que garanhões normais.

Em nosso estudo, obtivemos concentrações plasmáticas de testosterona variando significativamente entre os animais, ou seja, 32,00 ng/mL (menor valor) para o animal 03 e 78,53 ng/mL (maior valor) para o animal 04. O mesmo comportamento pôde ser observado para as concentrações de estradiol, em que o menor valor reportado ao animal 05 foi de 88,72 pg/mL, significativamente mais baixo que o maior valor obtido para o animal 02, de 261,53 pg/mL. Entretanto, conforme vimos nos trabalhos acima mencionados, tais resultados encontram-se dentro da amplitude de variação reportada pela literatura internacional. Corroboram esta informação os dados de Hoffmann e Landeck (1999), que encontraram, para testosterona, concentração plasmática média de  $570,6 \pm 1,43$  pg/mL.

Uma vez que o presente estudo foi realizado em período de fotoperíodo negativo para o hemisfério sul, portanto fora da estação reprodutiva, uma das preocupações centrava-se justamente em grandes variações nas concentrações plasmáticas em função deste fator. Outra preocupação deu-se em torno de variações nas concentrações plasmáticas hormonais em função de idade e maturidade sexual; entretanto, diversos trabalhos documentam adequadamente este tema.

Burns et al. (1982) descreveram que garanhões expostos a períodos crescentes de fotoperíodo denotam, de fato, significativo aumento nas concentrações séricas de testosterona, mas não de estradiol  $17\beta$  e de estrógenos totais. Braun et al. (1996) também descreveram concentrações séricas de testosterona mais baixas no período de fora da estação reprodutiva, assim como Clay et al. (1988). Já Stewart e Roser (1998), analisando aspectos relacionados à idade em machos entre 02 meses e 25 anos de idade, não encontraram variações nas concentrações de testosterona em função da estação reprodutiva; entretanto, à medida que a idade dos animais aumentava, sua concentração plasmática também se elevava até a maturação testicular. A partir de então nenhum efeito de idade pôde ser observado nos garanhões adultos, assim como nenhuma diferença também pôde ser observada entre animais férteis e subférteis quanto à concentração plasmática de testosterona.

Os resultados de nossos estudos mostram-se compatíveis com os dados de literatura, uma vez que as maiores concentrações observadas nos animais 01, 02, 04 e 05 (77,01, 74,63, 78,53 e 63,00 ng/mL, respectivamente), sem diferença estatística entre si ( $p < 0,05$ ), encontram-se dentro dos padrões de normalidade para a estação reprodutiva descritos pelos autores consultados. Além do mais, estes resultados se referem a garanhões com idades variando de 05 a 14 anos, indistintamente, reforçando

os estudos de Clay et al. (1988), que não encontraram diferenças entre concentrações de testosterona para animais adultos que já tenham alcançado a maturidade sexual. Amann (1993) cita variações, consideradas normais, de até 25% nas concentrações de testosterona obtidas entre diversos garanhões durante as estações reprodutiva e não reprodutiva, com valores variando entre 27 ng/mL (estação não reprodutiva) e 36 ng/mL (estação reprodutiva).

Conforme já anteriormente citado, as concentrações de estradiol por nós obtidas variaram entre 88,72 pg/mL (menor valor) para o animal 05 e 261,53 pg/mL (maior valor), para o animal 02. Neste aspecto também vale ressaltar que variações foram observadas, indistintamente para animais com 05 ou 14 anos. Roser (1994), reportou concentrações de estradiol de 71,9 pg/mL e 44,6 pg/mL para garanhões normais e inférteis respectivamente, enquanto que Lang (1998) descreve concentrações variando entre 41,2 a 118,0 pg/mL na na estação reprodutiva e 52,7 a 107,7 pg/mL na estação não reprodutiva para garanhões com histórico de fertilidade normal. Wallach, Pickett e Nett (1983), uma vez tendo encontrado concentrações de estradiol significativamente mais baixas em garanhões impotentes quando comparadas com concentrações de garanhões normais, inferiram que impotência pode estar baseada em baixas concentrações de estradiol e LH; releve-se o fato de que, mesmo para o menor valor encontrado para o animal 05, ainda assim tal valor encontra-se dentro dos padrões de normalidade citados pela literatura. Braun et al. (1996) reportam concentrações mensais médias, sem alterações de normalidade, de estradiol no sangue em torno de 27,4 pg/mL.

Avaliando a função gonadal de garanhões, Hoffman e Landeck (1999), mensuraram as concentrações séricas e seminais dos esteróides testiculares, assim

como sua distribuição no ejaculado. O estradiol, cuja concentração plasmática observada foi de  $31,1 \pm 1,16$  pg/mL, demonstrou alta correlação com a testosterona plasmática. Infere-se que dois tipos celulares distintos talvez estejam envolvidos na produção de estrógenos e testosterona, uma vez que os estudos de Lang (1998) demonstraram pequena correlação entre testosterona e estradiol, assim como Thompson et al. (1979), Thompson, Pickett e Nett (1978) e Eisenhauer et al. (1994). Nossos estudos também demonstram fraca correlação ( $r=0,35$ ) entre as concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol. Provavelmente os estrógenos atuam através de mecanismos de "feed-back" de forma concentração-dependente, para regular a via esteroidogênica. Estudos recentes têm demonstrado que as células germinativas, bem como células de Leydig e Sertoli, expressam receptores estrogênicos, sugerindo que estrógenos são necessários para a maturação funcional dos espermatozoides e fertilidade, assim como para o desenvolvimento e modulação da esteroidogênese das células de Leydig (ROSER, 2001).

### 6.3 Hormônios Tiroideanos

Assim como reportado por Nachreiner e Hyland (1993), trabalhamos com unidades de medida distintas para a expressão das concentrações plasmáticas de  $T_3$  e  $T_4$ ; sendo assim, para  $T_3$  utilizamos ng/mL e  $T_4$  mg/dL. Desta forma, para comparação com dados internacionais da literatura eventualmente algumas conversões foram necessárias para validação dos resultados.

Obtivemos, para  $T_3$ , valor mínimo de 38,0 ng/mL para o animal 03, sendo esta a única concentração plasmática significativamente diferente (a menor) dos demais

garanhões; o maior valor encontrado para este hormônio foi de 53,89 ng/mL (animal 05). Quanto ao  $T_4$ , as variações mais amplas foram encontradas, sendo que o menor valor foi observado no animal 02 (0,64 mg/mL), sem diferença significativa quando comparado ao animal 03 (0,77 mg/mL); os animais 01 e 04 não apresentaram valores estatisticamente diferentes entre si (1,11 e 1,00 mg/mL, respectivamente), tendo sido o maior valor o observado no animal 05 (1,44 mg/mL), estatisticamente diferente de todos os demais.

As concentrações plasmáticas dos hormônios tireoideanos encontradas são compatíveis com os valores de referência publicados em diversos trabalhos da literatura internacional. Após a devida conversão de unidades de medida, Nachreiner e Hyland (1993) reportam, em éguas, 0,6 a 3,2 mg de  $T_4$ /dL e 40,0 a 150,0 ng de  $T_3$ /dL. Chen e Riley (1981) demonstraram que cavalos adultos apresentam concentrações séricas médias de  $T_4$  e  $T_3$  em 1,76 mg/dL e 98,69 ng/dL, respectivamente); estes autores reportam, em garanhões, níveis de  $T_3$  discretamente superiores à média obtida entre machos castrados e fêmeas.

Anderson, Nixon e Akasha (1988) mensuraram  $T_4$  e  $T_3$  totais e livres na espécie eqüina; as concentrações séricas obtidos destes hormônios foram de 15,00 ng/mL e 677,00 pg/mL e 5,90 pg/mL e 3,22 pg/mL, respectivamente. Sojka, Johnson e Bottoms (1993) obtiveram valores séricos basais encontrados para os hormônios tireoideanos variando entre: 0,21 a 0,80 ng de  $T_3$ /mL, 6,20 a 25,10 ng de  $T_4$ /mL e 0,07 a 0,47 ng de  $T_4$  livre/dL. Lothrop e Nolan (1986) encontraram valores basais de  $T_4$  e  $T_3$  de 24,40 ng/mL e 0,44 ng/mL, respectivamente, similares aos encontrados por Sojka, Johnson e Bottoms (1993). As concentrações séricas de  $T_4$  e  $T_3$  publicados por Duckett, Manning e Weston (1989) também corroboram os valores por nós encontrados, assim como dos

autores anteriormente citados; estes autores encontraram picos médios de  $T_3$  em  $54,06 \pm 14,02$  ng/dL às 08:00 da manhã, significativamente menores que à meia-noite, cuja média foi de  $38,71 \pm 10,81$  ng/dL. A concentração média máxima de  $T_4$  foi obtida às 16:00 horas ao nível de  $2,43 \pm 0,81$  •g/dL e a mínima às 04:00h em  $1,79 \pm 0,63$  •g/dL.

