



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITO DA MELATONINA EM ESPERMATOZÓIDES DE EQUINO

Carolina Maria Balão da Silva

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutor Fernando Juan Peña Vega

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor Fernando Juan Peña Vega

2010

LISBOA

---



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITO DA MELATONINA EM ESPERMATOZÓIDES DE EQUINO

Carolina Maria Balão da Silva

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutor Fernando Juan Peña Vega

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor Fernando Juan Peña Vega

2010

LISBOA

---

## Dedicatórias

Aos meus pais e às minhas irmãs, por todo o apoio e incentivo dado, ainda que isso por vezes signifique distanciar-me de vocês.

## Agradecimentos

Aos meus pais, Maria Rosa e Gilberto, os melhores exemplos de dedicação que poderei encontrar, e os quais me proporcionaram todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional. O que são e o que me ensinaram acompanha-me em tudo o que faço.

Às minhas irmãs Isadora e Bárbara, as minhas melhores amigas, que de maneiras diferentes sempre foram um exemplo para mim. Os melhores conselhos, os nomes que ninguém percebe, a confiança insubstituível...

Às minhas avós, que seguramente se sentiriam muito felizes com o fim desta fase.

Ao Professor Fernando Peña, por toda a ajuda e disponibilidade na realização deste trabalho, e ao Professor George Stilwell pela compreensão e apoio dados.

Aos Professores dos quais já fui aluna, que de sua forma sempre contribuíram para uma vontade crescente de continuar a aprender.

À Cristina, à Bea, ao Antolín, ao JuanMa e ao Lauro, pelo acolhimento dado, pela forma como me permitiram integrar e por tudo o que me ensinaram. Gracias pollos!

Ao Professor José Tapia e ao Alvaro, pela disponibilidade e apoio prestados na realização das imagens de microscopia confocal.

Aos ganhões utilizados neste trabalho, que contribuíram incessavelmente da melhor forma para a sua realização. Ao Ute.

À Ana Margarida, à Ana Maria, ao Carlos, ao David, à Inês, ao João, ao Luís e João B., à Madalena, à Mafalda, à Natacha, à Rita pela amizade durante estes 5 anos, por partilhar os bons momentos e por todo o apoio nos menos bons, porque não se justifica o que apenas existe. A todos os colegas que não nomeio mas também não esqueço, e que partilharam dias de trabalho completos com horas de descontração, muito obrigada.

À Catarina, à Joana e à Ana, porque a amizade por vezes não é espontânea, e a diferença pode unir mais que as semelhanças. Ao André, ao Gonçalo, ao Miguel, ao Filipe, à Joana A. e Joana B., ao João Galamas, à Catarina, à Fabiola, à Maria, à Tamara, e a Cascais, a terra que temos a sorte de poder disfrutar.

À Elisa, ao Tello, à María, à Martina, e a todos os que nestes meses de trabalho tiveram um pouco de paciência e boa disposição perante alguém desconhecido.

À Paloma e ao Mirko, pelos tempos inesquecíveis numa realidade diferente.

Ao Rafa, por me ter ajudado a crescer mesmo quando não tinha vontade.

Ao Dr. Luís Cruz, à Dra. Ana e a toda a equipa da Clínica das Laranjeiras pela oportunidade de aprender e pela forma empenhada de trabalhar.

À Dra. Carolina Monteiro, pelo exemplo de uma visão empreendedora e uma grande capacidade de trabalho.

Ao Dr. Abel Almeida e à restante equipa do Hospital dos Animais, por toda a disponibilidade e companheirismo durante as semanas aí passadas.

A todos os que se cruzaram comigo e decidiram dedicar um pouco do seu tempo a esclarecer uma dúvida, a fomentar um espírito de aprendizagem ou apenas a partilhar uma conversa, muito obrigada por tudo!

## **Efeito da melatonina em espermatozóides de equino**

Resumo: A importância biológica e a complexidade funcional do espermatozóide tornam esta célula num objecto de pesquisa cada vez mais aprofundada. A propriedade da melatonina como antioxidante, assim como a recente descoberta da sua presença no plasma seminal surgiram como fundamentos para este projecto de investigação: determinar, pela análise computadorizada de motilidade e por citometria de fluxo as alterações ocorridas nos parâmetros espermáticos, nomeadamente integridade de membrana e viabilidade, desorganização de membrana, peroxidação lipídica e potencial de membrana mitocondrial, após incubação de amostras com melatonina, permitindo retirar informações acerca do stress oxidativo na célula espermática. Foram analisados três ejaculados de quatro garanhões, tendo sido obtidos resultados favoráveis principalmente no que diz respeito à peroxidação lipídica. Conclui-se que a melatonina é um antioxidante redutor do stress oxidativo e portanto do ataque pelas espécies reactivas de oxigénio, protegendo os espermatozóides.

Palavras-chave: Espermatozóide, melatonina, motilidade, citometria de fluxo, stress oxidativo

## **Effect of melatonin on stallion spermatozoa**

Abstract: The biological importance and functional complexity of the spermatozoa makes it an important subject of research. The capacity of melatonin to work as an antioxidant, as well as the recent discovery of this hormone on the seminal plasma, were the basis for this investigation project: to determine, by computer motility analysis and flow cytometry, the changes occurred on spermatic parameters, specifically membrane integrity and viability, membrane disorder, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potencial after incubation with melatonin, concluding information about oxidative stress on the spermatic cell. There were analyzed three ejaculates from four stallions, and the results were mainly important in terms of lipid peroxidation, leading to the conclusion that melatonin is an antioxidant that reduces oxidative stress caused by oxygen reactive species, protecting the spermatozoa.

Keywords: spermatozoa, melatonin, motility, flow cytometry, oxidative stress

## Abreviaturas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ALH: Média do deslocamento lateral da cabeça
- AMPc: Adenosina monofosfato cíclico
- ANOVA: Análise de variância
- ATP: Adenosina trifosfato
- BCF: *Beat Cross Frequency*
- CASA: Análise espermática assistida por computador
- CTC: Ensaio da Clortetraciclina
- DIC: Contraste de interferência diferencial
- DSO: Produção diária de espermatozóides
- ERO: Espécies reactivas de oxigénio
- FSC: Forward scatter
- FSH: Hormona estimulante folicular
- GnRH: Hormona libertadora de gonadotropina
- GSH: Glutathione
- LH: Hormona luteinizante
- LIN: Coeficiente de linearidade
- M540: Merocianina 540
- MT1: Receptor membranar de melatonina 1
- MT2: Receptor membranar de melatonina 2
- PKA: Proteína cinase A
- SCN: Núcleo supraquiasmático
- SFC: Side scatter
- STR: Coeficiente de rectidão
- UI: Unidades Internacionais
- VAP: Velocidade media
- VCL: Velocidade curvilínea
- VSL: Velocidade em linha recta
- WOB: Coeficiente de *Wobble* (ondulação)

## ÍNDICE

Relatório de Actividades Desenvolvidas durante o Estágio Curricular	10
1. Introdução	12
2. Espermatogénese e endocrinologia	13
3. Espermatozóide	14
4. Fisiologia seminal	18
5. Avaliação seminal	20
6. Citometria de fluxo	27
6.1. Integridade de membrana plasmática e viabilidade	29
6.2. Desorganização membranar e capacitação	30
6.3. Integridade acrossómica	31
6.4. Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )	31
6.5. Estado da cromatina	32
6.6. Peroxidação lipídica	33
7. Espécies reactivas de oxigénio	33
8. Melatonina	38
9. Materiais e métodos	43
9.1. Colheita de sémen e processamento	43
9.2. Protocolo laboratorial	46
9.3. Motilidade espermática	47
9.4. Citometria de fluxo	47
9.5. Microscopia de laser confocal	51
9.6. Análise estatística	51
10. Resultados	51
11. Discussão	60
12. Conclusão	64
13. Bibliografia	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias dos diversos parâmetros de motilidade ao tempo zero horas.	52
Tabela 2. Médias dos diversos parâmetros de motilidade ao tempo três horas.	52
Tabela 3. Médias dos valores de viabilidade espermática e permeabilidade de membrana ao tempo zero horas.	53
Tabela 4. Médias dos valores de viabilidade espermática e permeabilidade de membrana ao tempo três horas.	54
Tabela 5. Médias dos valores de desorganização lipídica membranar ao tempo zero horas	55
Tabela 6. Médias dos valores de desorganização lipídica membranar ao tempo três horas	55
Tabela 7. Médias dos valores de peroxidação lipídica espermática ao tempo zero horas	56
Tabela 8. Médias dos valores de peroxidação lipídica espermática ao tempo três horas	56
Tabela 9. Médias dos valores de potencial de membrana mitocondrial ao tempo zero horas	58
Tabela 10. Médias dos valores de potencial de membrana mitocondrial ao tempo três horas	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Equipamento utilizado para medição de parâmetros através do CASA	47
Figura 2. Citômetro de fluxo	48
Figura 3. Espermatozóides de equino corados com YO-PRO-1 e Homodimero de etidio-1	49
Figura 4. Citograma de amostra controlo corada com M540 e SYTOX Green	49
Figura 5. Espermatozóides de equino corados com a sonda JC-1	50
Figura 6. Citograma de espermatozóides corados com a sonda JC-1 e respectiva imagem de microscopia confocal	50
Figura 7. Citograma de amostra controlo corada com YO-PRO-1 e Homodimero de etidio-1, ao tempo três horas	54
Figura 8. Citograma de amostra incubada com 1 $\mu$ M de melatonina, corada com YO-PRO-1 e Homodimero de etidio-1, ao tempo três horas	54
Figura 9. Citograma de amostra controlo corada com M540 e SYTOX Green, às três horas	56
Figura 10. Citograma de amostra incubada com 50pM de melatonina, corada com M540 e SYTOX Green, às três horas	56
Figura 11. Citograma de amostra controlo corada com C11-BODIPY <sup>581/591</sup> , ao tempo três horas	57
Figura 12. Citograma de amostra incubada com 1 $\mu$ M de melatonina, corada com C11-BODIPY <sup>581/591</sup> , ao tempo três horas	57
Figura 13. Espermatozóides provenientes de uma amostra controlo corada com C11-BODIPY <sup>581/591</sup> , ao tempo três horas	58
Figura 14. Espermatozóides provenientes de uma amostra incubada com 1 $\mu$ M de melatonina, corada com C11-BODIPY <sup>581/591</sup> , ao tempo três horas	58
Figura 15. Citograma de amostra controlo corada com JC-1, ao tempo três horas	59
Figura 16. Citograma de amostra incubada com 1 $\mu$ M de melatonina, corada com JC-1, ao tempo três horas	60

## **Relatório de actividades desenvolvidas durante o estágio curricular**

O estágio curricular foi realizado na Universidade de Extremadura, na Faculdade de Veterinária, Avenida de la Universidad s.n. Campus Universitario 10071- Cáceres, de 15 de Janeiro a 31 de Junho de 2010.

Neste período de estágio, o tempo foi repartido entre uma actividade de pesquisa e trabalho laboratorial, na área da reprodução equina, concretamente no âmbito da tecnologia da citometria de fluxo e análise seminal computadorizada, aplicável em vários projectos actualmente decorrentes na Universidade, e pelo desenvolver de práticas em clínica de reprodução, nomeadamente assistindo às actividades desenvolvidas no centro de reprodução da Universidade.

De 15 de Março a 7 de Junho de 2010 decorreu na Faculdade a *Parada de Sementales*, estação reprodutiva de equinos em que, através de uma associação com o Exército Espanhol se estabularam 12 garanhões na Universidade, trabalhados diariamente e utilizados para recolha, processamento e envio de sémen. Durante o mesmo período, também se aceitavam nas instalações da Faculdade éguas de proprietários privados que desejavam inseminá-las com sémen dos referidos garanhões. Esta associação entre Militares, médicos veterinários e criadores é muito vantajosa em termos de ensino, e não só, pelo que permite um envolvimento e aprendizagem constante durante este período por parte dos alunos.

Durante o meu estágio desenvolvi assim actividades de clínica de reprodução, nomeadamente o seguimento do ciclo éstrico, com todas as actividades que envolvem este processo: ecografias seriadas para detecção do crescimento folicular, assim como o estado do útero, citologias, culturas e lavagens uterinas, recolha de sémen aos garanhões, processamento das doses e posterior inseminação, diagnóstico de gestação e ainda a realização de ecografias testiculares. Durante o período de estágio surgiram também casos de patologias reprodutivas como endometrites recorrentes por má conformação, um tumor das células da granulosa, hérnia abdominal em égua em estado avançado de gestação, hérnia escrotal de um dos garanhões utilizados, implicando o seguimento destes casos. Tive ainda oportunidade de realizar procedimentos como a congelação de sémen, inseminação de éguas com sémen criopreservado e sincronização de éguas com posterior lavagem para recolha de embrião.

Quanto ao projecto de investigação realizado, esteve inserido no trabalho realizado pela equipa do departamento de reprodução da Faculdade, que tem como objectivo o

aperfeiçoamento das técnicas de reprodução assistida. Um dos objectivos desta equipa num futuro próximo é a sexagem de espermatozóides de equino, sendo para isso necessária a obtenção de um meio perfeitamente adequado à manutenção e congelação destas células, ultrapassando a barreira espacial e temporal entre macho e fêmea. O projecto realizado integra-se assim neste estudo contínuo e progressivo.

Aparte do estágio curricular, no primeiro semestre do ano lectivo 2009/2010 realizei também um estágio complementar na Clínica veterinária das Laranjeiras, de Setembro a Janeiro de 2009, nas áreas de medicina interna e cirurgia de pequenos animais. Durante o mesmo período, também tive oportunidade de acompanhar a médica veterinária Carolina Monteiro da empresa ECOVet, na prática da sua actividade.

## **1. Introdução**

Os gametas masculinos consistem num tipo de células com extrema importância biológica, dotados de processos metabólicos de elevada complexidade. Partindo deste pressuposto, neste trabalho procedeu-se ao estudo de alguns destes processos, nomeadamente os que afectam a sua integridade e organização membranar, assim como o seu metabolismo mitocondrial.

Dado que a reprodução assistida da espécie equina é uma área com um crescente desenvolvimento e aplicabilidade comercial, é do maior interesse desenvolver técnicas que permitam a protecção e consequente aumento da durabilidade dos espermatozóides.

O stress oxidativo, determinado pelo balanço entre a geração e degradação de espécies reactivas de oxigénio num dado tecido, surge como um dos maiores inimigos da célula espermática: a concentração excessiva de oxigénio incrementa a produção destes compostos, nefastos para a viabilidade celular (Baumber, Ball, Gravance, Medina, & Davies-Morel, 2000).

Apesar de tanto os espermatozóides como o plasma seminal possuírem enzimas e antioxidantes de baixa massa molecular como as vitaminas E e C, urato, albumina, taurina e hipotaurina (Smith, Vantman, Ponce, Escobar, & Lissi, 1996), responsáveis pela acção antioxidante e quelante destes radicais, esta acção muitas vezes não é suficiente para a devida protecção celular.

Vários estudos indicam que os espermatozóides produzem maiores quantidades de espécies reactivas de oxigénio, em resposta a ciclos repetidos de centrifugação ou inclusivé à criopreservação efectuada em técnicas convencionais de reprodução assistida (Agarwal, Saleh, & Bedaiwy, 2003). É por isso de grande interesse o desenvolvimento de protocolos com antioxidantes para que se possam proteger os gametas masculinos da oxidação e da apoptose durante estas manipulações.

A confirmação da melatonina como antioxidante de vários tecidos, assim como a descoberta desta hormona no plasma seminal (Casao, et al., 2010) e dos seus receptores na membrana espermática (Fujinoki, 2008), ainda que em espécies diferentes, surgiu como fundamento para este trabalho.

Sendo assim, colocou-se a hipótese de testar a influência que diversas concentrações de melatonina pudessem exercer em vários parâmetros relacionados com a viabilidade e consequente fertilidade do espermatozóide equino. Neste trabalho avaliou-se a motilidade e viabilidade espermática, assim como a desorganização lipídica membranar, o estado de peroxidação lipídica e o potencial de membrana mitocondrial, através da utilização de

diversas sondas fluorescentes específicas para a avaliação de cada característica.

## **2. Espermatogénese e endocrinologia**

A espermatogénese ocorre no epitélio seminífero, localizado no parênquima testicular, onde as espermatogónias se diferenciam em espermatócitos e espermatídeos. Os tubos seminíferos consistem numa camada mióide celular que rodeia a lâmina basal, que por sua vez circunda um complexo de células somáticas (células de Sertoli e de Leydig) e germinativas.

As células de Sertoli têm um papel estrutural e nutritivo, na medida em que suportam e separam através de complexos juncionais as gerações sucessivas de células germinativas, e também um papel fisiológico, pela sua função endócrina. A formação de espermatozóides dá-se no lúmen tubular, aquando da libertação dos espermatídeos pelas células de Sertoli para a porção sinuosa do tubo seminífero, e posterior ascensão para a parte recta do tubo, canalículos eferentes e cabeça do epidídimo.

As células de Leydig compõem o interstício, sendo a sua principal função a secreção hormonal de testosterona.

A espermatogénese consiste em três fases de desenvolvimento, que se prolongam por 57-58 dias em equino:

- Espermatocitogénese, consistindo em divisões mitóticas durante aproximadamente 19 dias. A espermatogónia começa todo este processo, originando os espermatócitos e repondo também a população inicial. Cada geração encontra-se conectada através de pontes intercitoplasmáticas, que permitem a coordenação do processo.
- Meiose dos espermatócitos, durante 19 dias. Esta origina os espermatócitos secundários que depois de sujeitos a uma diferenciação morfológica se denominam espermatídeos. As células passam assim de uma forma esférica inicial a um formato alongado, de núcleo condensado e providas de axonema, à medida que simultaneamente se orientam em direcção ao lúmen tubular.
- Espermiogénese, constituída pela maturação e diferenciação de espermatídeos num período de 18 dias. Culmina com a espermição, ou seja, a libertação sincronizada no lúmen tubular, em intervalos de 12 dias, e que é coincidente com o início de uma nova espermatocitogénese (Meyers, 2009).