Nossos animais, com idades variando entre 05 e 14 anos, apresentaram valores plasmáticos de hormônios tireoideanos compatíveis com os dados de Malinowski et al. (1996), que conduziram estudo com a finalidade de se determinar possíveis variações de concentração plasmática de  $T_3$ ,  $T_4$  em função do crescimento, maturidade sexual e idade. Neste experimento, pouca variação foi observada entre os animais do grupo com 09 meses de idade média ( $0,7$  ng de  $T_3$ /mL) e os animais com idades entre 16 e 22 anos ( $0,5$  ng de  $T_3$ /mL); similarmente,  $T_4$  declinou de  $233,0$  ng/mL ao nascimento, para  $49,0$  ng/mL aos 14 dias de idade e variou de  $9,0$  a  $35,0$  ng/mL entre todos os outros grupos de idades maiores. Malinowski et al. (1996) não observaram diferenças significativas quanto ao tamanho corporal entre animais de diferentes raças.

Correlação positiva foi encontrada entre as concentrações de  $T_3$  e  $T_4$  ( $r= 0,26$ ), assim como correlação negativa entre estradiol e  $T_4$  ( $r=-0,58$ ). A literatura descreve a ocorrência de correlação positiva entre  $T_3$  e  $T_4$ , uma vez que a tiroxina é o produto da iodetação do aminoácido tirosina nas células foliculares; o iodo se fixa à tirosina iodetando-a a monoiodotirosina e posteriormente a diiodotirosina. Entretanto, uma molécula de diiodotirosina pode se acoplar diretamente à monoiodotirosina, formando a própria triiodotironina, que representa aproximadamente  $1/5$  de toda a quantidade hormonal armazenada nas células foliculares (GUYTON; HALL, 1997).

Poucos estudos envolvendo correlações entre níveis de hormônios tireoideanos e hormônios sexuais, bem como a função reprodutiva na espécie eqüina, são

encontrados na literatura. Tal afirmação é particularmente verdadeira quando nos referimos ao garanhão, uma vez que alguns estudos foram realizados no sentido de se avaliar efeitos reprodutivos das fêmeas e suas interrelações com hormônios tireoideanos.

Algumas inferências podem ser estabelecidas para a correlação negativa encontrada entre estradiol e  $T_4$  de nosso trabalho. Jackson (1982) reportou algumas interações entre hormônios tireoideanos e a função reprodutiva, uma vez que o próprio TRH pode ser observado em tecidos eminentemente reprodutivos como a próstata, vesículas seminais, epidídimo e até mesmo na placenta humana. Por outro lado, tratando-se de hormônio hipofisário, o TRH também estimula em seu sítio de ação a liberação de prolactina conjuntamente ao TSH. Receptores para prolactina estão presentes em grande quantidade no testículo de mamíferos, particularmente nas células de Leydig; desta forma, a estimulação deste hormônio junto aos seus sítios de ligação exerce significativo efeito de "feed-back" negativo sobre a produção e secreção de hormônios sexuais, pela supressão da secreção de gonadotropinas. Em humanos hiperprolactinêmicos reporta-se inclusive hipofunção testicular (HUHTANIEMI, 1993).

Neste sentido, vale ressaltar que as células de Leydig de ratos possuem, além de receptores para prolactina, também receptores para Hormônio do Crescimento (GH), Hormônio Adrenocorticotrópico (ACTH) e TSH em grande quantidade, sendo ambas prolactina e GH (em combinação e ação sinérgica) capazes de aumentar o número de sítios de ligação de LH nestas próprias células. Em contraste, a possibilidade de regulação dos receptores para LH nas células de Leydig pelo TSH e ACTH ainda não foi claramente estabelecida. Homens com aumento patológico de ACTH apresentam níveis de testosterona severamente diminuídos sem a correspondente diminuição da

secreção de LH. Entretanto, ainda não se sabe exatamente de que forma o ACTH e o TSH interferem diretamente sobre a produção de andrógenos pela célula de Leydig (WEINBAUER; NIESCHLAG, 1993). Uma vez que os hormônios tireoideanos regulam o metabolismo lipídico, aumentando e/ou diminuindo a produção de colesterol, provavelmente, em circunstâncias de maior secreção tireotrópica e, conseqüentemente prolactinêmica, pode haver interferência na ativação do sistema adenil ciclase (ativação da proteína kinase e síntese de RNA), resultando em menor produção de estradiol/testosterona a partir de colesterol e pregnenolona (PINEDA, 2003).

De fato, alguns autores descrevem que indivíduos humanos apresentando elevação significativa em suas concentrações séricas normais de hormônios tireoideanos podem apresentar significativa redução em sua testosterona livre e estradiol, levando a quadros de impotência sexual e até mesmo ginecomastia, além de perturbações ovulatórias em mulheres (JOHNSON; GRACE; PROBST, 1987). Em medicina veterinária, baixos níveis de  $T_3$  e  $T_4$  têm sido relacionados a alterações na ciclicidade estral de fêmeas caninas, como prolongamento do anestro reprodutivo e redução do período de estro; menores taxas de concepção, maior ocorrência de abortamentos precoces e produção espontânea de leite também são observados em cadelas. Neste último caso, especula-se que ocorra por aumento da produção de prolactina, bloqueando-se, conseqüentemente, a secreção e ação das gonadotrofinas (CHESTER, 1987).

#### 6.4 Características Seminais

A motilidade espermática já de há muito tempo é considerada parâmetro de extrema relevância na avaliação da fertilidade de garanhões (PAPA, 1987). Em nosso experimento, não encontramos variações individuais entre as motilidades totais no momento 0h, isto é, imediatamente após cada colheita seminal, sendo que a menor motilidade total média apresentada foi de 73,33% e a maior de 78,33%. Estes valores são inferiores aos encontrados por Aehnelt (1950) em animais PSI (83%), porém superiores aos achados de Werhahn (1978) em raças de "sangue quente" (61%). Levando-se em consideração o fato de que as colheitas foram realizadas no inverno (fotoperíodo decrescente), os valores médios de motilidade total por nós encontrados mostraram-se perfeitamente de acordo com os resultados demonstrados por Pickett et al. (1975), que não encontraram diferenças significativas entre os ejaculados eqüinos (73%) no que se refere às estações do ano. Apesar dos nossos garanhões pertencerem a faixas etárias heterogêneas (5 a 14 anos), não observamos variações acentuadas como as descritas por Squires, Pickett e Amann (1979) em diferentes faixas etárias.

Em bovinos, o vigor espermático é um dos principais parâmetros para avaliação da qualidade seminal, indicando objetivamente a velocidade e força com que os espermatozoides se movimentam (MIES FILHO, 1987). De acordo com Papa (1987), na espécie eqüina o vigor espermático não tem sido usado pelos pesquisadores como parâmetro de avaliação da fertilidade de garanhões; avaliado segundo uma escala padronizada variando de zero a um, o nível um representa vigor mínimo e o nível cinco o máximo vigor desenvolvido pelos espermatozoides em microscopia óptica de contraste de fase. Os resultados relativos a vigor espermático de nosso experimento

denotaram padrão de comportamento bastante absolutamente análogo a motilidade total observada imediatamente após cada colheita, não se demonstrando variações entre os indivíduos; o menor valor de vigor médio encontrado foi de 3 e o maior de 3,91. Na literatura consultada, nenhum autor teceu comentários sobre este parâmetro, fato que nos impediu de comparar nossos resultados assim como também observado por Papa (1987). Este autor, entretanto, cita que ao longo de suas pesquisas, o vigor espermático tem se mostrado tão importante quanto a motilidade para a avaliação da capacidade reprodutiva do garanhão; em sua experiência prática, ejaculados de garanhões de diferentes raças com alta motilidade percentual, mas baixo vigor (menor que 2), resultam em menores índices de congelabilidade quando comparados com ejaculados de igual motilidade e vigor superiores. A média relativa ao vigor espermático do ejaculado dos garanhões de nosso experimento em 3,47 permitiu-nos considerar este parâmetro como mais um fator positivo na avaliação preliminar da comprovação da fertilidade destes animais.

A concentração espermática média por mL obtida em nosso experimento foi de  $201,53 \times 10^6$  espermatozoides, não tendo havido diferenças estatísticas significativas entre os indivíduos, exceto para o garanhão 3, que apresentou a maior concentração espermática, ou seja,  $334,58 \times 10^6$  sptz/mL; o menor valor encontrado foi de  $148,12 \times 10^6$  sptz/mL. Estes resultados são compatíveis com os dados de todos os autores consultados, dentre eles Aehnelt (1950), Bielanski (1950), Cornwell et al. (1972), Dowsett (1979), Pickett et al. (1976) e Werhahn (1978).

O número total de espermatozoides no ejaculado normalmente apresenta grandes variações e, segundo Squires, Pickett e Amann (1979), a freqüência de ejaculações e a época do ano em que o sêmen é colhido, são os dois principais fatores

de maior relevância nestas variações. Os resultados do presente estudo também não demonstraram variações significativas entre os animais, com menor valor de  $7,99 \times 10^9$  sptzs e maior de  $10,26 \times 10^9$  sptzs, com média de  $8,92 \times 10^9$  sptzs presentes no ejaculado destes animais. Uma vez que o número total de espermatozóides de um ejaculado é a somatória das células espermáticas e está diretamente relacionada com a concentração por mL, os resultados por nós obtidos também se mostram perfeitamente compatíveis aos dados da literatura consultada, e em alguns casos até superiores aos de diversos autores, como Götze (1949), Swierstra et al. (1975) e Amann et al. (1979).

As porcentagens médias de defeitos observadas no presente trabalho foram relativamente baixas quando comparadas com os valores considerados "aceitáveis" para se garantir comprovação de fertilidade em garanhões (MIES FILHO, 1987). A quantidade de defeitos maiores e menores foi muito variável entre os ejaculados de um mesmo animal, bem como entre diferentes garanhões, sendo esses resultados compatíveis com os dados de Bielanski (1975). Dott (1975) cita inúmeros fatores como responsáveis pelo aumento das formas patológicas no ejaculado, dentre eles problemas clínicos reprodutivos e excessiva solicitação de colheitas ou coberturas, fatos ambos que não ocorreram ao longo do experimento. Apesar do uso de animais de diferentes raças e idades, nossos resultados médios de patologias espermáticas foram inferiores aos obtidos por Werhahn (1978) em condições semelhantes. Pelos resultados médios de patologias espermáticas no presente trabalho, podemos afirmar que as porcentagens enquadram-se perfeitamente dentro das variações recomendadas por Bielanski (1975), Bielanski et al. (1982) e Mies Filho (1987), e, frente a essas observações, que os garanhões confirmaram seus potenciais de fertilidade.

## 6.5 Correlações entre Concentrações Plasmáticas Hormonais e Características Seminais

Correlação positiva entre volume seminal e testosterona ( $r=0,38$ ) e negativa entre concentração espermática e testosterona ( $r=-0,45$ ) foram observadas. Tais resultados justificam-se pelo fato de que as glândulas acessórias (próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais) são as maiores responsáveis pelo volume do ejaculado, e que seu desenvolvimento normal e função são controlados pela testosterona (PINEDA, 2003).

Embora a testosterona seja o elemento essencial à manutenção e restabelecimento da função espermatogênica no testículo de animais adultos, e isoladamente capaz de manter qualitativamente a espermatogênese completa, o FSH parece mostrar mais influência sobre a quantidade de espermatozóides produzidos do que a própria testosterona (GANJAM; KENNEY, 1975; INOUE et al., 1993; IRVINE; ALEXANDER, 1988). O testículo equino, diferentemente de em outras espécies, produz grandes quantidades de estrógenos, que apresentam preponderante papel no mecanismo de produção espermática ao lado do FSH (HOFFMAN; LANDECK, 1999; NADEN; AMANN; SQUIRES, 1990). Tais razões auxiliam a explicar, em parte, a correlação negativa encontrada entre testosterona e concentração espermática.

Nenhuma correlação entre motilidade total e motilidade progressiva, bem como vigor, foi observada com qualquer dos hormônios dosados, sejam eles sexuais ou tireoideanos, tanto no momento imediatamente após a colheita seminal, como após o período de resfriamento. O mesmo tipo de observação é válido para os parâmetros de integridade de membrana, uma vez que a porcentagem espermatozóides vivos e

mortos, com acrossomo vivo ou lesado, também não apresentou qualquer correlação com as concentrações hormonais em qualquer momento de análise seminal.

Para que haja fertilização de um oócito por parte de um espermatozóide, há a necessidade de que o mesmo apresente, entre outros fatores, de: metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, enzimas acrossomais para penetração no oócito, *adequada distribuição de lipídios para a estabilização de suas membranas até a fertilização* e proteínas na membrana plasmática para sua sobrevivência no trato feminino; destas características, a motilidade progressiva foi o principal alvo de nossos estudos, ao elocubramos uma eventual "influência" hormonal sobre a mesma. Ao não encontrarmos nenhuma correlação entre esta característica e o vigor espermático com os perfis hormonais avaliados, vale discutir alguns fatores responsáveis pela regulação da motilidade espermática em mamíferos.

Há mais de 30 anos que se sabe que os nucleotídeos cíclicos (principalmente cAMP) e o cátion  $Ca^{2+}$  afetam diretamente a motilidade e respiração dos espermatozóides de mamíferos; enquanto que altas concentrações de AMPc consistentemente estimulam a motilidade espermática, o  $Ca^{2+}$  pode apresentar resultados variáveis de estimulação ou inibição, de acordo com variações interespecies de responsividade da membrana (HARDY; GARBERS, 1993). Há que se considerar, ainda, que espermatozóides de mamíferos são imóveis no trato reprodutivo masculino até alcançarem a região caudal do epidídimo; a partir de então, ocorrem desconhecidas e drásticas alterações bioquímicas e fisiológicas nos espermatozóides, que os tornam móveis (HARDY; GARBERS, 1993).

Coincidentemente, os espermatozóides presentes na região caudal de epidídimo tornam-se móveis exatamente ao se misturarem com as secreções glandulares

ejaculatórias (GARBERS, 1989). Entretanto, como a simples diluição, em meio, de espermatozoides ainda imóveis estimula sua movimentação, pode-se inferir que não há fatores de ativação específicos provenientes das glândulas acessórias; o líquido seminal aparentemente mostra-se muito mais importante na regulação da fisiologia espermática e da capacidade de transporte de  $Ca^{2+}$  por parte da membrana espermática, do que diretamente sobre a motilidade propriamente dita (HARDY; GARBERS, 1993). Sendo assim, motilidade, vigor e, conseqüentemente longevidade espermática de sêmen resfriado, são fatores aparentemente muito mais correlatos a variantes metabólicas, bioquímicas e enzimáticas que propriamente regidos por interferências hormonais diretas ou indiretas.

Entretanto, algumas correlações entre tais concentrações plasmáticas hormonais e patologias puderam ser observadas. Houve correlações positivas entre defeitos menores de cabeça/cauda e  $T_4/T_3$  ( $r=0,20$  e  $r=0,22$ , respectivamente), bem como entre defeitos de peça intermediária e testosterona ( $r=0,24$ ), total de defeitos e testosterona ( $r=0,27$ ) e total de defeitos e  $T_4$  ( $r=0,23$ ). Por outro lado, correlações negativas foram observadas entre defeitos menores de cabeça e estradiol ( $r=-0,28$ ), além de defeitos de peça intermediária e total de defeitos, com o estradiol ( $r=-0,19$  e  $r=-0,19$ , respectivamente).

Nunca se demonstraram efeitos diretos dos hormônios tireoideanos no testículo humano ou de animais, assim como se conhece quanto aos ovários, para que se possa inferir diretamente quanto às correlações observadas entre patologias espermáticas e concentrações plasmáticas hormonais. Indiretamente, porém, tal relação têm sido descrita; a literatura descreve que homens com hipertireoidismo apresentam menor concentração espermática, motilidade total normal, porém motilidade progressiva

significativamente menor que homens eutireoideos (JANNINI; ULISSE; D'ARMIENTO, 1995). Uma vez que os percentuais de patologia encontrados nos garanhões interferiu diretamente com a motilidade progressiva dos espermatozóides, nossos resultados corroboram plenamente a assertiva destes autores, uma vez que os animais com maior concentração de hormônios tireoideanos apresentaram maior quantidade de defeitos, tanto de cabeça, como de cauda. Opostamente, adultos com hipotireoidismo denotam diminuição no volume do ejaculado, na motilidade progressiva e também na porcentagem cumulativa de formas jovens, porém sem alterações na densidade espermática ou porcentagem de espermatozóides com morfologia normal, e também sem alterações nos níveis circulantes de testosterona e gonadotropinas (HERNANDEZ; GARCIA; DIEZ, 1990).