Todo este processo se pode confirmar por cortes histológicos de tubos seminíferos de equino que demonstram a presença de oito diferentes estádios celulares da espermatogénese,

consistindo o ciclo do epitélio seminífero.

Estão descritas variações sazonais e etárias na produção de cada um dos tipos celulares, assim como alterações ao nível das células de Leydig e de Sertoli que influem sobre a produção diária de espermatozóides (*Daily Sperm Output*- DSO). A eficiência espermática está relacionada com o volume de parênquima testicular e a consequente DSO estimada, dado que em ganhões um grama de parênquima é equivalente à produção de  $18-20 \times 10^6$  espermatozóides. Este valor é de salientar na determinação de causas de subfertilidade, através da comparação de DSO estimada e real, ou seja, a quantidade de espermatozóides presentes num ejaculado (Amann, 1993).

Após libertação no lúmen tubular, os espermatozóides são transportados passivamente para a *rete testis*, através de ambas as pontas dos tubos seminíferos. Esta é uma área extensivamente ramificada e localizada no centro do parênquima, sendo cada ramo constituído por 10-20 túbulos eferentes progressivamente entrançados que se fundem com o ducto epididimário, na cabeça do epidídimo (Meyers, 2009).

O epidídimo é composto por cabeça, corpo e cauda, onde ocorre o armazenamento de espermatozóides. Ao longo do seu trajecto, ocorre uma maturação adicional, por modificação do conteúdo proteico e lipídico, evidenciada pelo facto de que os espermatozóides localizados na cabeça são inférteis e pouco móveis. Na cabeça, ocorre uma reabsorção dos fluidos da *rete testis* e substituição pelas secreções epididimárias. O trajecto em direcção à cauda do epidídimo efectua-se principalmente através da actividade ciliar luminal e contracção do músculo liso da parede epididimária, ocorrendo em simultâneo alterações ao nível dos fosfolípidos de membrana, proteínas e hidratos de carbono. O percurso do espermatozóide pelo epidídimo demora cerca de 11 dias, embora este período possa ser encurtado pelo aumento da frequência de ejaculações. A cauda do epidídimo é o local de armazenamento da maioria dos espermatozóides (cerca de 61%) e encontra-se abundantemente inervada por fibras do Sistema Nervoso Simpático (Meyers, 2009). Quando se dá uma ejaculação os espermatozóides entram no ducto deferente, onde são encaminhados para a uretra pélvica e peniana através de contracções de músculo liso (Chenier, 2009).

### **3. Espermatozóide**

O espermatozóide é uma célula constituída por cabeça e cauda (colo, peça intermédia, principal e terminal). O pescoço consiste na junção altamente especializada entre o bordo posterior da cabeça e a peça intermédia da cauda. Em equino, as cabeças têm um formato

achatado, em forma de raquete, com dimensões aproximadas de 60-65  $\mu\text{m}$  de comprimento total, 6-7  $\mu\text{m}$  comprimento de cabeça, 10  $\mu\text{m}$  parte média, 40  $\mu\text{m}$  parte principal e 4-5  $\mu\text{m}$  parte final (Meyers, 2009). Quanto à largura, a cabeça possui aproximadamente 3.5-4  $\mu\text{m}$  no segmento equatorial do acrossoma, a parte mais larga da célula, que contém também o núcleo (Amann & Graham, 1993).

Podemos subdividir o espermatozóide em membrana plasmática, acrossoma, núcleo e flagelo, onde se inclui uma camada mitocondrial.

A membrana plasmática cobre totalmente toda a célula e consiste numa bicamada fosfolipídica com incorporação de moléculas de colesterol (estabilizador de membrana), carboidratos complexos e proteínas associadas a lípidos ou ao glicocálice. Certas proteínas transmembranares auxiliam na formação de canais iónicos, poros, receptores ou componentes de transdução de sinal, constituindo no seu total cerca de 50% do peso molecular da membrana. A membrana plasmática encontra-se ancorada às estruturas subjacentes na região do acrossoma espermático, lâmina pós acrossómica e região do pescoço. Na cabeça do espermatozóide a membrana encontra-se dividida em duas regiões, a acrossómica, incluindo o anel celular periférico e a maior parte do acrossoma, e pós acrossómica ou segmento equatorial, onde se inicia a fusão entre o espermatozóide e a zona pelúcida. Ambas as zonas constituem a cápsula acrossómica. A composição membranar em termos de lípidos, proteínas e carboidratos é variável entre a cabeça e cauda do espermatozóide (Meyers, 2009).

Quanto ao acrossoma, esta estrutura tem origem no Complexo de Golgi da espermátide e consiste numa matriz proteica onde se encontram diversas enzimas hidrolíticas e glicolíticas, que actuam na penetração da zona pelúcida e consequente fertilização. Embora ainda não confirmado em garanhão, em outras espécies encontram-se descritas a proacrosina-acrosina, hialuronidase,  $\beta$ -galactosidase, proteinases, neuraminidases, esterases, arilsulfatase, fosfolipases A e C, assim como numerosas fosfatases. Localiza-se na região anterior da cabeça entre a membrana plasmática e o envelope nuclear, possuindo duas membranas distintas (interna e externa) em contacto com cada uma das referidas estruturas. Durante a exocitose do acrossoma, ou seja, a reacção acrossómica, ocorre a fusão da membrana externa com a membrana plasmática, permitindo a actuação das enzimas sobre a zona pelúcida (Meyers, 2009).

O núcleo é constituído por DNA altamente condensado e íntimamente associado com proteínas nucleares denominadas protaminas. Estas consistem em proteínas de baixo peso molecular (27-65 aminoácidos), de pH básico e ricas em arginina e cisteína, e formam

complexos com o ADN estabilizados por pontes disulfúricas. Estas propriedades contribuem para a resistência verificada dos espermatozóides à desnaturação ácida, e constitui a base da análise dos mesmos por citometria de fluxo (espermatozóides de garanhões inférteis ou subférteis não são resistentes à desnaturação, criando um padrão específico de fluorescência). Por fim, o flagelo consiste na cauda do espermatozóide e compreende quatro regiões, sendo elas o colo, peça intermédia, principal e terminal. A sua função é prover o espermatozóide de motilidade que lhe permite ascender através do tracto reprodutivo feminino e alcançar a ampola do oviducto, onde se dá a fecundação. O pescoço inclui o capítulo e as colunas segmentares. O capítulo é o limite cranial do flagelo na fossa de implantação, zona de ligação com a cabeça, composto por proteínas ricas em pontes disulfato. A fossa de implantação pode sofrer um desvio abaxial, causando um desvio da cauda e um conseqüente movimento circular ou semi-circular, que até certo nível é aceitável. As colunas segmentares, por sua vez, são a origem das nove fibras densas que conferem rigidez e resistência ao flagelo. As fibras rodeiam o axonema central, composto por nove pares de microtúbulos circundando um par central, o que resulta numa disposição  $9 + 9 + 2$ . O axonema encontra-se rodeado por uma camada de mitocôndrias envolvidas na produção energética, na peça intermédia, que é substituída por uma camada de tecido fibroso, na peça principal. A disposição microtubular mantém-se apenas em metade da peça terminal. Esta arquitectura permite o movimento ondulatório do espermatozóide, através da contracção sequencial de cada um dos pares (Meyers, 2009).

A espermatogénese está dependente de um correcto funcionamento do eixo hipotálamo-pituitário-testicular, envolvendo a secreção pulsátil de GnRH pelo hipotálamo, cuja acção causa a libertação também pulsátil de gonadotrofinas pela pituitária anterior, as hormonas Luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), através de uma modulação endócrina-parácrina-autócrina, que por sua vez actuam sobre as células testiculares. A GnRH tem assim efeito ao nível da pituitária anterior, regulando a libertação de LH e FSH. No caso da LH, a sua actuação ocorre ao nível das células de Leydig, causando a produção de testosterona e estrogéneos. A FSH exerce a sua função nas células de Sertoli, provocando a libertação de estrogéneos, inhibina, activina, proteína ligante de androgéneos (ABP), transferrina, factor de crescimento insulínico-1 (IGF-1) e outros factores necessários à espermatogénese (Roser, 2009).

Toda esta dinâmica é regulada tanto por opióides cerebrais como pela glândula pineal, dado que esta procede à secreção de melatonina que por sua vez actua negativamente sobre a

GnRH, durante a época de reprodução. A produção de melatonina depende do fotoperíodo, ou seja, o aumento de número de horas diárias de luminosidade é detectado pelas células ganglionares da retina, que contêm o fotopigmento melanopsina (Berson, Dunn, & Takao, 2002). Este estímulo é transmitido pelo nervo óptico ao núcleo supraquiasmático (SCN), causando uma inibição da glândula pineal (em equino) e da secreção de melatonina, o que favorece a secreção de GnRH pelo hipotálamo. A sua actuação não se dá directamente sobre os neurónios GnRH, mas sobre os neurónios dopaminérgicos, serotoninérgicos e aminoacidológicos, que actuam sobre os primeiros. A sazonalidade e a diminuição de número de horas diárias de luz inferem assim positivamente sobre a produção de melatonina, inibindo a secreção de GnRH e consequentemente as gonadotrofinas esteróides e a actividade testicular (Roser, 2009).

O hipotálamo produz ainda a hormona estimulante da hormona do crescimento (GHRH) e dopamina, provocando respectivamente a libertação de hormona de crescimento (GH), e regulando negativamente a libertação de prolactina, ambas ao nível da pituitária anterior. A prolactina está também relacionada com a função testicular em vários mamíferos, embora em equinos esta propriedade ainda não esteja comprovada (Roser, 2009).

As hormonas produzidas pelo testículo exercem um efeito de feedback no hipotálamo e pituitária, através da circulação periférica, regulando a produção de GnRH, LH e FSH. Um aumento de testosterona circulante tem um efeito de feedback negativo sobre a produção de GnRH, embora não tenha qualquer efeito directo sobre a libertação de LH na pituitária. Quanto aos estrogénos, particularmente o estradiol  $17\beta$ , regulam a libertação de LH modulada pela GnRH. Não está todavia clarificado o efeito directo de ambas as hormonas sobre a FSH. Quanto à inibina, esta hormona inibe especificamente a libertação de FSH pela pituitária, enquanto que a activina actua na maioria das espécies como estimulante desta hormona (não comprovado em equinos) (Roser, 2009).

Sendo assim, os equinos são considerados uma “espécie de reprodução nos dias longos” dado que a sua capacidade reprodutiva se maximiza nas estações de horas crescentes de luminosidade. Ocorre então um aumento no peso e volume testicular, na Primavera e Verão, que se repercute num aumento da produção de espermatozóides (DSO), líbido e concentrações plasmáticas hormonais de LH, FSH, testosterona, estrogénos, inibina e prolactina. Todas estas alterações parecem ter como causa a diminuição foto-induzida de melatonina pela glândula pineal, permitindo um aumento considerável na produção hipotalâmica de GnRH e consequentemente de gonadotrofinas e hormonas sexuais (Roser,

2009).

No caso das fêmeas, também se exerce uma regulação pelo eixo hipotálamo-pituitário-gonadal, contudo, não está todavia esclarecida a razão pela qual 75% das éguas param completamente a produção hormonal, enquanto que os garanhões têm a capacidade de manter a função reprodutiva, embora com menor número de espermatozóides por ejaculado. Está ainda demonstrada a actuação de neuromoduladores opióides sobre a GnRH, e de dopaminérgicos sobre a libertação de prolactina. Quanto aos efeitos da melatonina, está demonstrado (Cleaver, et al., 1991) que a exposição de éguas a um fotoperíodo constante resulta numa diminuição da concentração circulante de melatonina e um conseqüente aumento no conteúdo hipotalâmico de GnRH, enquanto que nos garanhões a administração de melatonina exógena causa uma diminuição de hormonas testiculares. É assim claro o efeito directo negativo da quantidade de melatonina circulante sobre as hormonas sexuais (Roser, 2009).

#### **4. Fisiologia seminal**

É necessário que o espermatozóide passe por um processo de capacitação para que adquira a capacidade de fertilização, nomeadamente para a ligação à zona pelúcida, penetração no *cúmulus*, reacção acrosómica e fusão com o oócito (Meyers, 2009). A capacitação consiste no conjunto de transformações fisiológicas que sofre um espermatozóide, conferindo-lhe a capacidade de realizar a reacção acrossómica e adquirir o movimento hiperactivo (Meinecke, et al., 2002). A capacitação ocorre naturalmente aquando da passagem pelo tracto genital feminino, embora possa ser provocada *in vitro*. Quimicamente, ocorre um aumento nos iões cálcio, bicarbonato e peróxido de hidrogénio intracelulares, cuja presença activa a produção de AMP cíclico pela adenil ciclase. O AMPc (Adenosina Monofosfato cíclico), por sua vez, activa a proteína cinase A, que desencadeia a fosforilação de membranas e diversas proteínas citosólicas. Ocorre também uma remoção de componentes do plasma seminal que revestem externamente o espermatozóide (os factores descapacitantes) (Meinecke, et al., 2002).

Este evento inclui ainda várias etapas como a diminuição do pH intracelular, perda do colesterol de membrana, alterações no conteúdo membranar de fosfolípidos e exposição dos receptores de progesterona membranares, associadas à remoção de proteínas aderentes do plasma seminal e rearranjo fosfolipídico membranar. O colesterol tem um papel regulador na orientação, fluidez e espessura dos lípidos de membrana, impedindo a fusão de membranas. A passagem pelo tracto genital feminino coloca o espermatozóide em contacto com albumina e

lipoproteínas de alta densidade que removem o colesterol e fluidificam a membrana, facilitando a fusão. Está demonstrada *in vitro* uma interacção do espermatozóide com o epitélio do oviducto, que consiste num bloqueio em termos de mobilidade, viabilidade e regulação de cálcio intracelular, prevenindo uma capacitação prematura e a exocitose acrossómica. Este abrandamento metabólico tem como efeito um armazenamento dos espermatozoides no oviducto, o que é coerente com o estro prolongado em éguas, a possibilidade de fecundação com inseminações seis dias pré ovulação e portanto uma espera dos espermatozoides pela descida do ócito (Meyers, 2009).

A consequência mais importante da capacitação parece ser a destabilização da membrana espermática e preparação para ligação à zona pelúcida e reacção acrossómica. A ligação à zona pelúcida desencadeia então um influxo de cálcio que permite a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossómica externa em diversos locais, causando a libertação de vesículas enzimáticas que digerem a zona pelúcida. A membrana acrossómica interna fica assim exposta, permitindo a fusão com a membrana plasmática do ócito e a penetração do núcleo, desencadeando um bloqueio à polispermia. Ocorre uma variação na composição lipídica da membrana existente entre as várias espécies, possuindo o equino uma elevada quantidade de colesterol, quando comparado por exemplo com o suíno (Gadella, Rathi, Brouwers, Stout, & Colenbrander, 2001), o que parece estar inversamente relacionado com a velocidade de capacitação. A albumina, o cálcio e o ião bicarbonato são essenciais no processo de capacitação, actuando o primeiro na remoção do colesterol, o segundo na sinalização intracelular e o último na estimulação da adenilato ciclase para o aumento do AMP cíclico. O estímulo destes componentes essenciais leva a um aumento da fosforilação proteica durante a capacitação (Zhu, et al., 2005).

A hiperactivação consiste num movimento especializado do flagelo (curvatura ampla, movimento de chicote e movimentos flagelares frenéticos) adquirido pelos espermatozoides à medida que progridem através do oviducto, criando uma força propulsora para a penetração da zona pelúcida (Suarez & Ho, 2003). O papel fisiológico da hiperactivação está provavelmente associado a uma regulação do transporte do espermatozóide (Verstegen, Iguer-Ouada, & Onclin, 2002), correlacionando-se ainda com a fertilidade de um ejaculado, pelo que está descrita uma menor fertilização de populações que tenham sofrido uma hiperactivação prematura em longas incubações *in vitro*. A hiperactivação espermática ocorre espontâneamente em espermatozoides incubados sob condições capacitantes, em meios com bicarbonato (Neill & Olds-Clarke, 1987) e cálcio (Christensen, Whitfield, & Parkinson,

1996), provavelmente pela activação da adenilato ciclase, influxo de cálcio e elevação da concentração intracelular de AMP cíclico. Contudo, no trabalho de (Rathi, Colenbrander, Bevers, & Gadella, 2001), foi constatado que os valores de hiperactivação estão pouco correlacionados com os de capacitação espermática, ocorrendo uma subvalorização desta.

Quanto à reacção acrossómica em si, tem lugar perto da zona pelúcida, apenas após completa a capacitação. Pode ser induzida *in vitro* pela adição de vários factores como proteínas da zona pelúcida, ionóforos de cálcio, glicosaminoglicanos e progesterona, e tem como resultado a agregação de receptores espermáticos, seguida de uma cascata de transdução de sinal. A reacção do acrossoma é uma exocitose modificada do acrossoma, um organelo secretor granular localizado na cabeça do espermatozóide, sobreposto à membrana plasmática. Esta reacção é necessária para a penetração da zona pelúcida, o envelope glicoproteico protector do oócito, e para a fusão entre as membranas plasmáticas do espermatozóide e do oócito (Fujinoki, 2008). O receptor membranar da zona pelúcida é específico para cada espécie, e estimula também a fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossómica externa e vesiculação, conduzindo à exposição do conteúdo acrossómico, ou seja, expulsão das enzimas pela cabeça do espermatozóide. À medida que a reacção progride e o espermatozóide passa através da zona pelúcida, componentes da membrana plasmática e conteúdo acrossómico são perdidos. Os espermatozóides que sofrem uma reacção acrossómica prematura são por isso incapazes de fertilizar (Fujinoki, 2008).