## **6.6 Correlações entre Características Seminais e Integridade de Membrana**

Correlação positiva foi encontrada entre motilidade progressiva e VAI ( $r=0,70$ ), bem como correspondente correlação negativa entre motilidade progressiva e MAI ( $r=-0,70$ ); analogamente foi observada correlação positiva entre vigor e VAI ( $r=0,72$ ) e correlação negativa entre vigor e MAI ( $r=-0,72$ ).

Arruda (2000) correlacionou motilidade espermática e integridade de membrana, encontrando as seguintes correlações: VAI x motilidade progressiva,  $r=0,33$  e total de espermatozóides vivos x motilidade progressiva,  $r=0,26$ . Por sua vez, Zúccari (1998) encontrou maior coeficiente de correlação entre motilidade progressiva e espermatozóides íntegros ( $r=0,59$ ), coeficiente mais próximo que aquele por nós encontrado. Casey et al. (1993), utilizando sêmen fresco de equino, obteve elevado

coeficiente de correlação ( $r=0,88$ ) entre espermatozoides íntegros e motilidade progressiva.

Brinsko et al. (2003) analisaram amostras seminais adicionadas a diferentes percentuais de espermatozoides vivos quanto a motilidade total e progressiva, assim como velocidade curvilínea de amostras espermáticas a fresco e resfriadas a 5°C após 24 horas. A presença de mais de 75% de espermatozoides mortos não afetou características de motilidade em ambos casos, embora a velocidade curvilínea e integridade de membrana tenham se revelado inferiores ao grupo controle; adicionalmente, esta integridade de membrana apresentou alta correlação positiva à motilidade total e motilidade progressiva, tanto nas amostras a fresco como nas resfriadas.

Todos estes dados evidenciam a importância da análise do acrossomo (e de sua integridade) na determinação da qualidade do sêmen fresco ou resfriado, bem como de sua longevidade, uma vez que sua presença de forma intacta no momento da inseminação artificial é de extrema importância para o sucesso da fertilização (ARRUDA, 2000).

## **6.7 Possíveis Fatores Interferentes na Longevidade de Sêmen Equino Resfriado**

Por quê, então, o sêmen de alguns garanhões é mais longo que o sêmen de outros? Para que possamos realizar algumas inferências neste aspecto, vale retornarmos em alguns resultados no tocante a motilidade total e progressiva dos animais estudados.

Imediatamente após a colheita, não se observaram diferenças de motilidade total entre os garanhões; ou seja, no tocante ao total de movimentação dos espermatozóides, todos os animais se apresentaram de maneira eqüitativa e uniforme. A mesma observação é válida para vigor espermático. Porém, ao se avaliar a motilidade progressiva, ou seja, a “quantidade” de movimento retilíneo e uniforme dos espermatozóides, todos os garanhões apresentaram comportamento semelhante, com exceção ao animal 4, cuja motilidade progressiva inicial revelou-se inferior à dos demais animais. Curiosamente este mesmo animal, junto ao garanhão 1, foi aquele que, ao longo do tempo, demonstrou menor resistência ao processo de resfriamento seminal.

No pólo oposto aos garanhões 1 e 4, os animais 2 e 3 demonstraram altas porcentagens de motilidade progressiva imediatamente após a colheita seminal e, mais importante, apresentaram (principalmente o animal 2) as maiores capacidades de resistência ao resfriamento ao longo do tempo; ambos animais, após 72 horas de resfriamento seminal a 5°C, demonstraram aproximadamente 40% de motilidade progressiva, bastante viável ao processo de inseminação artificial dadas as circunstâncias de tempo de resfriamento.

Quando comparamos as concentrações plasmáticas dos hormônios sexuais destes animais entre si, nos deparamos com uma dicotomia bastante relevante; as concentrações de estradiol dos animais que apresentaram as menores resistências ao resfriamento (1 e 4) são, no mínimo, estatisticamente iguais às dos garanhões 2 e 3, respectivamente, que apresentaram sêmen mais longo. O mesmo pode ser observado para a testosterona, em que todos os animais apresentaram concentrações sem diferenças estatísticas significativas entre si, com exceção justamente do garanhão 3, que apresentou as menores concentrações de todo o grupo. Logo, estradiol e

testosterona não pareceram interferir diretamente na capacidade de resfriamento do sêmen destes garanhões.

Fazendo-se as mesmas observações para os hormônios tireoideanos, o paradoxo se acentua. Os garanhões 2 e 3 demonstraram as menores concentrações de  $T_4$  estatisticamente significativas quando comparados aos animais 1 e 4, enquanto que o garanhão 3 apresentou a menor concentração de  $T_3$  do grupo. Conforme se pôde observar, inclusive através da ausência de correlações já relatada, os hormônios tireoideanos também não pareceram interferir na capacidade de resistência seminal ao resfriamento prolongado em temperatura fixa.

Assim sendo, quais outros fatores avaliados poderiam estar envolvidos na capacidade individual de determinados garanhões em apresentar sêmen mais longo que outros? O nível de patologia espermática destes? A integridade de membrana acrossômica?

O garanhão 4, que menor resistência seminal ao resfriamento demonstrou, foi o animal que apresentou os maiores percentuais de patologia espermática no tocante ao total de defeitos, tanto no momento imediatamente após a colheita seminal, quanto ao longo do processo de resfriamento. Contrariamente, o garanhão 3 (um dos animais de sêmen mais longo do experimento) apresentou o menor percentual de total de defeitos do grupo.

Embora com diferenças estatísticas entre si, todos os garanhões do grupo experimental apresentaram comportamento bastante semelhante no tocante aos defeitos maiores e menores de cabeça, bem como defeitos maiores de cauda. Por outro lado, grandes porcentagens de defeitos menores de cauda e defeitos de peça

intermediária puderam ser observados nos animais, fato que merece análise individual mais próxima.

Exceção feita aos animais 3 e 5, não houve diferenças estatísticas significativas entre os garanhões para a porcentagem de defeitos menores de cauda imediatamente após a colheita de sêmen. Entretanto, em números absolutos, o animal 4 foi o que apresentou maior grau desta patologia no momento 0h; também foi o animal com maior porcentagem de defeitos de peça intermediária neste momento, perpetuando estas altas porcentagens mesmo transcorridas horas de resfriamento. Vale lembrar que o garanhão 4 apresentou a menor resistência ao resfriamento ao longo do tempo dentre todos os demais do grupo experimental.

Quando comparamos o garanhão 4 ao garanhão 1, que também sofreu grandes perdas de motilidade progressiva e vigor ao longo do tempo de resfriamento, este segundo animal não demonstrou os mesmos percentuais iniciais de patologias (menores de cauda e de peça intermediária) que o garanhão 4, mas proporcionalmente as manteve mais altas após 24, 48 e 72 horas de resfriamento que o próprio garanhão 4. Estes dados talvez denotem a importância de patologias de cauda (particularmente defeitos menores, neste estudo) e de peça intermediária, tanto imediatamente após a colheita de sêmen, como após horas de resfriamento, na capacidade dos espermatozoides em se manterem móveis de forma progressiva. Em última análise, os percentuais de tais defeitos talvez sejam críticos na seleção de sêmen mais ou menos longevos.

De fato, e de maneira análoga, o garanhão 4 também foi aquele que apresentou os maiores percentuais de total de defeitos dentre todos os demais animais; contudo, quando transpomos estes totais de defeitos tendo como “pano de fundo” as

concentrações plasmáticas de hormônios sexuais e tireoideanos, não se observou clara relação entre estes parâmetros, embora fracas correlações tenham sido observadas entre algumas patologias e hormônios tireoideanos e testosterona, conforme já discutido.

O animal 4, de menor capacidade de resistência ao resfriamento, também apresentou a menor porcentagem inicial de espermatozóides vivos com acrossomo intacto dentre os demais animais do grupo. Já os animais 2 e 3, de maior capacidade de resistência ao resfriamento, além de demonstrarem altos percentuais iniciais de espermatozóides vivos com acrossomo intacto, também alcançaram 72 horas de resfriamento com os maiores percentuais desta característica. Uma vez que o comportamento do animal 1 quanto à longevidade espermática foi semelhante ao animal 4, mas não congruente em resultados de integridade de membrana, talvez sejam necessários mais estudos com número maior de animais para checagem desta eventual tendência.

Quais seriam, então, outros fatores relacionados à longevidade espermática, à parte concentrações plasmáticas de hormônios sexuais e tireoideanos, características seminais físicas e morfológicas e integridade de membrana? Provavelmente há fatores espermáticos e seminais metabólicos, bioquímicos e enzimáticos relacionados à capacidade do sêmen equino em resistir ao resfriamento após sua colheita.

A motilidade dos espermatozóides depende diretamente da integridade da membrana mitocondrial, cujos componentes principais são fosfolipídios; se ácidos graxos destes fosfolipídios forem oxidados por radicais de oxigênio livres, os espermatozóides serão lesados e a motilidade, conseqüentemente, diminuída (ALVAREZ; STOREY; 1982). Jones et al. (1978) mostraram que espermatozóides com

pobre movimentação são mais suscetíveis à ação oxidativa, além de que há uma correlação positiva e linear entre nível de peroxidação e perda de motilidade espermática. Suleiman et al. (1996) mensuraram as concentrações seminais de malondialdeído (MDA), um agente oxidante, e descobriram que homens com altas concentrações de MDA apresentaram menor motilidade espermática; o tratamento destes indivíduos com vitamina C, um agente antioxidante, diminuiu significativamente as concentrações seminais de MDA e aumentou a motilidade progressiva nestes indivíduos. Assim sendo, o processo oxidativo pode estar diretamente relacionado à longevidade seminal em diferentes indivíduos na espécie eqüina, uma vez que o ganhão 4, de menor capacidade de resistência ao resfriamento do grupo experimental, e, conseqüentemente menor longevidade seminal, apresentou o maior percentual de defeitos de peça intermediária; e é justamente na peça intermediária onde encontramos um grande arranjo helicoidal de mitocôndrias, responsáveis pela produção de ATP (energia) do espermatozóide (JUHÁSZ et al., 2000)

A leptina é uma proteína que estimula a secreção de hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) e exerce efeitos indiretos sobre as gônadas através de neuropeptídeos (GLANDER et al., 2000). Recentemente, Glander et al. (2002) demonstraram em humanos que há significativa correlação negativa ( $r=-0,46$ ;  $p=0,0005$ ) entre a concentração seminal de leptina e a porcentagem de espermatozoides móveis; em contraste, não se observaram correlações entre leptina sérica e as características seminais físicas e morfológicas. Estes autores concluíram que a quantidade de leptina no trato genital, principalmente em túbulos seminíferos, pode influenciar diretamente nos mecanismos de desenvolvimento de motilidade dos espermatozoides. Embora tais resultados tenham sido reportados na espécie humana,

não se pode descartar mais este aspecto na espécie eqüina como fator interferente no padrão de motilidade e longevidade espermática entre indivíduos.

O sistema relativo ao Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF) consiste numa rede de moléculas envolvidas na regulação do crescimento e morte celular em muitos órgãos e tecidos, normais e patológicos. No testículo, o IGF interage com as gonadotropinas, andrógenos, e múltiplos outros hormônios peptídicos na coordenação do crescimento celular, espermatogênese e esteroidogênese, e através de sua potente ação mitogênica e metabólica (HENRICKS et al., 1998).

Glander et al. (1996) descrevem que o IGF é necessário para o desenvolvimento de células germinativas normais, enquanto que o IGF seminal é associado à morfologia espermática normal; além do mais, este IGF seminal parece exercer função regulatória no esperma pré e pós ejaculado, afetando diretamente a motilidade e capacitação espermática. Henricks et al. (1998), trabalhando com sêmen bovino centrifugado, demonstraram que a adição de IGF-I estimula a motilidade espermática e aumenta a velocidade dos espermatozóides, provavelmente através do aumento do metabolismo espermático, uma vez que os IGFs aumentam a captação de glucose, produção de lactase, atividade da piruvato desidrogenase e sua conversão a glucose-6-fosfato. Vale ressaltar que os IGFs também exercem atividade antioxidante, resultando em aumento da viabilidade, motilidade e velocidade espermáticas.

Maiores estudos se fazem necessários na espécie eqüina, focando aspectos relacionados ao plasma seminal, aos fatores de crescimento, agentes antioxidantes e outras proteínas, bem como suas interações com as características seminais, uma vez que não se demonstrou haver influências diretas das concentrações plasmáticas de hormônios sexuais e tireoideanos sobre a longevidade de sêmen eqüino.

## 7 CONCLUSÕES

As análises dos resultados obtidos nos possibilitaram auferir as seguintes conclusões:

- ↻ As concentrações hormonais de testosterona e estradiol mostraram-se compatíveis com o histórico de fertilidade e desenvolvimento sexual de cada garanhão, bem como idade e qualidade espermática dos mesmos.
- ↻ Os garanhões utilizados mostraram-se eutireoideos;
- ↻ A resistência ao resfriamento, e conseqüentemente a longevidade seminal, denota nítido padrão individual, aparentemente relacionado ao nível de patologia espermática e integridade de membrana dos animais.
- ↻ Não houve correlação entre concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol com a longevidade seminal e viabilidade espermática observada em diferentes garanhões, transcorridas 24, 48 e 72 horas de resfriamento seminal.
- ↻ Não houve correlação entre concentrações plasmáticas de  $T_3$  e  $T_4$  com a longevidade seminal e viabilidade espermática observada em diferentes garanhões, 24, 48 e 72 horas de resfriamento seminal.
- ↻ Não houve influência direta entre as concentrações plasmáticas de  $T_3$  e  $T_4$  e os principais características seminais físicas e morfológicas analisadas.
- ↻ Aparentemente há outros fatores inerentes, de forma provável, ao plasma seminal que interferem de forma individual na longevidade seminal.
- ↻ Novos estudos deverão ser conduzidos neste mesmo sentido, incluindo-se garanhões com histórico de disfunções hormonais e/ou seminais, com a finalidade de se pesquisar objetivamente eventuais correlações mais específicas entre estes parâmetros.

~ Novos estudos deverão ser conduzidos no sentido de avaliação e mensuração de fatores inerentes ao plasma seminal, como IGFs, leptina e agentes oxidantes, e suas interrelações com a longevidade do sêmen de garanhões.

## REFERÊNCIAS

- ABALOVICH, M.; LEVALLE, O.; HERMES, R.; SCAGLIA, H.; ARANDA, C.; ZYLBERSZTEIN, C.; ONETO, A.; AQUILANO, D.; GUTIERREZ, S. Hypothalamic-pituitary-testicular axis and seminal parameters in hyperthyroid males. **Thyroid**, v. 9, n. 9, 1999.
- ABBATICCHIO, G.; GIORGINO, R.; GENTILE, F. M.; CASSANO, A.; GATTUCCIO, F.; ORLANDO, G.; JANNI, A. Male fertility and thyroid hormones. **Acta European Fertility**, v. 12, n. 3, p. 255-260, 1981.
- AEHNELT, E. **Das sperma des hengtes unter berücksichtigung von umwelt und vererbung**. Tese (Livre Docência) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade de Hannover, 1950.
- AHRÉN, B. Thyroid neuroendocrinology: neural regulation of thyroid hormone secretion. **Endocrine Review**, v. 7, n. 2, p. 149-155, 1986.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. **Biology of Reproduction**, n. 27, p. 1102-1108, 1982.
- AMANN, R. P. Functional anatomy of the adult male. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 645-657.
- AMANN, R. P. Physiology and endocrinology. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 658-685.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 715-745.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoal. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

AMANN, R. P.; THOMPSON, D. L.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.1-6, 1979. Supplement 27.

ANDERSON, R. R.; NIXON, D. A.; AKASHA, M. A. Total and free thyroxine and triiodothyronine in blood serum of mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 3, p. 401-404, 1988.

ARMADA, D. L.; CARVALHO, J. J.; BREITENBACH, M. M. D.; FRANCI, C. R.; MOURA, E. G. Is the fertility in hypothyroidism mainly due to ovarian or pituitary functional changes? **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 34, n. 9, p. 1209-1215, 2001.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAVALOS ÁRABES. **Origem da raça**. Disponível em: <http://www.abcca.com.br/origemcavaloarabe.html>. 2002. Acesso em 23 nov. 2003.