## **5. Avaliação seminal**

A avaliação da fertilidade do macho consiste num parâmetro importante da tecnologia reprodutiva, dado que um indivíduo seleccionado é normalmente responsável por um elevado número de fecundações e pelo sucesso de um programa de reprodução. Sendo assim, apesar de serem as fêmeas as que conferem um maior contributo a cada ciclo reprodutivo, é na fertilidade masculina que se concentra um maior número de análises. Infelizmente, uma avaliação adequada requer um grande número de fêmeas normais, e é necessariamente retrospectivo (apesar de idealmente este ser um estudo predictivo).

Um exame físico adequado apenas identifica ganhões que claramente não têm capacidade de fertilização adequada, sendo insuficiente para determinação precisa do nível de fertilidade e falhando assim na identificação de ganhões subfertilis.

No caso dos equinos, a selecção genética de indivíduos associada com a selecção espermática não possui um grau de desenvolvimento como por exemplo no caso dos bovinos, pelo que

este tipo de análise assume uma importância ainda maior.

Esta avaliação pode incluir a medição e determinação da consistência testicular, biópsia, ultrasonografia ou termografia, efectuadas durante a época reprodutiva, assim como a avaliação subjectiva do epidídimo, que apenas é estimada pelo aparecimento de alterações no sémen, tais como as gotas protoplasmáticas.

Quanto às glândulas sexuais acessórias, a importância das suas secreções reside na sua função protectora e nutritiva dos espermatozóides, pela adição de proteínas e inibidores enzimáticos à superfície celular, de modo a aumentar a espessura da capa proteica e proteger os espermatozóides no tracto genital feminino (factores de descapacitação) (Meinecke, et al., 2002). O papel fisiológico do plasma seminal continua a ser um tema sobre investigação, estando contudo comprovadas as diferenças de composição entre espécies, assim como influência ambiental (Kareskoski & Katila, 2008).

Os testes de qualidade seminal são os mais importantes, tendo já sido os valores de motilidade, morfologia e metabolismo correlacionados com a fertilidade (Foote, 2003), apesar de também se poderem efectuar outras provas funcionais como o teste hipo-osmótico e a exposição a receptores de progesterona.

A eficiência reprodutiva dos cavalos, regra geral, está entre os 40-80% (van Buiten, Remmen, & Colenbrander, 1998), significativamente abaixo dos bovinos. A subfertilidade ocorre em aproximadamente 11% de todos os garanhões e a criopreservação, método frequentemente utilizado no manejo reprodutivo, reduz todavia mais a fertilidade dos espermatozóides. A estas dificuldades adiciona-se ainda a sincronia necessária entre machos e fêmeas, e a eficiência variável de técnicas de Inseminação Artificial. O maior obstáculo consiste na grande variação entre ejaculados de diferentes garanhões e inclusivé de vários ejaculados provenientes do mesmo indivíduo, nomeadamente ao nível de concentração, volume, motilidade, quantidade de espermatozóides vivos totais e morfológicamente normais, factores que influem na fertilidade da amostra. Diversos métodos são utilizados para uma melhor e mais adequada avaliação da qualidade de um ejaculado tais como a microscopia de fluorescência confocal, o uso de anticorpos fluorescentes, os ensaios de penetração da zona pelúcida, o uso de programas informáticos (CASA) associados a microscopia electrónica, permitindo a detecção de varios tipos de motilidade e ainda a citometria de fluxo (Merkies, Chenier, Plante, & Buhr, 2000). A citometria de fluxo consiste num método cada vez mais utilizado, pela correlação com parâmetros de fertilidade (Gillan, Evans, & Maxwell, 2005), assim como pela sua objectividade, repetibilidade, precisão, rapidez e baixo custo (Graham,

2001). Em acréscimo, existem cada vez mais sondas disponíveis para determinação de várias características, consistindo numa técnica cada vez mais promissora e fidedigna para a determinação da fertilidade do semental. Isto porque, como descrito por (Gillan, et al., 2005), a fertilidade parece resultar não apenas de um mas do conjunto de vários parâmetros espermáticos, pelo que esta avaliação tenderá a recair sobre o maior número possível de factores.

O objectivo da avaliação seminal é a determinação da fertilidade de ejaculados provenientes de determinado garanhão, através de parâmetros qualitativos e quantitativos, para posterior preparação de doses de sémen fresco, refrigerado ou congelado. Apesar da evolução de técnicas, a observação macroscópica, determinação de volume e concentração, avaliação da motilidade e morfologia continuam a ser as técnicas mais utilizadas para determinação de qualidade seminal (Sieme, 2009).

O volume de ejaculado está dependente de variantes como a raça, idade e ambiente, sendo neste caso relevante a alimentação e manutenção, excitação prévia, estado físico, método e frequência da recolha de sémen e sazonalidade. Depende também amplamente das secreções produzidas pelas glândulas acessórias (glândulas bulbo-uretrais, próstata, glândulas vesiculares e ampolas), podendo efectuar-se uma separação em três porções, a pré ejaculatória, secretada pelas glândulas bulbo-uretrais; a segunda e principal fracção rica em espermatozóides; e o gel, secretado maioritariamente pelas glândulas vesiculares. Na totalidade, pode obter-se um volume de 60-120 ml, com uns 30-100 ml de fracção isenta de gel. Uma redução no volume de ejaculado pode ser resultante de uma síndrome de falha ejaculatória ou obstrução do ducto deferente (Sieme, 2009). Uma correcta avaliação do volume seminal, assim como da concentração são pré-requisitos fundamentais para o cálculo de quantidade total de espermatozóides, assim como a determinação do número de doses de inseminação artificial possíveis.

A avaliação macroscópica depende da densidade do ejaculado e deve focalizar-se sobre a concentração plasmática, composição do plasma seminal, e presença de elementos fisiológicos como células epiteliais e patológicos como sangue ou urina. As características seminais incluem fluidez, consistência, cor e odor (Sieme, 2009).

A concentração representa o número de espermatozóides por unidade volumétrica, sendo esta normalmente dada em milhões de espermatozóides por mililitro. A concentração pode ser medida através de um espectrofotómetro, por contagem em microscópio com uma câmara de Burker, ou ainda pelo programa CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). O uso da

citometria de fluxo por coloração com um corante fluorescente é outra das possibilidades para medição da concentração de espermatozóides, de forma precisa. Contudo, devido ao seu elevado custo não é utilizada por rotina para este efeito.

Recentemente, surgiu um outro dispositivo (NucleoCounter SP-100) cuja utilização permite detectar apenas o número de espermatozóides vivos, por aplicação do corante *Propidium Iodide* (penetra apenas no núcleo das células mortas) (Sieme, 2009).

A determinação da concentração é muito importante porque permite calcular o número de doses a realizar por cada ejaculado, como referido anteriormente. A fertilidade aumenta com a concentração, apesar de a partir de certo limiar já não se verificarem melhorias significativas. O número médio de espermatozóides por mililitro é de cerca de 250 milhões, podendo atingir os 400-1.200 milhões na fracção rica do ejaculado. Estes valores apresentam variações em função de diversos factores como a idade, raça, estação do ano ou frequência da colheita (Sieme, 2009).

O método utilizado neste trabalho para determinação da concentração foi o espectrofotómetro. O aparelho utilizado (*SpermaCue*) mede, em percentagem, a quantidade de radiação capaz de atravessar (transmitância) ou que fica retida (absorvância) numa amostra, ao incidir um feixe de luz sobre esta. É um método que permite uma medição objectiva e exacta, por comparação do valor obtido com uma recta padrão realizada com diluições de amostras de espermatozóides da referida espécie, com concentração conhecida. Os resultados apresentam uma grande correlação com a contagem directa em câmara, sendo este um método mais rápido e com menor coeficiente de variação. Tem como desvantagem a ocorrência de heterogeneidade óptica decorrente da aglutinação espermática ou precipitação de proteínas plasmáticas, dificultando a contagem celular. A adição de diluentes é outro dos factores que impede a correcta detecção dos espermatozóides, pela opacidade da amostra, o que impossibilita o uso do referido instrumento (Sieme, 2009). Este método quantifica assim o número de espermatozóides existentes (vivos e mortos).

A motilidade espermática é o parâmetro mais frequentemente utilizado para medir a qualidade de um ejaculado, dado que se correlaciona com a viabilidade e integridade estrutural do espermatozóide (Verstegen, et al., 2002), e conseqüentemente com a fertilidade. Contudo, e como referido anteriormente, uma característica sozinha não é suficientemente predictiva da eficiência espermática. Sendo a motilidade excepcionalmente susceptível às condições ambientais, como a temperatura, luminosidade, lubrificantes, desinfectantes, osmolaridade e pH do meio (Varner, 2008), deve efectuar-se um correcto processamento das amostras.

Existem várias técnicas para este tipo de análise, como a determinação da motilidade massal, na qual se avaliam as células espermáticas no seu conjunto, conferindo-se uma classificação subjectiva (0-5) pela colocação de uma gota numa lâmina e observação ao microscópio, e a determinação da motilidade individual ou qualidade do movimento, por microscopia. Esta é a técnica habitualmente utilizada, sendo uma das melhores ferramentas de avaliação de qualidade seminal, na medida em que se determina a percentagem de espermatozóides móveis e a proporção de progressivamente móveis, ou seja, os que intervêm realmente na fecundação (Sieme, 2009). A motilidade deve ser determinada imediatamente após a colheita, colocando preferencialmente 2-5  $\mu\text{l}$  de sémen a uma concentração aproximada de  $50 \times 10^6$  espermatozóides/ml numa lâmina de microscópio de fase de contraste com placa aquecida a  $37^\circ\text{C}$ , com uma ampliação de 150-200x. A motilidade é-nos dada em forma de percentagem, e consiste em movimento oscilatório (circular em volta do eixo, que pode ter origem no aparecimento fisiológico de caudas abaxiais, como explicado anteriormente) e movimento progressivo (em linha recta). Um ganhão normal deve ter uma motilidade progressiva de cerca de 60%, embora também deva ser contabilizada a motilidade oscilatória, dado que estes espermatozóides também podem ter capacidade de fecundação. Os espermatozóides devem ser diluídos antes de proceder a esta análise, dado que em equino há uma grande tendência para aglutinação destes, dificultando a sua avaliação. Contudo, a avaliação visual tem um importante componente de subjectividade, que apenas pode ser controlado pela normalização de procedimentos: incubação da amostra durante 2 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , utilização de uma concentração de  $25-50 \times 10^6$  espermatozóides/ml numa câmara de 10-20  $\mu\text{l}$ , analisando um mínimo de duas gotas e observação de um mínimo de quatro ou cinco campos microscópicos para poder efectuar-se um cálculo do valor médio (Sieme, 2009). Podem encontrar-se também outros tipos de células tais como as epiteliais provenientes da uretra, pénis ou prepúcio, e que são inofensivas; eritrócitos, cuja origem deve ser determinada; e leucócitos, que são indicadores de necessidade de efectuar um exame clínico e microbiológico ao referido ganhão. Podem ainda observar-se células cilíndricas, sem cauda, representativas de estadios indiferenciados da espermatogénese e que ocorrem frequentemente em casos de degeneração testicular (Peña & Rodríguez, 2006).

Para uma análise mais objectiva da motilidade espermática é recomendado e cada vez mais utilizado um programa informático – CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), que permite obter resultados mais fidedignos. Este programa permite a captação de 20 a 30 *frames* sucessivas e análise de 30 a 60 por segundo, processando esta informação em algoritmos e

restituindo a trajectória dos espermatozóides. É assim possível determinar valores como a percentagem de células estáticas, móveis e progressivamente móveis (Verstegen, et al., 2002), e outros como velocidade curvilínea (VCL) que consiste na progressão sequencial ao longo da trajectória real, em  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ; velocidade medida em linha recta (VSL) dada pela trajectória rectilínea por unidade de tempo, em  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ; velocidade média (VAP), valor da trajectória média por unidade de tempo, em  $\mu\text{m}/\text{seg}$ . Podem ainda obter-se diversos coeficientes percentuais: linearidade (LIN), correspondente a  $VSL/VCL$ ; rectidão (STR), correspondente a  $VSL/VAP$ ; WOB (*Wobble*) referente à ondulação; BCF (*Beat Cross Frequency*) que indica a frequência à qual a cabeça cruza a trajectória média do espermatozóide por segundo, medido em Hertz; ALH (*Average Lateral Head*) que representa a média do deslocamento lateral da cabeça ao longo da trajectória curvilínea em  $\mu\text{m}/\text{seg}$ , importantes na avaliação do estado funcional e de hiperactivação do espermatozóide (Peña & Rodríguez, 2006).

Consideram-se os seguintes valores para classificação de um espermatozóide humano como hiperactivado:  $VCL \geq 70 \mu\text{m}/\text{seg}$ ,  $19\% \leq LIN \leq 80\%$ ,  $ALH > 7 \mu\text{m}/\text{seg}$  e  $VSL \leq 30 \mu\text{m}/\text{seg}$  (Green & Fishel, 1999). Em equinos, podem ser considerados os valores de  $VCL \geq 180 \mu\text{m}/\text{seg}$  e  $ALH \geq 12 \mu\text{m}$  (Rathi, et al., 2001).

Cada sistema CASA necessita normalização e validação através de calibração e acertos técnicos (taxa de *frames*, acertos de luz, reconhecimento das cabeças pela forma e luminosidade, detecção da cauda, reconhecimento de partículas imóveis), para maior precisão e repetibilidade. Contudo, ainda não foi implementada uma normalização internacional, pelo que não se podem comparar resultados provenientes de diferentes laboratórios. Surge assim uma necessidade urgente de fixação destes parâmetros (Sieme, 2009).

As variáveis que influem nos valores obtidos são: a frequência de aquisição de imagem, o intervalo de medição, o algoritmo utilizado, o número de células analisadas, o tipo/profundidade da câmara utilizada, o software, a óptica e a magnificação (Peña & Rodríguez, 2006). As características do ejaculado e o tipo de diluidor utilizado são também importantes, dado que influem no aparecimento de aglutinações espermáticas e aparecimento de partículas estranhas como de gema de ovo, que impedem um correcto funcionamento da máquina.

Quanto à motilidade pós descongelação, (Vidament, et al., 2000) consideram que um ejaculado aceitável deverá ter mais de 35% de espermatozoides com motilidade a uma velocidade elevada, neste caso acima de 30-40  $\mu\text{m}/\text{seg}$ .

Antigamente, a análise microscópica a que submetiam os espermatozóides era subjectiva,

ocorrendo variações nos valores obtidos. Para ultrapassar este defeito foram propostos outros métodos como a turbidimetria, espectroscopia por laser-doppler e métodos fotométricos. Contudo, estas técnicas permitem apenas uma avaliação grosseira da população, enquanto que, no extremo oposto, técnicas como a citometria de fluxo permitem uma avaliação individual mas de apenas um ou dois parâmetros seminais. Assim, o CASA surge como uma técnica vantajosa, permitindo uma análise objectiva de diferentes características: motilidade, velocidade e morfologia.

As desvantagens desta técnica estão relacionadas com o custo do equipamento e a necessidade de validação, controlo de qualidade, calibração e normalização das medições efectuadas. Para além disto, a precisão da análise depende do treino técnico do operador e da optimização do processamento do sémen previamente à análise (Peña & Rodríguez, 2006).

Deve estar determinado o número de campos/amostras analisadas, a temperatura das medições (37°C), o processamento do sémen e a concentração de espermatozóides, idealmente entre 50 e 100 milhões por mililitro.

Através do CASA também se podem determinar parâmetros morfológicos, nomeadamente o tamanho da cabeça do espermatozóide.

Existem vários tipos de corantes que se podem utilizar na determinação da morfologia espermática, sendo a eosina-negrosina mais frequentemente utilizada, pela sua função acrescida de corante vital. A técnica mais utilizada é a visualização por microscopia em fase de contraste, com uma objectiva de 100x. São realizados dois tipos de classificação morfológica: em relação ao local anatómico (cabeça, parte média ou cauda), podendo ocorrer em mais de um local, e em relação à origem do defeito (primário ou de espermatogénese, secundário ou de maturação e terciário ou de processamento), embora esta última possa não ser exacta. A análise morfológica é uma das técnicas mais importantes dado que se obtém uma correlação média-alta com a motilidade, embora possa não exercer efeito sobre a fertilidade (Varner, 2008). Podem ainda classificar-se os defeitos como maiores e menores, sugerindo que os maiores impedem fertilização ou causam morte embrionária precoce, enquanto que os menores apenas impedem o alcance do oócito por alterações na motilidade. Qualquer que seja a classificação, sempre que se detecta mais que um defeito num espermatozóide surge uma suspeita de alteração na espermatogénese e possivelmente um mau prognóstico de fertilidade. Em geral, consideram-se como valores limite para os seguintes defeitos numa população de espermatozóides: mais de 30% de defeitos de cabeça, mais de 25% com gota citoplasmática proximal, mais de 10% de células germinativas prematuras e

menos de 30% de espermatozoides morfológicamente normais (Peña & Rodríguez, 2006).

A morfologia pode ser avaliada em esfregaços húmidos ou secos, sendo a preparação observada em microscópio com interferência de contraste diferencial (DIC) 100x, observando cerca de cem espermatozoides em cada preparação, sendo as anomalias contadas como uma percentagem do número total de espermatozoides (Sieme, 2009).

Podem diferenciar-se as seguintes categorias:

- A. Cabeças anormais – crateras, forma anormal, degenerativa
- B. Defeitos do acrossoma e cabeça dupla
- C. Gotas citoplasmáticas proximais
- D. Gotas citoplasmáticas distais
- E. Peças médias anormais – dobradas, inchadas, enrugadas, espessadas
- F. Caudas anormais – dobrada, enrolada
- G. Células somáticas presentes no plasma seminal

Várias observações confirmam que qualquer ejaculado normal possui várias subpopulações de espermatozoides, decorrentes de variações durante a espermatogénese, assim como um diferente estado de maturação ou idade no epidídimo. Estas subpopulações podem ser evidenciadas por uma diferente resistência à criopreservação ou a fármacos, estando também descritas em análise por citometria de fluxo (Harrison, 1996).