BIELANSKI, W. Die bedeutung der spermauntersuchung bei hengsten fur die beurteilung der fruchtbarkeit. **Medye. Wt. Wareszawa**, v. 6, p. 678-680, 1950.

BIELANSKI, W.; DUDEK, E.; BITTMAR, A.; KOSINIAK, K. Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 21-26, 1982. Supplement 32.

BLACH, E. L.; AMANN, R. P.; SAWYER, H. R.; HERMENET, M. J. Use of a monoclonal antibody to evaluate integrity of the plasma membrane of stallion sperm. **Gamete Research**, v. 21, p. 233-241, 1988.

BRAUN, J.; MUTO, Y.; SATO, K.; SCHALLENBERGER, E. The effect of the season and sexual stress on the concentration of testosterone and estradiol-17beta in the seminal plasma of stallions. **Tierarztliche Praxis**, v. 24, n. 6, p. 577-580, 1996.

BRAUN, J.; TORRES-BOGGINO, F.; HOCHI, S.; OGURI, N. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Deutsche Tierärztliche Wochenschr**, v. 101, n. 8, p. 319-322, 1994.

BREUHAUS, B. A. Thyroid-stimulating hormone in adult euthyroid and hypothyroid horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 1, p. 109-115, 2002.

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 semen. **Theriogenology**, v. 59, n. 3-4, p. 735-742, 2003.

BRINSKO, S. P.; ROWAN, K. R.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, n. 8, p. 1641-1655, 2000.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Artificial insemination and preservation of semen. In: BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Stallion management. **Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 205-218, 1992.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Artificial insemination. In: MCKINNON, A. O., VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, 1993, p.790-797.

BROOKS, J. R.; ROSS, C. V.; TURNER, C. W. Effect of thyroidectomy on reproductive performance of ewes and semen quality of rams. **Journal of Animal Science**, v. 23, p. 54-58, 1964.

BRUEMMERT, J. E.; COY, R. C.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 1, p. 12-18, 2001.

BURNS, P. J.; JAWAD, M. J.; EDMUNDSON, A.; CAHILL, C.; BOUCHER, J. K.; WILSON, E. A.; DOUGLAS, R. H. Effect of increased photoperiod on hormone concentrations in thoroughbred stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 103-111, 1982. Supplement 32.

CAPEN, C. C.; MARTIN, S. L. The thyroid gland. In: McDONALD, L. E.; PINEDA, M. H. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p. 67-72.

CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M.; DROBNIS, E. Z. Validation of an acrossomal stain for equine sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). **Theriogenology**, v. 50, p. 487-493, 1998.

CHANDRASEKHAR, Y.; D'OCCHIO, M. J.; HOLLAND, M. K.; SETCHELL, B.P. Activity of the hypothalamo-pituitary axis and testicular development in prepubertal ram lambs with induced hypothyroidism or hyperthyroidism. **Endocrinology**, v. 117, n. 4, p. 1645-1651, 1985.

CHASTAIN, C. B.; MCNEEL, S. V.; GRAHAM, C. L.; PEZZANITE, S. C. Congenital hypothyroidism in a dog due to an iodide organification defect. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 7, p. 585-593, 1983.

CHEN, C. L.; RILEY, A. M. Serum thyroxine and triiodothyronine concentrations in neonatal foals and mature horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 8, p. 1415-1417, 1981.

CHESTER, D. K. The thyroid and thyroid diseases. In: DRAZNER, F. H. **Small Animal Endocrinology**. New York: Churchill Livingstone, 1987. p. 83-114.

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**, v. 8, n. 1, p. 31-56, 1992.

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**, v. 66, n. 5, p. 1246-1255, 1988.

COOKE, P. S. Thyroid hormone and the regulation of testicular development. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 333-341, 1996.

CORNWELL, J. C.; GUTHRIE, L. D.; SPILLMAN, T. E.; MCCRAINE, S. E.; HAVER, E. P.; VICENT, C. K. Seasonal variation in stallion semen. **Journal of Animal Science**, v. 34, p. 353, 1972.

- COX, J. E.; REDHEAD, P. H.; JAWAD, N. M. The effect of artificial photoperiod at the end of the breeding season on plasma testosterone concentrations in stallions. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, n. 8, p. 239-241, 1988.
- DEMICK, D. S.; VOSS, J. L.; PICKETT, B. W. Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 633-637, 1976.
- DE VRIES, P. J. Evaluation of the use of fresh, extended and transported stallion semen in the Netherlands. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 641, 1987. Supplement 35.
- DICKSON, W. M. Glândulas endócrinas. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Duke's Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 571-602.
- DOTT, H. M. Morphology of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 41-46, 1975. Supplement 23.
- DOUGLAS, R. H.; UMPHENOUR, N. Endocrine abnormalities and hormonal therapy. **Veterinary Clinics North America. Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 237-249, 1992.
- DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; BURNS, P. J.; DRISCOLL, D. D.; VIALE, K. M. Fertility and characteristics of slow cooled stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 649-650, 1987. Supplement 35.
- DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of the transported equine semen. **Theriogenology**, v. 22, p. 291-304, 1984.
- DOWSETT, K. F. Collection and evaluation of stallion semen. **Australian Veterinary Science**, v. 23, 1979.
- DOWSETT, K. F.; KNOTT, L. M. The influence of age and breed on stallion semen. **Theriogenology**, n. 43, v. 5, p. 939-953, 1995.
- DOWSETT, K. F.; PATTIE, W. A. Characteristics and fertility of stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 1-8, 1982. Supplement 32.

DUCKETT, W. M.; MANNING, J. P.; WESTON, P. G. Thyroid hormone periodicity in healthy adult geldings. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. 2, p.123-125, 1989.

DUSEK, J.; MUNK, Z. The effect of the age of stallions and mares on their fertility. **Veterinary Medicine (Praha)**, v. 25, n. 7, p. 437-448, 1980.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. As glândulas endócrinas. In: \_\_\_\_\_ **Tratado de Anatomia Veterinária**. São Paulo: Saunders Company, 1997.

EISENHAUER, K. M.; MCCUE, P. M.; NAYDEN, D. K.; OSAWA, Y.; ROSER, J. F. Localization of aromatase in equine Leydig cells. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 11, p. 291-298, 1994.

FRANCAVILLA, S.; CORDESCI, G.; PROPERZI, G.; DI CICCIO, L.; JANNINI, E. A.; PALMERO, S.; FUGAZA, E.; LORAS, B.; D'ARMIENTO, M. Effect of thyroid hormone on the pre- and pos-natal development of the rat testis. **Journal of Endocrinology**, v. 129, p. 35-42, 1991.

GANJAM, V. K.; KENNEY, R. M. Androgens and oestrogens in normal and cryptorchid stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 67-73, 1975. Supplement.

GARBERS, D. L. Molecular basis of fertilization. **Annual Review of Biochemistry**, n. 58, p. 719-742, 1989.

GLANDER, H. J.; HORN, L. C.; DORSCHNER, W.; PAASCH, J.; KRATZSCH, J. Probability to retrieve testicular spermatozoa in azoospermic patients. **Asian Journal of Andrology**, n. 2, p. 199-205, 2000.

GLANDER, H. J.; KRATZSCH, J.; WEISBRICH, C.; BIRKENMEIER, G. Insulin-like growth factor I and alpha-2 macroglobulin in seminal plasma correlation with semen quality. **Human Reproduction**, n. 11, p. 746-750, 1996.

GLANDER, H. J.; LAMMERT, A.; PAASCH, J.; GLASOW, A.; KRATZSCH, J. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. **Andrologia**, v. 34, p. 227-233, 2002.

GÖTZE, R. **Besamung und unfruchtbarkeit der haussäugetiere**. Hannover: Verlag & Schaper, 1949.

GRAHAM, J. K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 119-30, 1996.

GRIFFIN, S. A.; HENNEMAN, H. A.; REINEKE, E. P. Thyroid secretion rate and semen quality. **American Journal of Veterinary Research.**, v. 23, p. 109-114, 1962.

GUTIERREZ, C. V.; RIDDLE, W. T.; BRAMLAGE, L. R. Serum thyroxine concentrations and pregnancy rates 15 to 16 days after ovulation in broodmares. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 1, n. 220, p. 64-66, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Os hormônios metabólicos da tireóide. In: \_\_\_\_\_ **Tratado de Fisiologia Médica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 859-869.

HAFEZ, E. S. E. Reproductive capacity of farm animals in relation to climate and nutrition. **Journal of Agricultural Science**, v. 42, p. 606-614, 1959.

HAFEZ, E. S. E. **Reproducción e inseminación artificial en animales**. México: Interamericana, 1996. p. 542.

HARDY, D. M.; GARBERS, D. L. Molecular basis of signaling in spermatozoa. In: DE KRETZER, D.M. **Molecular biology of the male reproductive system**. San Diego: Academic Press, 1993. p.481.

HEISKANEN, M. L.; HUHTINEN, M.; PIRHONEN, A.; MAENPAA, P. H. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. **Acta Scandinavica**, v. 35, n. 3, p. 257-262, 1994.

HENRICKS, D. M.; KOUBA, A. J.; LACKEY, B. R.; BOONE, W. R.; GRAY, S. L. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 330-337, 1998.

HENRIKSE, J. The semen of stallions of normal fertility. **Tijdschr Diergeneeskd**, v. 91, p. 300-313, 1966.

HERNANDEZ, J. J. C.; GARCIA, J. M. M.; DIEZ, L. C. G. Primary hypothyroidism and human spermatogenesis. **Archives of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 21-27, 1990.

HINOJOSA, A. M.; BLOESER, J. R.; THOMSON, S. R.; WATSON, E. D. The effect of a GnRH antagonist on endocrine and seminal parameters in stallions. **Theriogenology**, v. 15, n. 56, p. 903-12, 2001.

HOFFMANN, B.; LANDECK, A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 31, n. 57, p. 89-98, 1999.

HUHTANIEMI, I. Hormonal control mechanisms of Leydig cells. In: DE KRETZER, D. M. **Molecular biology of the male reproductive system**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 481.

INOUE, J.; CERBITO, W. A.; OGURI, N.; MATSUZAWA, T.; SATO, K. Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 2, p. 155-158, 1993.

JACKSON, I. M. D. Thyrotropin releasing hormone. **England Journal of Medicine**, v. 306, p. 145-155, 1982.

JANNINI, E. A.; OLIVIERI, M.; FRANCAVILLA, S.; GULINO, A.; ZIPARO, E.; D'ARMIENTO, M. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'Triiodothyronine receptor in the rat testis. **Endocrinology**, v. 126, n. 5, p. 2521-2526, 1990.

JANNINI, E. A.; ULISSE, S; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone and male gonadal function. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 4, p. 443-459, 1995.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. In.: CONGRESSO DE MEDICINA EQUINA, 1., 1994, São Paulo. **Proceedings...**Jaboticabal: Ars Veterinaria, 1994. p.156-165.

JASKO, D. J.; BEDFORD, S. J.; COOK, N. L.; MUMFORD, E. L.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoal. **Theriogenology**, v. 40, p. 885-893, 1993.

JASKO, D. J.; LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 3, p. 389-94, 1990.

JASKO, D. J.; LITTLE, T. V.; LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 7, p. 979-85, 1992.

JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35, n. 5, p. 1059-1067, 1991.

JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E. Comparison of pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen semen. In.: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 12., 1988, Haia. **Proceedings...**, 1988. p.1439-1441.

JOHNSON, C. A.; GRACE, J. A.; PROBST, M. R. Effects of maternal illness on perinatal health. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 16, p. 555-566, 1987.

JONES, R.; MANN, R.; SHERINS, R. Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. **Proceedings of the Royal Society of London. B Series. Biological Sciences**, n. 201, p. 413-417, 1978.

JUHÁSZ, J.; NAGY, P.; KULCSÁR, M.; HUSCENICZA, G. Y. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a review. **Acta Veterinaria**, v. 69, p. 247-259, 2000.

KAPTEIN, E. M.; HAYS, M. T.; FERGUSON, D. C. Thyroid hormone metabolism. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 24, n. 3, p. 509-514, 1994.

KLUG, E. Neue Chancen der instrumentellen Samen-Übertragung beim Pferd. **Tierärztliche Umschau**, v. 44, p. 489-491, 1989.

KLUG, E. Routine AI application in the Hannoverian Sport Horse Breeding Association. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n. 1, p. 39-44, 1992.

KOVÁCS, A.; FOOTE, R. H. Viability and acrossome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 67, n. 3, p. 119-124, 1992.

KOVÁCS, A.; FOOTE, R. H.; NAGY, S.; BOERSMA, A.; LEIDL, W.; STOLLA, R.; DOMES, U. Live/dead acrossome staining of stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, Stockholm. **Abstracts...** 2000. p.82.

LANG, A. L.; VOGELSANG, M. M.; POTTER, G. D.; BLANCHARD, T. L.; HARMS, P. G. Semen parameters and hormone concentrations in stallions subjected to long-term estrogen administration. **Journal of Equine Veterinary Science**, n. 18, p. 114-117, 1998.

LINCOLN, G. A. Photoperiodic-pineal-hypothalamic relay in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 203-217, 1992.

LO, C. C.; THOMPSON, J. A.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1135-1142, 2002.

LOTHROP JR., C. D.; NOLAN, H. L. Equine thyroid function assessment with the thyrotropin-releasing hormone response test. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 4, p. 942-944, 1986.

LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1135-1142, 2002.

LOWE, J. E.; BALDWIN, B. H.; FOOTE, R. H.; HILLMAN, R. B.; KALLFELZ, F. A. Equine hypothyroidism: the long term effects of thyroidectomy on metabolism and growth in mares and stallions. **Cornell Veterinary**, v. 64, n. 2, p. 276-295, 1974.

LOWE, J. E.; FOOTE, R. H.; BALDWIN, B. H.; HILLMAN, R. B.; KALLFELZ, F. A. Reproductive patterns in cyclic and pregnant thyroidectomized mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 281-288, 1987. Supplement 35.

MAGESTRINI, M.; SEGUIN, F.; BEAU, P.; AKOKA, S.; LE PAPE, A; PALMER, E. H. Nuclear magnetic resonance analysis of stallion genital tract fluids and seminal plasma: Contribution of the accessory Sex glands to the ejaculate. **Biology of Reproduction** n. 1, p. 599-607, 1995.

MALINOWSKI, K. ; CHRISTENSEN, R. A. ; HAFS, H. D.; SCANES, C. G. Age and breed differences in thyroid hormones, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins in female horses. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 8, p. 1936-1942, 1996.

MALMGREN, L.; ANDRESEN, O.; DALIN, A. M. Effect of GnRH immunization on hormonal levels, sexual behaviour, semen quality and testicular morphology in mature stallions. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 1, p. 75-83, 2001.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: \_\_\_\_\_ **Male reproduction and semen**. New York: Springer Verlag, 1981. p. 23-28.

MATSUMOTO, A. Hormonal control of spermatogenesis. In: BURGER, H.; DE KRETZER, D. **The testis**. New York: Raven Press, 1989. p. 181-196.

MCDONALD, L. E.; PINEDA, M. H. **Veterinary endocrinology and reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p. 597.

MENEGATOS, I.; KALOGIANNES, D.; LAINAS, T.; NIKOKURES, P.; DELIGIANNES, K.; NIKALAOU, E. Changes in serum thyroxine values over a year in greek Zackel ewes. **Bulletin Hell. Veterinary Medical Society**, v. 45, p. 20-24, 1994.

MERKIES, K.; CHENIER, T.; PLANTE, C; BUHR, M. M. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. **Theriogenology**, v. 54, p. 1215-1224, 2000.

MESSER, N. T.; JOHNSON, P. J.; REFSAL, K. R.; NACHREINER, R. F.; GANJAM, V. K.; KRAUSE G. F. Effect of food deprivation on baseline iodothyronine and cortisol concentrations in healthy, adult horses. **American Journal of Veterinary Research**, n. 56, v. 1, p. 116-121, 1995.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1987. p. 736.

MOTTON, D. D.; ROSER, J. F. HCG binding to the testicular LH receptor is similar in fertile, subfertile and infertile stallions. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 411-416, 1997.

NACHREINER, R. F. Laboratory endocrine diagnostic procedures in theriogenology. In: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 17-20.

NACHREINER, R. F.; HYLAND, J. H. Reproductive endocrine function testing in mares. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 303-310.

NADEN, J.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. **Journal of reproduction and fertility**, v. 88, n. 1, p. 167-176, 1990.