Para além das alterações detectadas nos próprios espermatozoides, a análise morfológica constitui ainda um importante método de detecção de células patogénicas, leucócitos e remanescentes celulares, assim como espermatozoides aglutinados, resultantes da produção de auto-anticorpos espermáticos, doenças auto-imunes e ruptura ou perda de integridade do túbulo seminífero (Veeramachaneni, Moeller, & Sawyer, 2006).

Podem ainda utilizar-se marcadores bioquímicos da fertilidade espermática. Estes compostos são úteis na caracterização enzimática e funcional de domínios subcelulares. Contudo, é necessário distinguir entre os vários locais onde se encontra cada enzima, sendo para isso utilizados marcadores de funções específicas espermáticas. A fosfatase alcalina constitui um marcador bioquímico clássico do plasma seminal de ganhões, sendo o seu alto teor (superior a 15000 UI/L) indicativo de uma secreção testicular e epididimária adequadas (Sieme, 2009).

## **6. Citometria de fluxo**

Recentemente, os fluoróforos surgiram como ferramentas muito úteis na avaliação da qualidade seminal. Estes podem ser detectados por microscopia confocal ou citometria de

fluxo, identificando populações de células vivas e mortas, com diferente funcionabilidade mitocondrial, integridade acrossômica, estado de capacitação, concentração intracelular de cálcio ou conteúdo em ADN/cromatina espermática.

A citometria de fluxo consiste numa técnica que efectua a análise rápida de células individualizadas e organelos por fixação com um marcador fluorescente, formação de um feixe laminar e posterior incidência de um raio laser. As características físico-químicas da amostra são fornecidas através do desvio do feixe, assim como pela intensidade da fluorescência emitida pela sonda. O citómetro é composto por um sistema de injeção, um sistema óptico e um sistema digital de análise de dados. O sistema de injeção procede à recolha da amostra por uma corrente coaxial de solução salina a alta pressão, conduzindo-a até ao canal de fluxo. Produz-se assim um fluxo laminar ao longo do qual se alinha cada espermatozóide e sobre os quais incide individualmente o raio laser, causando dois tipos de sinais: FSC (*Forward scatter*), recolhido por um detector situado cranialmente ao feixe e que informa sobre a dimensão da partícula, e SSC (*Side scatter*), cujo detector se situa a 90° do feixe incidente e informa sobre a complexidade/granulação celular (Peña & Rodríguez, 2006).

Ao corar a amostra com um fluoróforo podem obter-se vários tipos de informação adicional. Estas substâncias têm uma capacidade de absorção de fótons de alta energia provenientes de radiações luminosas do espectro visível ou U.V, com uma consequente redistribuição dos electrões corticais e ocupação de uma órbita mais distante do núcleo. Os electrões, ao regressar posteriormente ao seu estado inicial, emitem energia de um dado comprimento de onda, característica do fluoróforo utilizado e detectada por um receptor específico. Os fluorocromos devem reunir uma série de características, como a excitação por um comprimento de onda compreendido no espectro emitido pelo citómetro, ser estáveis no armazenamento, possuir um máximo de emissão no espectro visível e suficientemente diferente do valor do comprimento de onda de excitação para que possam ser diferenciados.

Em relação a outras técnicas, o citómetro tem como vantagens o fornecimento de informação adicional acerca das características físicas dos espermatozoides, como dimensão e complexidade interna de diversos componentes tanto subcelulares como moleculares, através do uso de diferentes sondas. Na avaliação de sémen descongelado esta técnica representa também uma mais valia, pelo que permite uma obtenção válida de resultados. O uso do citómetro permite uma avaliação objectiva e com elevada repetibilidade em alicuotas de dimensão reduzida (cerca de  $5 \times 10^6$  células), permitindo o uso simultâneo de vários corantes e o estudo paralelo de diferentes compartimentos e funções espermáticas. Outra grande

vantagem consiste na rapidez da amostragem, com uma possibilidade de avaliação de cerca de 5000-10.000 espermatozoides por segundo, o que permite a detecção de diferenças ligeiras entre ejaculados ou a distribuição de subpopulações espermáticas (Peña & Rodríguez, 2006).

Como desvantagem apresenta o elevado custo do equipamento e das análises efectuadas, assim como a necessidade de um técnico devidamente formado no seu manuseamento e a necessidade de uma localização específica estável do aparelho.

O citómetro de fluxo é composto por uma fonte luminosa, normalmente de laser ou mercúrio, uma câmara onde se coloca a amostra, uma célula de fluxo ou bocal, um feixe de camada fluida, um fotodetector ou fotomultiplicador que converte a luz em sinais eléctricos, um sistema processador de sinal que processa os sinais eléctricos de um output análogo, assim como um computador para comandar todas as operações, demonstrar e armazenar os dados, e monitorizar todo o processo (Peña & Rodríguez, 2006).

Toda esta técnica permite obtenção de uma análise populacional rápida e determinação de alterações quantificadas percentualmente. Uma vez corados, os espermatozoides são aspirados de modo a que passem rapidamente através da célula do citómetro, sendo então irradiados com a luz laser e emitindo posteriormente luz que é detectada por lentes/filtros específicos de determinada banda de fluorescência (FL1, FL2, FL3). Qualquer sinal de fluorescência pode ser colhido por tubos fotomultiplicadores, sendo também uma das vantagens da citometria a elevada velocidade de fluxo, situando-se normalmente entre os 200-800/seg. Assim, a citometria de fluxo é um método bastante rápido e sensível para a detecção de alterações subtis numa amostra de milhares de espermatozoides (Peña & Rodríguez, 2006).

### **6.1 Integridade da membrana plasmática e viabilidade**

Para determinação da integridade da membrana plasmática e viabilidade consideram-se três compartimentos distintos na membrana plasmática: a membrana acrossómica externa, a região pós-acrossómica da cabeça e as peças média e principal do espermatozoide. São utilizados corantes clássicos como eosina-nigrosina, eosina-anilina-azul ou fluoróforos para analisar a integridade de membrana, existindo no último caso corantes que identificam espermatozoides viáveis e corantes que localizam células não-viáveis. As sondas com afinidade para o ADN têm como vantagem o facto de não se fixarem a componentes plasmáticos ou do diluidor que não sejam células (Peña & Rodríguez, 2006).

A monitorização de alterações na permeabilidade de membrana pode ser realizada através do corante YO-PRO-1, que consiste numa sonda semi-permeável com afinidade para o ADN, e o

Homodimero de etídeo-1, uma sonda impermeável também com afinidade para o ADN. A excitação de ambas as sondas exerce-se no comprimento de onda de 488 nm, indicando a primeira uma subpopulação correspondente a células com um aumento na permeabilidade de membrana, detectado pelo FL1-verde (emite entre 525 e 620 nm), enquanto que a segunda, detectada em FL3-vermelho (emite num comprimento de onda superior a 620 nm), identifica os espermatozóides mortos, em estado necrótico avançado (Sieme, 2009).

O SYTOX Green é outro dos corantes vitais utilizados que também se fixa apenas a ADN de células com membrana danificada, não atravessando a membrana de células vivas. Assim, o SYTOX Green identifica a subpopulação de células mortas, por excitação a 488 nm e fluorescência em FL1-verde (entre 504 e 523 nm). Esta sonda tem ainda a vantagem de poder associar-se com sondas de espectro de fluorescência azul ou vermelho, para uma análise multiparamétrica.

## **6.2 Desorganização membranar e capacitação**

São realizados vários testes para determinação do estado de capacitação dos espermatozóides, avaliando eventos estruturais e funcionais durante o processo.

A capacitação pode ser estimada pela avaliação da motilidade hiperactivada, isto é, um aumento significativo nos valores de VCL e ALH e diminuição do valor LIN, medidos através do CASA, assim como pela identificação da fosforilação de tirosina no flagelo, detectada por imunoblotting ou citometria de fluxo; a testagem do metabolismo do cálcio, pelo ensaio da clortetraciclina (CTC); e ainda por detecção de alterações membranares no rácio colesterol/fosfolípidos. Contudo, para detecção da capacitação, a citometria de fluxo permite agora a utilização da merocianina (M540). Este consiste num corante hidrofóbico cujo tropismo é mais elevado para lípidos membranares com elevado estado de desorganização (Langner & Hui, 1993; Williamson, Mattocks, & Schlegel, 1983), que perdem a sua assimetria típica. Por esta razão, esta sonda é utilizada na monitorização de alterações na arquitectura lipídica que ocorre na membrana plasmática espermática durante a capacitação, um processo que parece ser derivado a uma desorganização da bicamada fosfolipídica induzida pelo bicarbonato (Gadella & Harrison, 2000).

O seu tropismo para fosfolípidos de membrana, permite identificar os lípidos da camada externa quando se desorganizam e perdem a sua assimetria típica, intercalando-se o corante na membrana. Na espécie equina, foi já demonstrado que o bicarbonato actua como potenciador da capacitação dos espermatozóides, detectando precocemente as alterações de fluidez de

membrana através da merocianina (M540), em comparação com o influxo tardio de cálcio detectado pelo CTC (Harrison & Gadella, 2005). A clortetraciclina consiste num antibiótico fluorescente que atravessa a membrana e entra nos compartimentos intracelulares onde se encontra armazenado o cálcio livre, ligando-se a este e permitindo a detecção por microscopia confocal, em espermatozóides mortos. O uso da M540 aportou uma grande vantagem em relação ao CTC por permitir a avaliação citométrica deste parâmetro, ou seja, em células vivas, podendo ainda ser associada a corantes vitais como o YO-PRO-1 ou o SYTOX Green. A importância da utilização de um corante vital remete-nos para a necessidade de obtenção de valores biologicamente reais, ou seja, a determinação da capacitação de espermatozóides vivos apenas. A M540 identifica alterações à meia hora que apenas são detectadas pelo CTC às três horas de incubação, (Rathi, et al., 2001) permitindo concluir que a desorganização lipídica ocorre previamente ao influxo de cálcio.

A M540 é excitada por um laser de comprimento de onda de 488 nm e emite em FL2-laranja (580-620 nm). A albumina sérica é um dos principais moduladores da afinidade da sonda com as membranas biológicas, apesar dos componentes membranares que reagem com a sonda não estarem todavia descritos. A detecção da capacitação é todavia uma técnica em estudo com insuficiência de dados correspondentes a situações standard, para que se possa especular correctamente acerca de alterações seminais.

### **6.3 Integridade acrossómica**

A determinação da integridade acrossómica constitui uma parte fundamental na análise seminal, sendo feita de duas formas distintas: pela medição da percentagem inicial de espermatozóides já reagidos ou pela testagem de capacidade de reacção em resposta a determinado estímulo. A maior parte dos testes baseiam-se em marcadores fluorescentes e contagem microscópica ou citometria de fluxo (Peña & Rodríguez, 2006). Neste trabalho não foi avaliada a reacção acrossómica.

### **6.4 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )**

Em relação à integridade mitocondrial, a importância da sua determinação confirma-se pelo facto da percentagem de mitocôndrias funcionalmente normais ser proporcional à percentagem de células viáveis e com motilidade (Thomas, Garner, DeJarnette, & Marshall, 1998), assim como algumas características de velocidade como a linearidade e rectidão (Love, et al., 2003). Em espermatozóides humanos, foi também demonstrado que é necessário um

elevado potencial de membrana mitocondrial para se obter uma adequada fertilidade espermática (Gallon, Marchetti, Jouy, & Marchetti, 2006).

Em bovinos foi detectado que a energia necessária para a motilidade seria proveniente das mitocôndrias localizadas na peça intermédia, e que qualquer alteração destas teria reflexo em termos de motilidade (Ericsson, Garner, Thomas, Downing, & Marshall, 1993). Porém, evidências em outras espécies sugerem que a glicólise no flagelo é mais importante que a fosforilação nas mitocôndrias da parte média para a obtenção de ATP e consequente função do axonema e motilidade (Turner, 2006). Assim, o valor da análise mitocondrial como predictivo da motilidade flagelar é todavia controverso. Contudo, o facto das mitocôndrias parecerem ser a estrutura mais sensível aos processos de congelação e descongelação, faz com que o seu estudo constitua uma parte muito importante da biotecnologia reprodutiva.

Dos vários corantes utilizados com esta função, foi eleito o 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-carbocianina-iodado (JC-1), dado que permite a identificação de vários graus de funcionabilidade mitocondrial, tendo sido obtida uma correlação elevada ao comparar os resultados de vários gradientes de espermatozóides funcionais com os valores de potencial de membrana de mitocôndria (Gravance, Garner, Baumber, & Ball, 2000). Este estudo comprovou que a utilização de JC-1 permite detectar alterações no potencial de membrana mitocondrial (alto, médio e baixo) do espermatozóide equino, através da citometria de fluxo ou por microscopia de fluorescência. Para além desta característica, este corante foi considerado como mais rigoroso na detecção da função metabólica das mitocôndrias, quando comparado com a Rodamina 123 ou o *Mito Tracker* (Gravance, et al., 2000).

O JC-1 consiste numa carbocianina catiónica lipofílica interiorizada por todas as mitocôndrias funcionais, excitada a 488 nm e fluorescendo num comprimento de onda de 525-530 nm (verde) quando presente em mitocôndrias de baixo potencial, formando monómeros (banda M), e com um comprimento de onda de 590 nm (vermelho) quando se acumula em grandes quantidades em mitocôndrias altamente funcionais, formando multímeros (agregados J). esta ligação depende do pH do meio, força iónica e temperatura (Brum, Sabeur, & Ball, 2008). É então possível diferenciar subpopulações de espermatozoides com alto, médio e baixo potencial de membrana mitocondrial através da intensidade de fluorescência detectada por um microscópio de fluorescência, ou em três subpopulações de alta (fluorescência laranja), média (ambas as cores) e baixa (verde) funcionabilidade, por citometria de fluxo.

## **6.5 Estado da cromatina**

A determinação do estado da cromatina é frequentemente efectuada pelo *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), através do qual se cora ADN desnaturado com *Acridine Orange* (AO), corante que diferencia cadeias duplas (verde) de simples (vermelho). Muitas vezes as alterações na integridade nuclear não se reflectem na fertilização, mas apenas no desenvolvimento embrionico-fetal e na manutenção da gestação (Peña & Rodríguez, 2006). Neste trabalho a cromatina não foi um dos parâmetros avaliados.

### **6.6 Peroxidação lipídica**

O C<sub>11</sub>-BODIPY<sup>581/591</sup> é considerado o corante mais fidedigno e de fácil uso para a determinação da peroxidação lipídica em espermatozóides (Aitken, Wingate, De Iuliis, & McLaughlin, 2007; Brouwers, Silva, & Gadella, 2005), sendo por isso utilizado na avaliação da susceptibilidade do sémen equino a este processo após exposição ao stress oxidativo (Ball & Vo, 2002; Neild, Brouwers, Colenbrander, Agüero, & Gadella, 2005).

Este corante permite a identificação de espermatozóides cuja membrana sofreu o ataque de espécies reactivas de oxigénio (ou de nitrogénio), alterando a sua fluorescência vermelha FL-3 (591-595 nm), para fluorescência verde FL-1 (450-550 nm) (Drummen, Gadella, Post, & Brouwers, 2004).

## **7. Espécies reactivas de oxigénio**

O stress oxidativo consiste no balanço entre a formação e degradação de ERO em determinado tecido. Este pode ser causado tanto por inflamação leucocitária como por insuficiência de antioxidantes, sendo a causa mais comum a geração de quantidades excessivas de estas espécies pelos próprios espermatozóides. Durante a sua maturação, os espermatozóides perdem grande parte das suas organelas celulares, com excepção do acrossoma e de uma certa quantidade de mitocôndrias, que se alojam na peça intermédia da cauda do espermatozóide e que possuem um papel importante prévio à fertilização (Pena, et al., 2009).

O volume reduzido e a localização restrita do seu espaço citoplasmático limita a disponibilidade de enzimas intracelulares antioxidantes, que podem ser futuramente comprometidas pelo envelhecimento. Esta vulnerabilidade, associada à tendência de espermatozóides defeituosos em gerar elevadas quantidades de espécies reactivas de oxigénio, resulta num comum estado de peroxidação espermática de espermatozóides de indivíduos inférteis (De Iuliis, et al., 2006), isto num estudo realizado em humanos.

Em células somáticas, a maior produção de espécies reactivas de oxigénio parece ter proveniência na cadeia de transporte de electrões mitocondrial, na respiração celular, sendo esta produção normalmente controlada pela existência de factores antioxidantes. Quando este mecanismo não é suficiente, gera-se um stress oxidativo implicado em numerosas condições patológicas. Espermatozóides provenientes de humanos com baixa qualidade seminal, produzem significativamente maior quantidade de espécies reactivas de oxigénio (Koppers, De Iuliis, Finnie, McLaughlin, & Aitken, 2008), detectando-se uma menor motilidade e uma maior peroxidação lipídica, o que causa provável e posteriormente um dano oxidativo ao ADN espermático (Kodama, Yamaguchi, Fukuda, Kasai, & Tanaka, 1997).

Tanto os espermatozóides como o plasma seminal possuem enzimas e antioxidantes de baixo peso molecular que retêm/sequestram os radicais livres, prevenindo o dano celular. Os três mais importantes sistemas enzimáticos consistem no sistema glutationa-peroxidase, superóxido dismutase e catalase, ocorrendo também outras moléculas antioxidantes como a vitamina E, a vitamina C, urato, albumina, taurina e hipotaurina (Smith, et al., 1996).