OKAB, A. B.; ELEBANNA, I. M.; MIEKKAWY, M. Y.; HASSAN, G. A.; EL-NOUTY, F. D.; SALEM, M. H. Seasonal changes in plasma thyroid hormones, total lipids, cholesterol and serum transaminases during pregnancy and parturition in Barki and Rahmani ewes. **Indian Journal of Animal Science**, v. 63, p. 946-951, 1993.

PAPA, F.O. **Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de eqüinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial**. 1987. 150 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1987.

PARKINSON, T. J.; FOLLETT, B. K. Effect of thyroidectomy upon seasonality in rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 51-58, 1994.

PARKINSON, T. J.; FOLLETT, B. K. Thyroidectomy abolishes seasonal testicular cycles of Soay rams. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 259, p. 1-6, 1995.

PATTIE, W. A., DOWSETT, K. F. The repeatability of seminal characteristics of stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 9-13, 1982. Supplement 32.

PICKETT, B. W.; FAULKNER, L. C.; SEIDEL JR., G. E.; BERNDTSON, W. E.; VOSS J. L. Reproductive physiology of the stallion VI: Seminal and behavioral characteristics. **Journal of American Science**, v. 43, n. 3, p. 617-625, 1976.

PICKETT, B. W.; FAULKNER, L. C.; SUTHERLAND, T. M. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. **Journal of Animal Science**, v. 31, n. 4, p.713-728, 1970.

PICKETT, B. W.; FAULKNER, L. C.; VOSS, J. L. Effect of season on some characteristics of stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 25-28, 1975. Supplement 23.

PICKETT, B. W.; SULLIVAN, J. J.; BYERS, W. W.; PACE, M. M.; REMMENGA, E. E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **American Fertility Society**, v. 26, n. 2, 1975.

PINEDA, M. H. Male reproductive system. In: PINEDA, M. H.; DOOLEY, M. P. **McDonald's veterinary endocrinology and reproduction**. Ames: Iowa State Press, 2003. p. 597.

QUINN, P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v. 22, p. 128-146, 1985.

REASIDE, J. I.; CHRISTIE, H. L. Estrogen concentrations in semen of the stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 48, n. 2-4, p. 293-300, 1997.

RIIS, P. M. Adaptation of metabolism to various conditions: nutritional and other environmental conditions. In: RIIS, P. M. **Dynamic biochemistry of animal production**, Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 281-317.

ROSER, J. F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 3, n. 68, p. 139-151, 2001.

ROSER, J. F. Testicular responsiveness to a challenge of hCG in fertile, subfertile and infertile stallions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 6., 1994, São Paulo. **Proceedings...**, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1994, p.165-166.

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**, v. 13, n. 3, p. 214-23, 1992.

SALEM, M. H.; EL-SHERBINY, A. A.; KHALIL, M. H.; YOUSSEF, M. K. Diurnal and seasonal rhythm in plasma cortisol, triiodothyronine and thyroxine as affected by the wool coat in Barki sheep. **Indian Journal of Animal Science**, v. 61, p. 946-951, 1991.

SHARP, D. C.; CLEAVER, B. D. Melatonin. In: MCKINNON, A. O., VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, 1993. p.100-108.

SHORE, M. D.; MACPHERSON, M. L.; COMBES, G. B.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. **Theriogenology**, v. 1, n. 50, p. 693-698, 1998.

SILVA FILHO, J. M.; SANTIAGO, M. L. D.; PALHARES, M. S.; MELO, M. A.; MAGNAGO, L. G. P. Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen "in natura" ou diluído no diluidor de mínima contaminação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 18, n. 1-2, p. 69-80, 1994.

SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic of the structure of cell membranes. **Science**, n. 175, p. 720-731, 1972.

SOJKA, J. E.; JOHNSON, M. A.; BOTTOMS, G. D. Serum triiodothyronine, total thyroxine, and free thyroxine concentrations in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 1, p. 52-55, 1993.

SOUZA, M. I. L. **Congelabilidade do sêmen e ritmos de secreção de testosterona, androstenediona, triiodotironina e tiroxina, ao longo do ano, em carneiros Ideal no estado de São Paulo**. 1999, 127 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

SOUZA, N.L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozóides criopreservados de eqüinos**. 2001, 76 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.

SQUIRES, E. L.; BRUBAKER, J. K.; MCCUE, P. M.; PICKETT, B. W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 743-749, 1998.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 7-12, 1979. Supplement 27.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VAN DER WALL, D. L.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. Apostila.

STEWART, B. L.; ROSER, J. F. Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations in stallions. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 15, n. 2, p. 129-39, 1998.

SULEIMAN, S. A.; ELAMIN ALI, M.; ZAKI, Z. M. S.; EL-MALIK, E. M. A.; NASR, M. A. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 530-537, 1996.

SULLIVAN, J. J.; PICKETT, B. W. Influence of ejaculation frequency of stallions on characteristics of semen and output of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 29-34, 1975. Supplement 23.

SWIESTRA, E. E.; GEBAUER, M. R.; PICKETT, B. W. Relationship between daily sperm production as determined by quantitative testicular histology and daily sperm output in the stallion. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 35-39, 1975. Supplement 23.

THOMPSON JR., D. L.; 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**, v. 44, n. 4, p. 656-664, 1977.

THOMPSON JR., D. L.; PICKETT, B. W.; NETT, T. M. Effect of season and artificial photoperiod on levels of estradiol 17-beta and estrone in blood serum of stallions. **Journal of Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 184-187, 1978.

THOMPSON JR., D. L.; PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L.; NETT, T. M. Effect of testosterone and estradiol-17beta alone and in combination on LH and FSH concentration in blood serum and pituitary of geldings and in serum after administration of GnRH. **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 1231-1237, 1979.

THOMPSON JR., D. L.; ST. GEORGE, R. L.; JONES, L. S.; GARZA JR., F. Patterns of secretion of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone in stallions during the summer and winter. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 3, p. 741-748, 1985.

TOHEI, A.; TAYA, K.; WATANABE, G.; VOOGT, J. L. Hypothyroidism increases prolactin secretion and decreases the intromisión threshold for induction of pseudopregnancy in adult female rats. **Physiology and Behaviour**, v. 69, p. 391-397, 2000.

TORRES-BOGGINO, F.; SATO, K.; OKA, A.; KANNO, Y.; HOCHI, S.; OGURI, N.; BRAUN, J. Relationship among seminal characteristics, fertility and suitability for semen preservation in draft stallions. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 2, p. 225-229, 1995.

TROEDSSON, M. H.; LIU, I. K.; CRABO, B. G. Sperm transport and survival in the mare: a review. **Theriogenology**, n. 49, v. 5, p. 905-915, 1998.

VAN DER HOLST, W. A study of the morphology of stallion semen during the breeding and non-breeding seasons. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 87-89, 1975. Supplement 23.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 28, n. 5, p. 709-723, 1987.

VIANNA, S. A. B.; SOUZA, G. V.; FAGUNDES, B.; FONSECA, C. W.; MAEDA, M.; GUIMARÃES, M. C.; MATTA, M. F. R.; MATTA, C. G. F.; TILBURG, M. F.; SILVA, J. F. S. A influência do plasma seminal na congelabilidade de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, 2002.

VOSS, J. L.; PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 178, p. 287-289, 1981.

WAKIN, A. N.; POLIZOTTO, S. L.; BUFFO, M. J.; MARRERO, M. A.; BURHOLD, D. R. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulose cells. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 6, p. 1187-1190, 1996.

WAKIN, N. G.; RAMANI, N.; RAO, V. Triiodothyronine receptors in porcine granulosa cells. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v. 156, n. 1, p. 237-240, 1987.

WALLACH, S. J. R.; PICKETT, B. W.; NETT, T. M. Sexual behaviour and serum concentrations of reproductive hormones in imponent stallions. **Theriogenology**, v. 19, p. 833-840, 1983.

WEINBAUER, G. F.; NIESCHLAG, E. Hormonal control of spermatogenesis. In: DE KRETZER, D. **Molecular biology of male reproductive system**. New York: Academic Press, 1993. p.99-142.

WERHAHN, H. **Andrologische untersuchungen in einem grossen beschälerbestand – Auswahl von hengsten als samenspender für die instrumentelle samenübertragung mit tiefgefriersperma**. 1978. Tese (Doutorado) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade de Hannover, Hannover, 1978.

ZIRKIN, B. R.; AWONIYI, C.; GRISWOLD, M. D.; RUSSELL, L. D.; SHARPE, R. Is FSH required for adult spermatogenesis? **Journal of Andrology**, v. 15, p. 273-276, 1994.

ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998. 121 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.