Por estarem sujeitos a condições aeróbias, os espermatozóides também vivem sobre o efeito do paradoxo do oxigénio: este gás é necessário à vida, mas origina paralelamente o metabolismo oxidativo que tem como consequência final a formação de espécies reactivas de oxigénio, potencialmente tóxicas (Baumber, et al., 2000). Estas células são extremamente susceptíveis às ERO porque estão em contacto próximo com substratos produtores de radicais livres e são deficientes em enzimas protectoras, dado que perderam grande parte do seu citoplasma na espermiogénese. Quando os espermatozóides se libertam do epitélio germinativo têm uma elevada quantidade de ácidos gordos polinsaturados, que poderão reflectir um estado de imaturidade de desenvolvimento. Assim, a entrada no epidídimo ocorre num estadio funcionalmente incompetente, sem capacidade de motilidade coordenada ou penetração no oócito. O fenótipo destes espermatozóides imaturos é muitas vezes reflexo de gametas defeituosos encontrados em machos inférteis, assim como células funcionalmente incompetentes com um elevado conteúdo em ácidos gordos insaturados. Para uma correcta maturação espermática ao longo do trânsito pelo epidídimo, a aquisição de competência funcional é acompanhada pela remodelação da membrana plasmática que envolve a depleção de fosfolípidos, perda de ácidos gordos polinsaturados e aumento do rácio esterol/fosfolípidos, factores que conferem uma maior estabilidade membranar à membrana espermática, ou seja, maior resistência às ERO.

Os factores nutricionais, ambientais e químicos podem induzir a sobreprodução de anião

superóxido tanto no citosol como na mitôcondria, produzindo um excessivo stress oxidativo do qual os espermatozóides são incapazes de se defender. Tradicionalmente, pensava-se que o principal papel das mitocôndrias seria a produção de energia através da fosforilação oxidativa. Contudo, as mitocôndrias possuem um papel secundário, actuando na regulação morte celular e constituindo a maior fonte de espécies reactivas de oxigénio (Gonzalvez & Gottlieb, 2007; Rodriguez-Gil, 2006) estando portanto este conceito actualmente em discussão. Foi evidenciado que o dano oxidativo é mais proeminente na peça intermédia, ou seja, onde se concentram as mitocôndrias (Ortega Ferrusola, et al., 2009). Confirma-se então que as mitocôndrias espermáticas são a principal fonte de ERO (Koppers, et al., 2008), sendo estas geradas principalmente pelos complexos I e III da cadeia respiratória. Este stress oxidativo é independente do potencial de membrana mitocondrial, no caso do complexo III, e causativo de dano peroxidativo e diminuição da motilidade, no caso do complexo I. As mitocôndrias exercem um papel importante em diversos processos tanto fisiológicos como patológicos na célula espermática (Gallon, et al., 2006; Pena, et al., 2009; Rasola & Bernardi, 2007), como por exemplo o incremento ERO através do processo de congelação-descongelação espermática e a subsequente apoptose celular (Lachaud, Tesarik, Canadas, & Mendoza, 2004; Ott, Gogvadze, Orrenius, & Zhivotovsky, 2007). Altos níveis de ERO perto das mitocôndrias vão interferir com a homeostase de cálcio mitocondrial, danificar o ADN mitocondrial, alterar as propriedades da membrana e provocar a desregulação do Ciclo de Krebs (Pena, et al., 2009).

Num estudo em células somáticas, foi determinado que à medida que o processo da oxidação se desenvolve, este stress torna-se nitroxidativo, devido ao envolvimento do óxido nítrico. Uma vez que se forma o peroxinitrito, a sua acção tem um efeito tóxico directo levando à peroxidação lipídica, oxidação proteica e alterações do ADN. Este mecanismo envolve a indução de vários factores de transcrição levando a uma inflamação crónica induzida por citocinas (Korkmaz, et al., 2009), como o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina  $1\beta$ .

As ERO tais como peróxido de hidrogénio, anião superóxido e radical hidroxilo, assim como o óxido nítrico são necessárias em quantidades reduzidas para o normal funcionamento celular, sendo contudo nefastas em elevadas concentrações (Aitken, 2006). Isto porque uma peroxidação ténue pode promover tanto a capacitação como a reacção acrossómica através da activação da PKA específica espermática, e os aniões superóxido induzir a hiperactivação e hipermotilidade espermática, e ainda a afinidade para a zona pelúcida (Gadella, et al., 2001).

Por outro lado, quando estas espécies se encontram em elevada concentração, o efeito exercido torna-se nefasto (Aitken, et al., 2007), nomeadamente pela depleção de ATP e impedimento de uma adequada fosforilação do axonema, uma acrescida peroxidação lipídica e uma perda de motilidade e viabilidade (de Lamirande, Jiang, Zini, Kodama, & Gagnon, 1997). Apesar dos sistemas redox que existem para controlo fisiológico destes produtos, continua a decorrer um stress oxidativo originado por um aumento de produção de radicais ou diminuição da produção de antioxidantes tendo como consequência a peroxidação lipídica da membrana e a disfunção espermiática.

Em última análise, o efeito das espécies reactivas de oxigénio sobre os espermatozoides parece ser dependente do balanço entre produção e a depleção destas espécies, assim como o *timing* de cada um destes processos (de Lamirande, et al., 1997).

Os testes para medição de ERO podem ser efectuados por determinação de quimioluminescência, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante.

Em humanos, o stress oxidativo está associado com baixa fertilidade, alterações no desenvolvimento embrionário, aborto e doenças na infância. Este stress parece estar associado com a peroxidação de ácidos gordos insaturados da membrana plasmática e ataque oxidativo ao ADN nuclear e mitocondrial (De Iulius, Wingate, Koppers, McLaughlin, & Aitken, 2006). Com o trabalho efectuado por esta equipa concluiu-se que a produção de espécies reactivas de oxigénio não está directamente associada a cadeia de transporte de electrões mitocondrial (para o caso do ião  $O_2^-$ ), e está inversamente relacionada com a motilidade espermiática. Contudo, (Mukhopadhyay, et al., 2007), realizou várias medições de síntese de anião superóxido mitocondrial através de marcadores de apoptose (Annexin V e SYTOX Green) em células endoteliais, concluindo que células sujeitas a condições patológicas (como doenças degenerativas e alterações inflamatórias) reagem com a produção de espécies reactivas de oxigénio como o anião superóxido e espécies de nitrogénio, produzidas por metabolismo mitocondrial.

Em equinos não há muito material publicado sobre a influencia das ERO na função espermiática, havendo no entanto provas da elevada concentração de superóxido-dismutase no plasma seminal (Mennella & Jones, 1977), e da actividade protectora do ácido ascórbico exógeno na integridade membranar pós armazenamento (Deichsel, Palm, Koblischke, Budik, & Aurich, 2008).

A peroxidação lipídica ocorre como uma das causas principais concorrentes para a diminuição de fertilidade detectada após o armazenamento do sémen, devido à reacção com radicais de

oxigénio. Os espermatozóides são particularmente sensíveis ao stress oxidativo devido ao seu alto conteúdo em ácidos gordos polinsaturados, como o ácido decosahexanoico (Aitken, 2004). Estes ácidos, ao reagir com os radicais livres, dão origem a radicais peroxil e alcoxil (Aitken, Harkiss, & Buckingham, 1993). Estes radicais, para adquirirem estabilidade necessitam retirar um átomo de hidrogénio a um átomo adjacente de carbono de um lípido da vizinhança, formando o respectivo ácido ou álcool. A remoção deste átomo de hidrogénio cria um radical carbónico que se combina com o oxigénio, criando outro lípido peroxidado e perpetuando a reacção em cadeia (Bielski, Arudi, & Sutherland, 1983). A peroxidação tem como consequência a perda de integridade membranar, alteração da funcionabilidade celular e diminuição da motilidade espermática (Storey, 2008).

A elevada concentração de ácidos gordos polinsaturados na membrana espermática é necessária para conceder à membrana plasmática a fluidez necessária para a motilidade espermática e participação nos eventos de fusão associados com a fertilização, assim como a manutenção da integridade estrutural necessária à viabilidade. A perda de integridade membranar pode ainda ser responsável por um aumento na permeabilidade e perda na capacidade de regulação das concentrações intracelulares de iões envolvidos no controlo da motilidade (Baumber, et al., 2000). Contudo, neste estudo não se detectou um decréscimo da peroxidação lipídica, apesar da diminuição marcada na motilidade espermática, pelo que se induziu que a motilidade possa ser um indicador mais sensível do stress oxidativo, ou que as espécies reactivas de oxigénio possam afectar os dois parâmetros por diferentes vias.

Adicionalmente, foi também encontrada uma elevada correlação entre a peroxidação lipídica e a qualidade espermática pós-descongelação, evidenciada a partir de valores de integridade membranar e potencial de membrana mitocondrial (Ortega Ferrusola, et al., 2009).

No trabalho desenvolvido por (Baumber, et al., 2000), foi estudada a influência das espécies reactivas de oxigénio na função espermática equina, nomeadamente motilidade, viabilidade, integridade acrossómica, potencial de membrana mitocondrial e peroxidação lipídica membranar. Concluiu-se que, a um tempo de incubação de meia hora, a motilidade consiste no parâmetro mais afectado, ocorrendo uma diminuição significativa, sendo o peróxido de hidrogénio a espécie citotóxica primária mais significativa.

Recentemente, a detecção da melatonina no plasma seminal humano, e o seu marcado efeito anti-oxidante nas células espermáticas (du Plessis, Hagenaar, & Lampiao, 2010), veio iniciar uma série de projectos de investigação nesta área.

## 8. Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) foi inicialmente identificada por Lerner, em 1958, como a substância produzida pela glândula pineal e responsável por todos os seus efeitos. Consiste numa neurohormona secretada durante as horas de escuridão pela glândula pineal, tendo como precursor o aminoácido triptofano, que é captado a partir da circulação e sofre sequencialmente uma 5-hidroxilação e uma descarboxilação, originando a 5-hidroxitriptamina (serotonina). A via mais importante da serotonina no metabolismo pineal consiste na sua transformação em N-acetilserotonina, pela enzima N-acetiltransferase (NAT), substância que, por acção da enzima hidroxindol-O-metil transferase (HIOMT), origina a melatonina (Aguilar & Tresguerres, 1992). Esta indolamina é então libertada nos capilares, na sua maior parte ligada à albumina e em concentração mais elevada no líquido cerebrospinal (Tricoire, Moller, Chemineau, & Malpoux, 2003), sendo rapidamente distribuída em todos os tecidos corporais (Cardinali & Pevet, 1998). Foi ainda demonstrado que a melatonina também se produz em outros órgãos como a retina, glândulas Harderianas (roedores), tracto gastrointestinal, medula óssea, ovário e testículos, pele e ainda linfócitos (Hardeland, 2005), o que parece estar associado ao facto de apenas alguns tecidos possuírem a enzima HIOMT.

A descoberta da relação entre a puberdade e a glândula pineal, no início do século XX, deixou alguns peritos em dúvida. Isto levou a uma pesquisa científica dedicada a esta área, concluindo-se, entre outras coisas, que a produção metabólica, tanto de melatonina como das enzimas intervenientes na sua síntese, se concentra no período nocturno. Nos primeiros 30 anos após a descoberta desta indolamina (Reiter, Tan, et al., 2009) os estudos basearam-se na sua relação com a sazonalidade e o fotoperíodo, e a sua associação com o ciclo reprodutivo e o efeito nas diferentes espécies.

Esta hormona tem uma função de moduladora da actividade fisiológica circadiana, transmissora da informação fotoperiódica, reguladora da maturação e diferenciação dos neurónios, ritmo circadiano, metabolismo do óxido nítrico e eixo hipotalamo-pituitário-gonadal. É ainda um potente antioxidante que protege as células da apoptose mitocondrial induzida pelo stress oxidativo, e inibidora da peroxidação lipídica.

A nível fisiológico, a melatonina não consiste numa hormona pró-gonadal nem anti-gonadal, senão num sinal cronológico circulante cuja função é informar o organismo do momento em que se encontra, efectuando uma interacção neuroendócrina-reprodutora. Contudo, em humanos (e equinos) está comprovada que a administração exógena desta hormona causa uma inibição na ciclicidade e na produção espermática (Reiter, Tan, et al., 2009).

O tempo e duração do pico de melatonina reflecte o período nocturno (Cardinali & Pevet, 1998), sendo que se atingem altas concentrações durante a noite, com um pico normalmente entre as 02.00h e as 04.00h. Assim, a melatonina é um sinal de escuridão que identifica a altura e a duração da luminosidade/escuridão diária, enviando esta informação para o Sistema Nervoso Central (SNC) e órgãos periféricos (Pandi-Perumal, et al., 2006). Nos mamíferos, esta informação é muito valiosa na regulação de alterações sazonais que influem em diversas funções fisiológicas, neuroendócrinas e reprodutivas (Cardinali & Pevet, 1998). Outra das acções da melatonina é a regulação da fase de ritmos circadianos por uma acção directa sobre o SNC, pelo que a sua administração melhora o sono nocturno e o estado de alerta diurno (Arendt & Skene, 2005). A melatonina exógena reajusta a maioria dos ritmos em vertebrados e invertebrados, afectando também as plantas (fitomelatonina) e organismos unicelulares.

Na espécie equina, tal como em muitas outras espécies animais, a produção de melatonina pela glândula pineal é inibida pela luz e estimulada pela escuridão, alcançando um pico a meio da noite e decrescendo a partir deste valor.

Para além da sua função reguladora do sono (Dijk & von Schantz, 2005; Pandi-Perumal, Zisapel, Srinivasan, & Cardinali, 2005), esta hormona tem também funções de inibição da libertação de dopamina no hipotálamo e retina (Zisapel, 2001), está envolvida no processo de envelhecimento (Karasek, 2004) e desenvolvimento na puberdade (Salti, et al., 2000), controlo da pressão sanguínea (Grossman, et al., 2006), sequestrante de radicais livres (Tan, Manchester, Terron, Flores, & Reiter, 2007), neuroprotectora pela sua acção anti-excitatória e anti-inflamatória e ainda detentora de propriedades imunomodulatórias mediadas por receptores tanto membranares como nucleares (Guerrero & Reiter, 2002).

A descoberta da melatonina como antioxidante (Poeggeler, Reiter, Tan, Chen, & Manchester, 1993) constituiu um estímulo para o desenvolvimento de várias pesquisas, que documentaram uniformemente a capacidade desta molécula como quelante de radicais livres e redutora da agressão molecular (El-Sokkary, Kamel, & Reiter, 2003; Lee, et al., 2002; Reiter, Paredes, Manchester, & Tan, 2009).

A protecção celular aos radicais livres pode realizar-se pela redução da produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio, prevenção da deplecção de enzimas intracelulares antioxidantes, inibição da sobreactivação das espécies reactivas de nitrogénio, destoxificação de espécies baseadas em nitrogénio, redução das citocinas, limitação da peroxidação lipídica e a oxidação proteica, entre outras (Korkmaz, et al., 2009). Vários estudos são já indicativos da acção da melatonina como impeditiva do stress tanto oxidativo como nitroxidativo (Reiter, et

al., 2003) e este estudo vem comprová-lo. Tanto a melatonina como os seus metabolitos têm a capacidade de destoxificação de radicais livres (Reiter, Tan, Terron, Flores, & Czarnocki, 2007), em concentrações fisiológicas e farmacológicas. Inclusive, em vários estudos já publicados, constatou-se a superioridade da melatonina como antioxidante, quando comparada com a vitamina E,  $\beta$ -caroteno e vitamina C (Hsu, Han, Liu, Yeh, & Casida, 2000; Rosales-Corral, et al., 2003).

Desde a descoberta das propriedades da melatonina como antioxidante, em 1993, várias publicações já confirmaram directa ou indirectamente este efeito. Este efeito deve-se à capacidade quelante de radicais de oxigénio e nitrogénio, incluindo o radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), molécula de oxigénio ( $\text{O}_2$ ), óxido nítrico (NO) e anião de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). As análises efectuadas (Tan, et al., 2002) supõem como base deste efeito a sua alta estabilidade nuclear à ressonância e baixa energia de activação, em relação às reacções com radicais livres.

Outro dos factores que converte a melatonina num antioxidante potente é o facto dos seus metabolitos: 3-hidroximelatonina ciclica (3-OHM ciclica),  $\text{N}^1$ -acetil- $\text{N}^2$ -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e  $\text{N}^1$ -acetil-5-metoxiquinuramina (AFM), produzidos durante a acção quelante da melatonina, serem também oxidantes efectivos (de Almeida, Martinez, Klitzke, de Medeiros, & Di Mascio, 2003; Ressmeyer, et al., 2003).

Ao contrário da maioria dos antioxidantes, a melatonina está desprovida de actividade peroxidativa, e todos os intermediários gerados pela interacção com as espécies reactivas são também quelantes de radicais livres (Rao & Gangadharan, 2008). Este fenómeno está descrito como reacção em cadeia de quelação dos radicais livres da família da melatonina. Devido a este, uma molécula de melatonina tem a capacidade de quelar quatro ou mais espécies. Esta maior eficácia da melatonina é comprovada pela menor dose necessária quando comparada com outros antioxidantes. Como demonstrado por (Gavella & Lipovac, 2000), a melatonina é quatro vezes mais eficiente que o *trolox*, um análogo da vitamina E, na prevenção da peroxidação lipídica. Para além disto, a melatonina exerce ainda uma acção estimulante sobre a actividade de enzimas que metabolizam as espécies reactivas, mantendo a fluidez membranar a determinado nível.

Todos os organismos acumulam típicamente resíduos moleculares oxidados, isto significa que a combinação de todos os antioxidantes exógenos (vitamina C e E,  $\beta$ -carotenos e ácido úrico) actuando em conjunto são incapazes de prevenir o dano oxidativo. A capacidade também antioxidante da melatonina está demonstrada pela rápida acumulação de radicais livres em

ratos pinealectomizados (Moore, 1978), sendo este dado consistente com a existência de níveis fisiológicos protectores de melatonina. Apesar da melatonina não atingir altas concentrações intracelulares (tal como a glutatona), este não é o único parâmetro determinante da eficácia de um antioxidante, sendo importantes factores como a solubilidade (em lípidos ou soluções aquosas) e a concentração parácrina da hormona. Pouco é conhecido acerca da distribuição subcelular de melatonina. Contudo, está demonstrada a baixa concentração necessária, quando em comparação com outras hormonas. Até hoje, é impossível concluir categoricamente que a melatonina se trata de um antioxidante fisiológico. O que se comprova, é que em situações de stress oxidativo, esta substância exerce um elevado efeito protector.

A eficácia da melatonina como antioxidante está relacionada com a sua capacidade quelante de radicais livres, o estímulo exercido tanto sobre enzimas antioxidantes como sobre a glutatona, a eficácia na redução da fuga de electrões da cadeia de transporte mitocondrial e ainda a sua acção sinérgica com outros antioxidantes (Reiter, et al., 2007), não estando todavia claro qual dos mecanismos é o mais importante. Dado que a melatonina passa livremente todas as barreiras morfofisiológicas e penetra facilmente em todas as células, a sua acção como antioxidante propaga-se por todo o organismo. Esta indolamina possui vários efeitos a nível mitocondrial que melhoram o bem estar celular, impedindo a apoptose e realizando também a mediação da cadeia de transporte de electrões e a fosforilação oxidativa, causando o aumento da produção de ATP em células normais.

O possível papel da melatonina como agente bioenergético de manutenção da função mitocondrial tem também algum interesse. A maior parte do oxigénio molecular inalado é processado na cadeia de transferência de electrões mitocondrial, sendo convertido em água após quatro reduções electrónicas. Contudo, neste processo de redução as espécies parcialmente reduzidas de oxigénio produzem espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio, tais como o óxido nítrico, através da enzima mitocondrial NOS (óxido nítrico síntase). O óxido nítrico, apesar de actuar como regulador fisiológico da respiração e do ritmo de síntese de ATP, quando atinge níveis demasiado elevados pode inibir os complexos I e III. Neste caso, a transferência de electrões fica comprometida, ocorrendo uma perda de electrões e consequente formação de  $O_2^-$  e outros oxidantes (Brown, 1992)

As evidências da acção antioxidante da melatonina sobre os espermatozóides foi já confirmada em vários trabalhos. A existência comprovada de receptores de melatonina no tecido epididimário de ratos (Shiu, et al., 2000) e humanos (van Vuuren, Pitout, van Aswegen,

& Theron, 1992), assim como a detecção de melatonina no plasma seminal tanto de humanos (Luboshitzky, Shen-Orr, Nave, Lavi, & Lavie, 2002) como de carneiros (Casao, et al., 2010), levaram à suspeita de que esta neurohormona possa ter um papel fundamental na viabilidade das células espermáticas.

Como o líquido seminal humano possui melatonina (Bornman, et al., 1989) e os espermatozoides receptores de melatonina (van Vuuren, et al., 1992), foi investigada a sua influência sobre a hiperactivação de espermatozoides de hamster (Fujinoki, 2008). Confirmou-se assim uma associação entre a quantidade de melatonina disponível e a capacitação, reacção acrossómica e hiperactivação.

Podemos ainda confirmar as vantagens da melatonina na protecção de espermatozoides contra as ERO em trabalhos desenvolvidos na área de Ecotoxicologia, por exemplo. Foi testado o efeito da melatonina pré-administrada a ratos experimentalmente intoxicados com diazinão (pesticida organofosforado nefasto para a fertilidade do macho por produção de espécies reactivas de oxigénio que reagem com o ADN), ocorrendo protecção dos espermatozoides recolhidos posteriormente da cauda do epidídimo (Sarabia, Maurer, & Bustos-Obregon, 2009).

Também foi estudado e comprovado o efeito protector da melatonina em sémen incubado com concentrações crescentes de mercúrio, um metal previamente associado a efeitos nefastos na quantidade, viabilidade e morfologia espermática, devido à sua acção como catalisador na oxidação de biomoléculas (Rao & Gangadharan, 2008).

Em relação ao aparelho reprodutor feminino, em humanos, ocorre um aumento na concentração de melatonina no fluido folicular ovárico, quando comparada com a concentração plasmática. Independentemente da sua origem (concentração ou síntese local), a funcionalidade desta hormona está possivelmente associada ao seu efeito antioxidante, por redução da apoptose e permissão do correcto desenvolvimento folicular (Tamura, et al., 2009; Tamura, et al., 2008). A utilidade da melatonina no fluido folicular pode dever-se ao facto de a ovulação envolver um processo semelhante a uma resposta inflamatória (Espey, 1994), tendo como consequência a produção local de espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio, susceptíveis de aumentar a oxidação do ócito.

A melatonina tem ainda como vantagem o facto de não ser pró-oxidativa, ou seja, após quelar os radicais livres esta molécula não participa no ciclo redox, preservando ou até aumentando o conteúdo de GSH tissular. Sendo assim, a melatonina é considerada um antioxidante terminal (Tan, et al., 2002).

Devido à sua capacidade de destoxificação de reactivos de oxigénio e nitrogénio, a melatonina tem ainda um papel na redução de alterações morfofisiológicas passadas à geração seguinte (Tamura, et al., 2008). Devia ser por isso testada a sua utilização em técnicas de fertilização *in vitro* e transferência de embriões, dado o elevado custo e baixo sucesso inerente a estas técnicas.

Em conclusão, e dada a sua incomum baixa toxicidade, é possível a realização de ensaios clínicos para documentar a protecção desta hormona contra estadios patofisiológicos do sistema reprodutivo em que a oxidação é frequente (Reiter, Tan, et al., 2009).

Para além da actividade da melatonina como antioxidante, a sua acção fisiológica baseia-se na interacção com os receptores membranares MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub> e proteínas intracelulares como a quinona redutase 2, calmodulina, calreticulina e tubulina (Pandi-Perumal, et al., 2008) em células tanto do Sistema Nervoso Central como de órgãos periféricos como vasos sanguíneos, rim e órgãos reprodutores. Os seus efeitos incluem alterações nos nucleótidos cíclicos intracelulares, níveis de cálcio, activação de certos subtipos de proteína quinase C, localização intracelular de receptores de hormonas esteróides e regulação de proteína G.

## **9. Materiais e métodos**

### **9.1 Colheita de sémen e processamento**

A recolha de sémen é fundamental no processo da inseminação artificial, dado que uma inseminação de sucesso está altamente dependente de uma colheita eficiente. Tanto esta técnica como a libido e a capacidade de monta do garanhão dependem de importantes factores hereditários, ambientais e adquiridos, que devem ser controlados através de um bom maneio do animal. É de salientar que um garanhão pode possuir má fertilidade tanto por causas detectáveis com o exame clínico inicial como por um incorrecto processo de recolha seminal.

O sémen (três ejaculados por garanhão) analisado foi proveniente de quatro garanhões Andaluzes, estabulados no Hospital Veterinário da Universidade de Extermadura, Cáceres, Espanha. Os equinos encontravam-se mantidos sob condições Europeias e institucionais regulamentadas, sendo o sémen colhido aproximadamente três vezes por semana a cada garanhão, durante a estação reprodutiva de 2010.

Área de colheita – A recolha de sémen realizou-se em dois locais distintos do recinto exterior (por um dos indivíduos não se encontrar treinado para monta no manequim). A maior parte

das recolhas foram realizadas em uma área onde se encontra montado o manequim sobre um piso anti-derrapante, perto dos estábulos da Universidade e das boxes exteriores onde se mantêm as éguas. Em um dos garanhões, não habituado ao manequim, teve de realizar-se a recolha com monta em égua. Evitou-se na altura de colheita o trânsito de veículos, animais e pessoas. A sala de preparação de vaginas, assim como o laboratório encontram-se perto de ambos os locais.

Método – Vagina artificial (Missouri) desinfectada e seca, preenchida com água quente que deve alcançar uma temperatura entre 45° e 50°C (medida com termómetro) e uma pressão adequada para a introdução do pénis. É revestida internamente com lubrificante não espermicida, evitando-se o uso de lubrificantes bacteriostáticos ou espermicidas que diminuem a qualidade do sémen. Na extremidade oposta da vagina encontra-se acoplado o recipiente de colheita de sémen (limpo, seco e mantido a 40°C) no qual se coloca um filtro descartável que reduz a contaminação do sémen e retém a fracção de gel seminal. Com este procedimento pode perder-se cerca de 25-30% da produção seminal.

Monta – Realizada com uma égua ovariectomizada e de comportamento calmo, controlada com o auxílio de um aziar e peias, e cuja cauda se encontrava atada, isolada e mantida em tensão para impedir a penetração do pénis. Administraram-se com intervalos de 3 dias a 3 semanas autocolantes de estrogénos (estradiol) para que a égua se mantivesse receptiva. No caso de garanhões devidamente ensinados procedeu-se ao uso de um manequim isolado para impedir a possível contaminação entre indivíduos, ao lado da qual se coloca a égua. A altura do manequim é ajustável.

Processamento – O laboratório deve estar preparado previamente à colheita, com os diluidores seminais conservados a uma temperatura de 37°C, assim como o material utilizado. Quando o garanhão visualiza a égua e o seu pénis entra em erecção, deve proceder-se à sua limpeza com água quente, prestando especial atenção à fossa uretral e seios, dado que é o principal local onde se podem acumular microrganismos patogénicos. O pénis é depois seco com um papel. A vagina deve ser introduzida imediatamente e de forma segura após a erecção completa e monta do garanhão, pelo seu lado esquerdo. O pénis é fixado e deflectido pela sua superfície ventral, com uma das mãos, enquanto que a outra suporta a vagina artificial. Esta é fixa em todo o seu comprimento e localizada paralelamente ao eixo médio do animal e em

alinhamento directo com a base do pénis. No momento da ejaculação são sentidas as fortes pulsações uretrais com a mão que fixa o pénis, momento a partir do qual a vagina deve ser ligeiramente deflectida ventralmente de modo a que o sémen esorra para o depósito e impedindo o choque térmico. O sémen deve ser imediatamente transportado para o laboratório e processado. O processamento consiste na medição da concentração espermática (*SpermaCue*) e posterior diluição 1:1 (v/v) com o diluidor INRA96 (IMV, L'Aigle, França) e centrifugação a 600g durante 10 min a 22°C. O *pellet* resultante é novamente diluído em INRA96, para obtenção de uma concentração aproximada de  $100 \times 10^6$  espermatozóides/ml.

A centrifugação é importante na medida em que é eficaz na remoção do plasma seminal. Em vários trabalhos foi já confirmado efeito detrimental do plasma seminal no armazenamento de sémen refrigerado ou congelado, nomeadamente em características de motilidade e de integridade de ADN. Contudo, alguma quantidade de plasma parece ser necessária para a manutenção da fertilidade (Kareskoski & Katila, 2008), pelo que este tema não está totalmente clarificado. Neste trabalho optou-se por centrifugar as amostras, tanto para um aumento na durabilidade dos espermatozóides, como para uma remoção de factores antioxidantes presentes.

Complicações – Espermatozóides expostos a calor excessivo adquirem excessiva motilidade circular, possuindo reduzida longevidade ou inclusivé tornando-se inférteis. Exposição do sémen a temperaturas elevadas por 10-20 segundos é suficiente para causar um choque térmico. Um sémen de má qualidade, por exemplo com elevada contaminação bacteriana, pode ser devido a uma má limpeza do pénis; enquanto que um excesso ou contaminação de plasma seminal (urospermia ou hemospermia), cuja quantidade excessiva é nefasta para os espermatozóides, pode ser controlado pelo uso de uma vagina artificial aberta, tentando recolher apenas a fracção rica em espermatozóides. A luz directa é outros dos factores que deve ser evitado, dado que é nociva para os espermatozóides. A pipetagem e processamento seminal podem conduzir a quantificações incorrectas, resultando em diferenças entre amostras.

De seguida, procedeu-se ao processamento do sémen nos seguintes grupos de tratamento:

- A. Controlo
- B. Amostra incubada com 50pM de melatonina
- C. Amostra incubada com 100pM de melatonina

D. Amostra incubada com 200pM de melatonina

E. Amostra incubada com 1μM de melatonina

## 9.2 Protocolo laboratorial

1. Preparar duas amostras de melatonina em dimetilsulfóxido (DMSO), uma com a concentração de 10nM e outra com concentração 1mM. Isto porque a partir de uma alicuota de concentração 10nM, é necessário colocar 5μl em 1ml para obter a concentração de 50pM, 10μl para a de 100pM, 20μl para a de 200pM. Adicionando 1μl da alicuota de concentração 1ml obtém-se uma solução de concentração 1μM.
2. Preparar cinco tubos com 1ml de espermatozóides a uma concentração de cerca de  $100 \times 10^6$  espermatozóides/ml, adicionar as quantidades adequadas de melatonina a quatro destes (50pM, 100pM, 200pM e 1μM).
3. Medir a motilidade através do programa CASA, numa amostra de plasma seminal de concentração aproximada  $50 \times 10^6$  espermatozóides/ml.
4. Preparar quatro tubos de citómetro com 50μl sémen de cada uma das concentrações (aproximadamente  $5 \times 10^6$  espermatozóides) + 950μl PBS (*Phosphate Buffered Saline*), perfazendo um total de vinte tubos.
5. Medir, para cada série de quatro tubos os seguintes parâmetros:
  - Viabilidade e permeabilidade de membrana: Adicionar 2μl YO-PRO-1 (25μM) + 1μl Homodímero de Etídio-1 (1,167mM), incubar durante 16 minutos e realizar a medição no citómetro de fluxo.
  - Capacitação: Adicionar 1μl de Merocianina 540 (2,7μM) e incubar durante 25 minutos, ao final dos quais se adiciona SYTOX Green 1μl (0,5μM). Após incubação durante 5 minutos efectuar medição no citómetro de fluxo.
  - Peroxidação lipídica: Adicionar 1μl BODIPY<sup>581/591</sup>-C<sub>11</sub> (2μM) e incubar durante 30 minutos. Proceder à centrifugação durante 5 minutos a 1000 RPM (Rotações por minuto) e resuspender em 1ml PBS. Realizar a medição no citómetro.
  - Potencial de membrana mitocondrial: Adicionar 0,5μl JC-1 (3μM) e incubar durante 40 minutos. No final realizar a medição no citómetro de fluxo.
6. Manter a incubar durante três horas (tempo 2) e preparar novamente vinte tubos de citómetro com 50μl sémen + 950μl PBS.

7. Medir novamente a motilidade (CASA), assim como todos os parâmetros das amostras no citómetro, ou seja, repetindo o procedimento a partir do ponto 3.

### 9.3 Motilidade espermática

A cinética espermática foi determinada em todas as amostras nos tempos 1 (0h) e tempo 2 (3h), utilizando o sistema CASA (ISAS Proiser Valência, Espanha). A análise foi baseada no exame de três imagens digitais consecutivas obtidas de diferentes campos da mesma amostra, com uma objectiva de ampliação 10x em fase de contraste negativo, numa base aquecida a 37°C. O sémen foi introduzido em câmaras Leja (Leja Amsterdam, Holanda) de 20 µm de profundidade. O número de objectos incorrectamente identificados como espermatozóides foram minimizados no monitor através da função de playback. Relativamente aos parâmetros cinéticos, foram determinados os seguintes valores: espermatozóides imóveis quando  $VAP < 10 \mu\text{m}/\text{seg}$ , móveis se  $VAP > 15 \mu\text{m}/\text{seg}$  e linearmente móveis se o desvio da linha recta é superior a 45%.

Figura 1. Equipamento utilizado para medição de parâmetros através do CASA.



### 9.4 Citometria de fluxo

Neste trabalho a análise citométrica foi efectuada com o Coulter EPICS XL (Coulter Corporation Inc., Miami, FL, EUA) equipado com uma óptica standard, um laser de Argon (Cyronics, Coherent, Santa Clara, CA, EUA) que emite radiação de 488 nm, de 15 mW, e um software EXPO 2000. Encontravam-se activos os receptores FL-1 verde (band pass 530/30 nm), FL-2 laranja (band pass 585/42 nm) e FL-3 vermelho (long pass >670 nm), e os dados resultantes foram analisados pelo filter Flowjo™ software (Free Star Ashland, USA). Aproximadamente 10.000 espermatozoides/300 segundos foram analisados em cada amostra. As medições fluorescentes foram compensadas por forma a minimizar a fluorescência

excessiva entre o espectro vermelho e verde.

Figura 2. Citómetro de fluxo

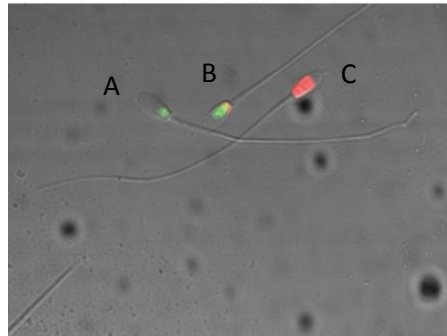


As diversas subpopulações foram divididas em quadrantes, sendo a frequência de cada uma quantificada. As partículas detectadas não espermáticas (*debris*) são eliminadas da análise através dos *dot-plots* de *forward scatter* e *side scatter*, efectuando uma triagem sobre a população celular de interesse. Partículas com características de dispersão semelhantes às do espermatozóide mas sem conteúdo de ADN suficiente foram também excluídos. Os detectores de radiação frontais e laterais estão regulados para a medição de 10 000 eventos por amostra no caso do YO-PRO-1 e Homodimero de Etídio-1, Merocianina 540, SYTOX Green, e BODIPY<sup>581/591</sup>-C<sub>11</sub>, ou de 30 000 eventos para o JC-1. A velocidade de medição foi mantida por volta das 200-300 células por segundo.

Todas as sondas foram provenientes da empresa Molecular Probes (Molecular Probes Europe, Leiden, Holanda).

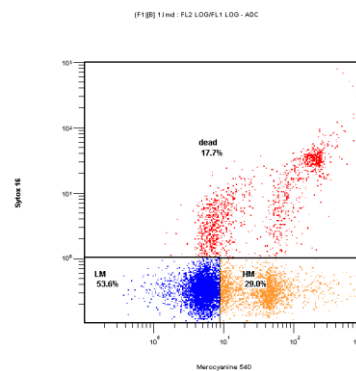
As alterações de membrana e viabilidade foram determinadas como descrito por Peña e seus colaboradores (2005), com modificações adaptadas à espécie equina (Ortega-Ferrusola, et al., 2008). Após colocação e incubação das sondas YO-PRO-1 e Homodimero de etídio-1, as amostras foram analisadas no citómetro, obtendo-se quatro populações distintas: espermatozóides vivos não corados; espermatozóides YO-PRO-1 positivos, indicando um aumento relativo na permeabilidade de membrana; uma terceira população de indivíduos corados com ambas as sondas, emitindo fluorescência verde e laranja e indicando células de necrose precoce; e por último a população corada apenas com o Homodimero de Etídio-1 e constituída por células que sofreram uma necrose prolongada. Na figura 3 podemos ver três exemplos de espermatozóides correspondentes a cada uma das populações nas quais os corantes penetram.

Figura 3. Espermatozoides de equino corados com YO-PRO-1 e Homodimero de etidio-1. (A) Fluorescência verde associada a fixação de YO-PRO-1. (B) Fluorescência verde e vermelha devido a fixação de ambas as sondas. (C) Fluorescência vermelha causada pela fixação de Homodimero de etidio-1. Imagem obtida por microscopia confocal Bio-Rad MRC com apiação de 60x.



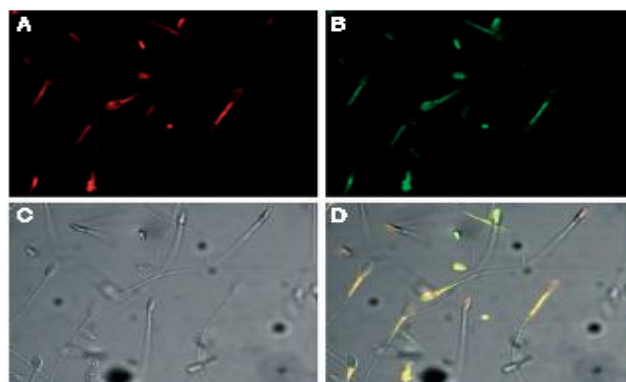
Para uma avaliação da capacitação espermática, neste trabalho foi utilizada a Merocianina 540 (M540), corante específico na detecção da desorganização lipídica, à qual se associou o corante vital SYTOX Green. Assim, a análise citométrica identificou, em regra, quatro subpopulações: espermatozoides mortos e vivos com baixa e alta desorganização membrana, apesar da quantificação populacional ser feita apenas com os espermatozoides mortos totais e vivos com pouca e elevada desorganização. A vantagem do uso do SYTOX neste trabalho é devida ao facto de este corante detectar apenas os espermatozoides efectivamente mortos, e não os com alterações de permeabilidade de membrana, como no caso do YO-PRO-1, o que leva a uma maior sobreposição com os espermatozoides corados com M540. Na figura 4 podemos ver um exemplo de um citograma de uma amostra corada com ambos os fluoróforos.

Figura 4. Citograma de amostra controlo corada com M540 e SYTOX Green. Fluorescência laranja (Merocyanine 540) e fluorescência verde (Sytox 16). (LM) População com baixa fluorescência de merocianina, ou seja, com pouca desorganização membrana. (HM) População com alta fluorescência de merocianina e alta desorganização de membrana. (dead) População de células mortas, com alta fluorescência de SYTOX Green.



A peroxidação lipídica foi avaliada através do corante BODIPY<sup>581/591</sup>-C11, sendo possível quantificar as células com emissão de fluorescência verde, ou seja, com elevada peroxidação lipídica. Foi possível detectar duas populações, uma com baixa fluorescência, ou seja, com reduzida peroxidação lipídica, e outra com alta intensidade fluorescente, significativa de uma elevada peroxidação. Isto porque esta sonda lipofílica se integra na membrana, sofrendo ataque pelos radicais já referidos alcóxil e peróxil, produzidos na peroxidação lipídica. Com o protocolo utilizado, as amostras coradas com BODIPY são centrifugadas a 1000 RPM durante 5 minutos, após incubação, de modo a que se possa remover o excesso de sonda não fixada aos espermatozóides. Na figura 5 podemos observar a diferente intensidade de fluorescência emitida pelos espermatozóides oxidados.

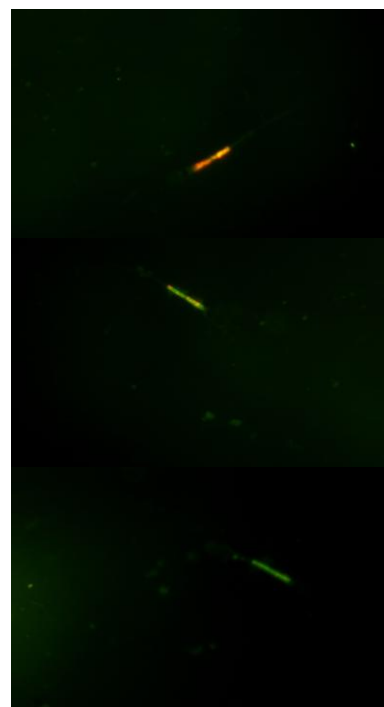
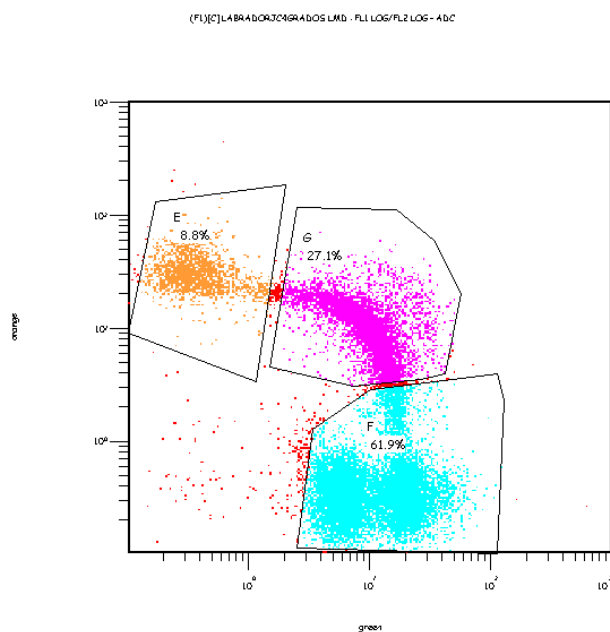
Figura 5. Espermatozóides corados com a sonda BODIPY-C11. (A) Fluorescência vermelha associada à dispersão de sonda não oxidada. (B) Fluorescência verde devida à oxidação da sonda. (C) Imagem de transmissão. (D) Sobreposição das imagens em que as áreas de peroxidação lipídica aparecem a amarelo. Imagens de microscopia confocal (Bio-Rad MRC) com uma ampliação de 60x.



A sonda JC-1 foi utilizada na testagem do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), por ser capaz de diferenciar as populações de baixo, médio e elevado potencial, obtendo-se três populações distintas, como podemos observar no citograma e imagens de microscopia expostas na figura 6. A diminuição do metabolismo mitocondrial é reflectida pela passagem gradual de fluorescência laranja para verde.

Figura 6. Citograma de espermatozóides corados com a sonda JC-1 e respectiva imagem de microscopia confocal. Pode detectar-se fluorescência concentrada na peça intermédia, fornecendo informação acerca do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). (E) População com emissão de fluorescência laranja. (E1) Espermatozóide referente à população E. (G) População com emissão mista de fluorescência (laranja e verde). (G1) Espermatozóide referente à população G. (F) População com emissão de fluorescência verde. (F1) Espermatozóide referente à população F. Imagem obtida por microscopia confocal Bio-Rad MRC com ampliação de 60x.

Figura 6 (continuação)



### 9.5 Microscopia de laser confocal

O padrão de fixação de cada corante pode ser confirmado através do uso de um microscópio de laser confocal, sendo possível identificar indivíduos em diferentes estádios. Foi utilizado um microscópio de espectro invertido (Bio-Rad MRC 1024; Hercules, CA), excitando-se as amostras com um laser Argon 488 nm, e colocando vários filtros para detecção dos diferentes espectros de fluorescência.

### 9.6 Análise estatística

Os dados foram inicialmente analisados pelo teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a homogeneidade e determinar sua distribuição. Dada a distribuição em curva não Gaussiana de alguns dos valores, foi realizada uma análise ANOVA de multivariantes, efectuando-se um teste não paramétrico Mann-Whitney U para comparação de pares de valores, quando detectadas diferenças significativas. Todas as análises foram efectuadas com uma versão do SPSS 15.0 para o Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A significância estatística foi estabelecida em  $P < 0.05$ .

## 10. Resultados

Em termos de motilidade, não foram detectadas alterações significativas após incubação com

as diferentes concentrações de melatonina (tabela 1), apesar de se verificar uma diminuição relativa das motilidades total e progressiva em todas as amostras quando comparados com os resultados obtidos após três horas de incubação (tabela 2). As velocidades detectadas (curvilínea, linear e média) também reduziram de forma relativamente progressiva entre o tempo 1 e o tempo 2. Os restantes coeficientes espermáticos mantiveram-se relativamente constantes tanto entre horas como entre amostras analisadas. Quanto aos parâmetros previamente relacionados com a capacitação espermática (VCL, ALH e LIN), podemos constatar em ambas as tabelas 1 e 2, que estes não sofreram alterações que permitissem considerar os espermatozóides como hiperactivados.

Tabela 1. Médias dos diversos parâmetros de motilidade ao tempo 1 (0h). MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade linear; VAP: velocidade média, ALH: média do deslocamento lateral da cabeça, LIN: coeficiente de linearidade, STR: coeficiente de rectidão, WOB: coeficiente de *Wobbler*, BCF: número de vezes que a cabeça cruza a trajectória média por segundo. (n= 4 garanhões, 3 ejaculados cada, médias±S.D).

	<b>Controlo</b>	<b>50pM</b>	<b>100pM</b>	<b>200pM</b>	<b>1µM</b>
<b>MT</b>	73,0±2,87	67,58±3,05	67,17±2,87	64,3±2,87	70,0±2,87
<b>MP</b>	47,0±2,67	44,8±2,83	41,4±2,67	38,8±2,67	44,8±2,67
<b>VCL</b>	69,9±3,17	71,1±3,36	64,9±3,17	61,4±3,17	69,8±3,17
<b>VSL</b>	28,0±1,40	29,8±1,49	26,2±1,40	24,8±1,40	27,5±1,40
<b>VAP</b>	35,5±1,61	37,2±1,70	33,1±1,61	31,1±1,61	34,7±1,61
<b>ALH</b>	3,2±0,17	3,2±0,18	3,0±0,17	2,9±0,17	3,1±0,17
<b>LIN</b>	40,0±0,92	41,9±0,98	40,3±0,92	40,4±0,92	39,4±0,92
<b>STR</b>	78,7±0,93	80,3±0,99	79,2±0,93	79,8±0,93	78,8±0,93
<b>WOB</b>	50,9±0,93	51,8±0,76	50,8±0,72	50,5±0,72	49,8±0,72
<b>BCF</b>	12,3±0,27	12,8±0,29	12,2±0,27	12,2±0,27	12,3±0,27

Tabela 2. Médias dos diversos parâmetros de motilidade ao tempo 2 (3h). MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade linear; VAP: velocidade média, ALH: média do deslocamento lateral da cabeça, LIN: coeficiente de linearidade, STR: coeficiente de rectidão, WOB: coeficiente de *Wobbler*, BCF: número de vezes que a cabeça cruza a trajectória média por segundo. (n= 4 garanhões, 3 ejaculados cada, médias±S.D).

Tabela 2 (continuação)

	<b>Controlo</b>	<b>50pM</b>	<b>100pM</b>	<b>200pM</b>	<b>1µM</b>
<b>MT</b>	62,8±4,60	59,5±4,75	50,6±4,60	52,5±4,60	56,2±4,60
<b>MP</b>	35,4±3,48	34,0±3,60	27,7±3,48	25,2±3,48	32,4±3,48
<b>VCL</b>	56,6±2,41	58,3±2,49	55,7±2,41	49,5±2,41	59,5±2,41
<b>VSL</b>	21,5±1,06	22,8±1,09	22,0±1,06	18,8±1,06	23,8±1,06
<b>VAP</b>	27,8±1,28	29,2±1,32	27,7±1,28	24,3±1,28	30,1±1,28
<b>ALH</b>	3,1±0,12	3,0±0,12	2,9±0,12	2,8±0,12	3,1±0,12
<b>LIN</b>	38,3±0,80	39,4±0,83	39,3±0,80	38,4±0,80	40,1±0,80
<b>STR</b>	77,8±0,80	79,0±0,83	79,0±0,80	77,4±0,80	79,0±0,80
<b>WOB</b>	49,1±0,64	49,7±0,66	49,9±0,64	49,6±0,64	50,5±0,64
<b>BCF</b>	11,2±0,27	11,6±0,28	11,3±0,27	11,4±0,27	11,4±0,27

A única alteração efectiva consistiu na diminuição na população de células que sofreram uma apoptose recente, ou seja, espermatozóides YO-PRO+/Eth+, quando submetidas à incubação com todas as concentrações de melatonina, apenas após incubação prolongada (tabela 4). Por comparação das figuras 7 e 8, ambas resultado de uma análise citométrica realizada às três horas de incubação, podemos confirmar que ocorre um claro desvio à esquerda da população de células apoptóticas, mantendo-se aproximadamente a mesma população de células vivas.

Tabela 3. Médias dos valores de viabilidade espermática e permeabilidade de membrana ao tempo 1 (0h). YO-PRO-/Eth-: espermatozóides viáveis não corados, YO-PRO+: espermatozóides com aumento na permeabilidade membranar e apoptose recente, fluorescência verde, YO-PRO+/Eth+: células em apoptose tardia, fluorescendo em verde e vermelho; Eth+: espermatozóides necróticos com fluorescência vermelha. (n= 4 garanhões, 3 ejaculados cada, médias±S.D).

	<b>Controlo</b>	<b>50pM</b>	<b>100pM</b>	<b>200pM</b>	<b>1µM</b>
<b>YO-PRO-/Eth-</b>	76,0±1,62	76,1±1,52	73,3±1,52	71,9±1,52	74,1±1,52
<b>YO-PRO+</b>	3,1±0,66	3,3±0,62	3,3±0,62	3,0±0,62	3,0±0,62
<b>YO-PRO+/Eth+</b>	1,4±0,20	1,3±0,18	1,5±0,18	1,5±0,18	1,3±0,18
<b>Eth+</b>	19,6±1,30	19,2±1,22	22,0±1,22	23,6±1,22	21,6±1,21

Tabela 4. Médias dos valores de viabilidade espermática e permeabilidade de membrana ao tempo 2 (3h). YO-PRO-/Eth-: espermatozóides viáveis não corados, YO-PRO+: espermatozóides com aumento na permeabilidade membranar e apoptose recente, fluorescência verde, YO-PRO+/Eth+: células em apoptose tardia, fluorescendo em verde e vermelho; Eth+: espermatozóides necróticos com fluorescência vermelha. (n= 4 garanhões, 3 ejaculados cada, médias±S.D).

	Controlo	50pM	100pM	200pM	1µM
<b>YO-PRO-/Eth-</b>	69,8±1,41	69,6±1,41	70,3±1,41	67,4±1,41	70,8±1,41
<b>YO-PRO+</b>	3,2±0,70	2,6±0,70	1,0±0,70	2,3±0,70	1,6±0,70
<b>YO-PRO+/Eth+</b>	3,87±0,47 <sup>a</sup>	1,6±0,47 <sup>b</sup>	1,1±0,47 <sup>b</sup>	1,3±0,47 <sup>b</sup>	1,1±0,47 <sup>b</sup>
<b>Eth+</b>	23,1±1,26	26,3±1,26	27,6±1,26	29,0±1,26	26,5±1,26

a-b, valores com diferentes superíndices na mesma linha diferem estatisticamente p<0.05

Figura 7. Citograma de amostra controlo corada com YO-PRO-1 e Homodimero de etidio-1, ao tempo 2 (3h). (E1) População de mortos, ou seja, Eth+. (E2) População sujeita a fenómeno apoptótico recente, YO-PRO+/Eth+. (E3) População de vivos. (E4) População de permeabilidade de membrana alterada (YO-PRO+).

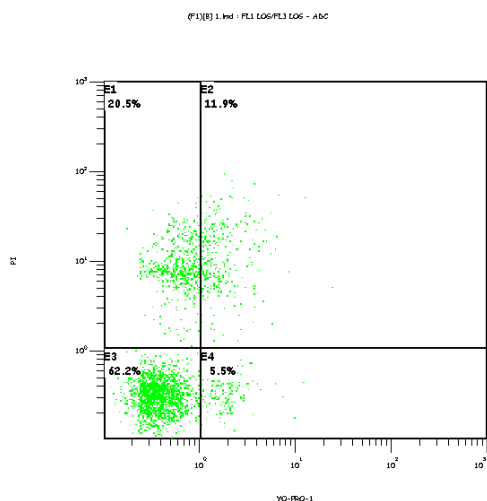
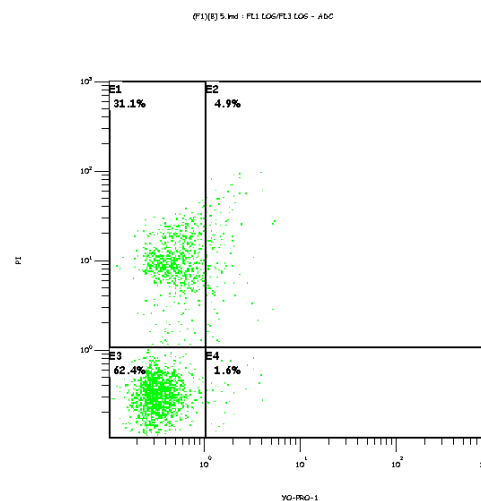


Figura 8. Citograma de amostra incubada com 1µM de melatonina, corada com YO-PRO-1 e Homodimero de etidio-1, ao tempo 2 (3h). (E1) População de mortos, ou seja, Eth+. (E2) População sujeita a fenómeno apoptótico recente, YO-PRO+/Eth+. (E3) População de vivos. (E4) População de permeabilidade de membrana alterada (YO-PRO+).



Os valores de desorganização membranar, detectados pela Merocianina 540, mantiveram-se aproximadamente iguais. Porém, foram identificadas ligeiras diferenças tanto ao tempo 1 horas e apenas para a concentração 200pM, onde ocorreu um aumento na população com alta intensidade de M540, como ao tempo 2, para a concentração de 50pM, onde se detectou um aumento na mesma população (tabelas 5 e 6). Estes dados podem ser confirmados pela

observação das figuras 9 e 10, onde se detecta claramente o aumento na população com alta desorganização membranar, na amostra incubada com 50pM de melatonina.

Os resultados obtidos sugerem que a desorganização membranar não constitui um fenómeno constante, ou que a melatonina não actua de forma uniforme, e que, em qualquer um dos casos, a adição desta hormona ao meio favorece de alguma forma a ocorrência deste fenómeno.

Contudo, os valores provenientes da utilização desta sonda não constituem uma fonte exacta de determinação do estado de capacitação, dado que está demonstrado que este fenómeno é altamente dependente da presença de bicarbonato no meio (Rathi, et al., 2001), assim como de cálcio, substâncias não utilizadas nesta experiência.

Tabela 5. Médias dos valores de desorganização lipídica membranar ao tempo 1 (0h). Mero-Low: espermatozóides com pouca alteração membranar, com baixa fluorescência laranja, Mero-High: espermatozóides com membrana altamente desordenada e fluorescência laranja, Dead: espermatozóides mortos corados com SYTOX green e fluorescência verde. (n= 4 garanhões, 3 ejaculados cada, médias±S.D).

	<b>Controlo</b>	<b>50pM</b>	<b>100pM</b>	<b>200pM</b>	<b>1µM</b>
<b>Mero-Low</b>	42,9±2,68 <sup>a</sup>	39,2±2,68	35,6±2,68	30,9±2,68 <sup>b</sup>	36,5±2,68
<b>Mero-High</b>	34,3±2,77 <sup>a</sup>	39,6±2,77	42,1±2,77	47,1±2,77 <sup>b</sup>	42,8±2,77
<b>Dead</b>	23,3±1,90	21,6±1,90	22,7±1,90	22,6±1,90	21,2±1,90

a-b, valores com diferentes superíndices na mesma linha diferem estatisticamente p<0.05

Tabela 6. Médias dos valores de desorganização lipídica membranar ao tempo 2 (3h). Mero-Low: espermatozóides com pouca alteração membranar, com baixa fluorescência laranja, Mero-High: espermatozóides com membrana altamente desordenada e fluorescência laranja, Dead: espermatozóides mortos corados com SYTOX green e fluorescência verde. (n= 4 garanhões, 3 ejaculados cada, médias±S.D).

	<b>Controlo</b>	<b>50pM</b>	<b>100pM</b>	<b>200pM</b>	<b>1µM</b>
<b>Mero-Low</b>	44,5±2,41 <sup>a</sup>	35,6±2,41 <sup>b</sup>	38,5±2,27	38,0±2,27	39,1±2,27
<b>Mero-High</b>	31,5±3,16 <sup>a</sup>	40,7±3,16 <sup>b</sup>	34,7±2,98	35,2±2,98	36,6±2,98
<b>Dead</b>	24,4±2,01	24,1±2,01	27,2±1,89	26,8±1,89	24,8±1,89

a-b, valores com diferentes superíndices na mesma linha diferem estatisticamente p<0.05

Figura 9. Citograma de amostra controlo corada com M540 e SYTOX Green, ao tempo 2 (3h). Identificação de três populações: (LM) baixa intensidade de merocianina. (HM) alta intensidade de merocianina. (dead) alta intensidade de SYTOX Green.

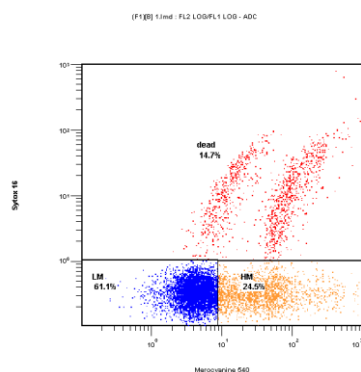


Figura 10. Citograma de amostra incubada com 50pM de melatonina, corada com M540 e SYTOX Green, ao tempo 2 (3h). Identificação de três populações: (LM) baixa intensidade de merocianina. (HM) alta intensidade de merocianina. (dead) alta intensidade de SYTOX Green.

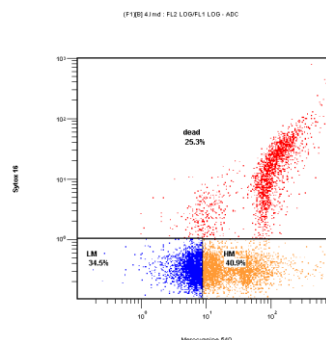


Tabela 7. Médias dos valores de peroxidação lipídica espermática ao tempo 1 (0h). BODIPY-E2: espermatozóides com alguma peroxidação lipídica e fluorescência verde, BODIPY-E4: espermatozóides com elevada peroxidação lipídica e acentuada fluorescência verde. (n= 4 garanhões, 3 ejaculados cada, médias±S.D).

	Controlo	50pM	100pM	200pM	1µM
<b>BODIPY-E2</b>	7,7±0,52 <sup>a</sup>	5,9±0,52	4,9±0,52	4,1±0,52 <sup>b</sup>	3,7±0,52 <sup>b</sup>
<b>BODIPY-E4</b>	14,6±1,14 <sup>a</sup>	7,1±1,14	4,7±1,14	2,8±1,14 <sup>b</sup>	2,6±1,14 <sup>b</sup>

a-b, valores com diferentes superíndices na mesma linha diferem estatisticamente p<0.05

Tabela 8. Médias dos valores de peroxidação lipídica espermática ao tempo 2 (3h). BODIPY-E2: espermatozóides com alguma peroxidação lipídica e fluorescência verde, BODIPY-E4: espermatozóides com elevada peroxidação lipídica e acentuada fluorescência verde. (n= 4 garanhões, 3 ejaculados cada, médias±S.D).

	Controlo	50pM	100pM	200pM	1µM
<b>BODIPY-E2</b>	9,5±0,71 <sup>a</sup>	7,1±0,71 <sup>b</sup>	5,9±0,71 <sup>b</sup>	5,8±0,71 <sup>b</sup>	5,2±0,71 <sup>b</sup>
<b>BODIPY-E4</b>	22,4±1,37 <sup>a</sup>	12,0±1,37 <sup>c</sup>	8,3±1,37 <sup>c</sup>	7,1±1,37 <sup>c</sup>	5,3±1,37 <sup>c</sup>

a-b, valores com diferentes superíndices na mesma linha diferem estatisticamente p<0.05

a-c, valores com diferentes superíndices na mesma linha diferem estatisticamente p<0.01

Como se pode confirmar nas figuras 11 e 12, a peroxidação lipídica consistiu no parâmetro cujos valores sofreram maior variação. Tanto em ambos os tempos de incubação (zero e três horas de incubação), como em ambas as populações (BODIPY-E2 e BODIPY-E4), foi claro um aumento da peroxidação nas amostras control, contrastante com uma diminuição significativa na peroxidação das amostras incubadas com melatonina. Contudo, ao tempo 1 (tabela 7) apenas as concentrações mais elevadas de hormona foram efectivas na redução da peroxidação, enquanto que ao tempo 2 (tabela 8), todas as concentrações exerceram efeito. Esta alteração também pode ser confirmada por comparação das figuras 13 e 14, em que se constata uma clara diminuição da população (E4), quando se introduz a melatonina no meio. O aumento das diferenças detectadas ocorre proporcionalmente ao aumento do tempo de incubação, assim como ao aumento da quantidade de melatonina na amostra, indiciando esta substância como uma potente protectora da peroxidação e do stress oxidativo em espermatozóides.

Figura 11. Espermatozóides provenientes de uma amostra controlo corada com C11-BODIPY<sup>581/591</sup>. Pode observar-se a destacada fluorescência verde, mais intensa na peça intermédia, resultante da peroxidação lipídica. Imagem obtida por microscopio confocal Bio-Rad MRC com aplicação de 60x.

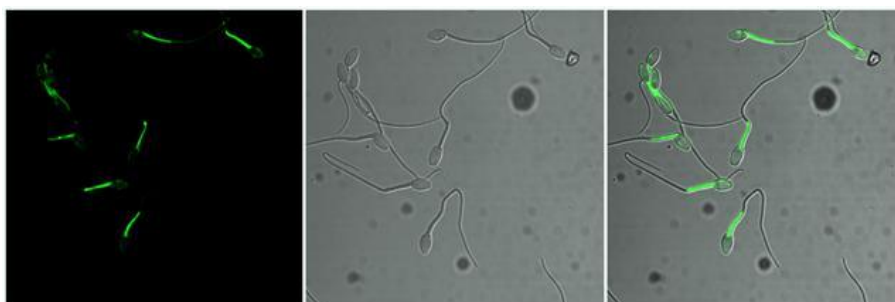


Figura 12. Espermatozóides provenientes de uma amostra incubada com 1 $\mu$ M de melatonina corada com C11-BODIPY<sup>581/591</sup>. Fluorescência verde indicativa de uma reduzida peroxidação lipídica. Imagem obtida por microscopio confocal Bio-Rad MRC com aplicação de 60x.

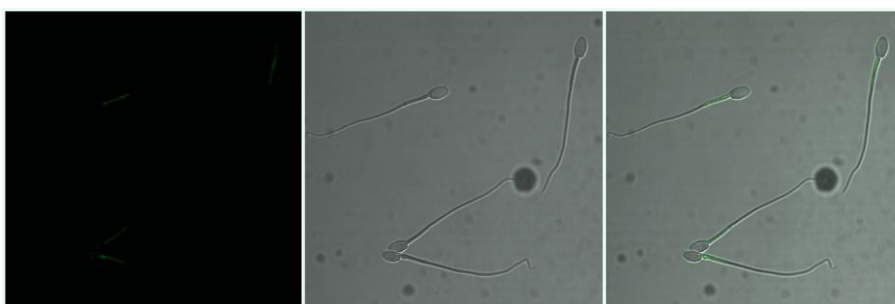


Figura 13. Citograma de amostra controlo corada com C11-BODIPY<sup>581/591</sup>, ao tempo 2 (3h). Fluorescência vermelha (PI) e verde (YO-PRO-1). Distinção entre três populações: (E1) espermatozóides não peroxidados. (E2) espermatozóides ligeiramente peroxidados. (E4) células muito peroxidadas.

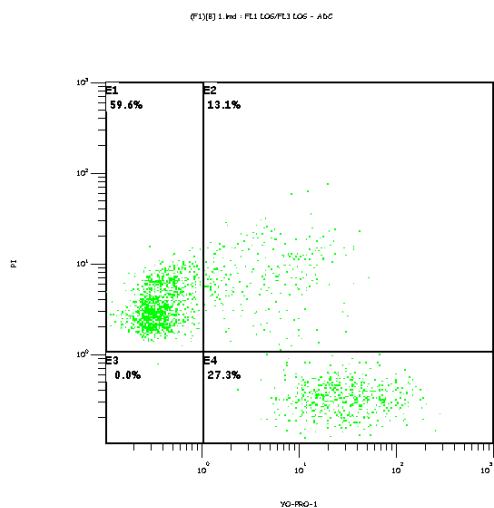
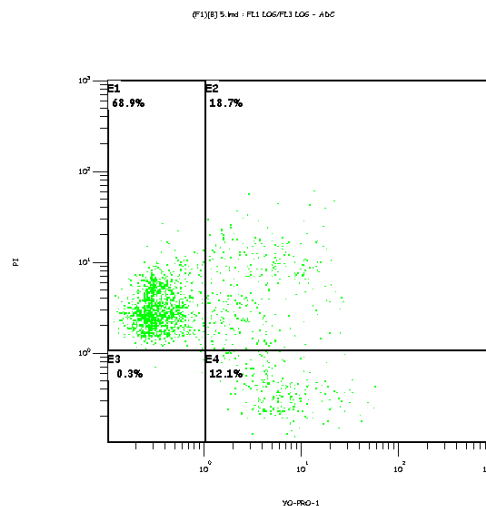


Figura 14. Citograma de amostra incubada com 1µM de melatonina, corada com C11-BODIPY<sup>581/591</sup>, ao tempo 2 (3h). Fluorescência vermelha (PI) e verde (YO-PRO-1). Distinção entre três populações: (E1) espermatozóides não peroxidados. (E2) espermatozóides ligeiramente peroxidados. (E4) células muito peroxidadas.



Quanto ao potencial de membrana mitocondrial, embora não fossem detectadas variações ao tempo 1, ocorreram diferenças entre os valores de potencial de membrana mitocondrial, detectados nas amostras incubadas durante 3h com 1µM de melatonina. A população heterogénea, ou seja, com mitocôndrias de alto e baixo potencial, aumentou no caso da amostra incubada com 1µM, isto ao tempo 2 (tabela 10), enquanto que a população de baixo potencial mitocondrial sofreu uma diminuição na mesma amostra, indicando um efeito protector da concentração mais elevada. Na população de alto potencial não se detectaram alterações, embora reduza de forma geral após incubação prolongada (tabelas 9 e 10). Por análise das figuras 15 e 16 podemos também constatar este efeito, sendo que após incubação durante três horas, ocorre uma diminuição na população de baixo potencial (F) e um aumento na população mista (I).

Tabela 9. Médias dos valores de potencial de membrana mitocondrial ao tempo 1 (0h). Orange: espermatozóides com alto potencial de membrana e fluorescência laranja, Orange+Green: células com mitocôndrias heterogéneas, com alto e baixo potencial mitocondrial no mesmo espermatozóide, Green: espermatozóides com baixo potencial de membrana e fluorescência verde. (n= 4 garanhões, 3 ejaculados cada, médias±S.D).

Tabela 9. (continuação)

	<b>Controlo</b>	<b>50pM</b>	<b>100pM</b>	<b>200pM</b>	<b>1µM</b>
<b>Orange</b>	19,4±4,16	21,5±4,16	18,7±4,30	20,9±4,16	21,9±4,16
<b>Orange+Green</b>	41,0±4,60	43,4±4,60	46,0±4,75	41,9±4,60	42,9±4,60
<b>Green</b>	39,5±5,33	35,0±5,33	35,2±5,50	37,2±5,33	35,1±5,33

Tabela 10. Médias dos valores de potencial de membrana mitocondrial ao tempo 2 (3h). Orange: espermatozóides com alto potencial de membrana e fluorescência laranja, Orange+Green: células com mitocôndrias heterogêneas, com alto e baixo potencial mitocondrial no mesmo espermatozóide, Green: espermatozóides com baixo potencial de membrana e fluorescência verde. (n= 4 garanhões, 3 ejaculados cada, médias±S.D).

	<b>Controlo</b>	<b>50pM</b>	<b>100pM</b>	<b>200pM</b>	<b>1µM</b>
<b>Orange</b>	13,2±3,32	10,3±3,32	12,6±3,32	13,8±3,32	13,4±3,32
<b>Orange+Green</b>	44,3±2,32 <sup>a</sup>	45,0±2,32	43,3±2,32	44,9±2,32	52,7±2,32 <sup>b</sup>
<b>Green</b>	42,5±3,79 <sup>a</sup>	44,6±3,79	44,0±3,79	41,1±3,79	33,8±3,79 <sup>b</sup>

a-b, valores com diferentes superíndices na mesma linha diferem estatisticamente p<0.05

Figura 15. Citograma de amostra controlo corada com JC-1, ao tempo 2 (3h). Detecção de fluorescência verde (green) e laranja (orange). Distinção entre três populações: (H) alto potencial de membrana. (I) potencial intermédio de membrana. (F) baixo potencial.

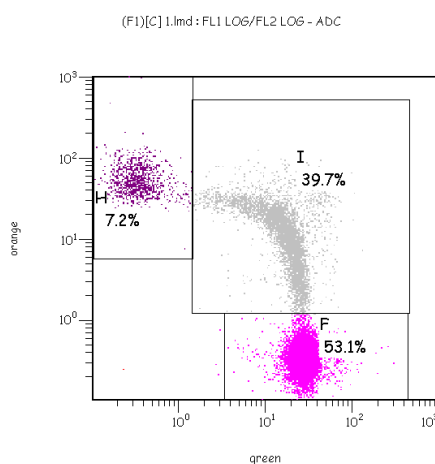
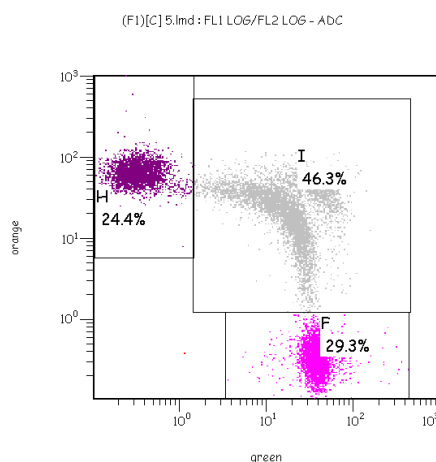


Figura 16. Citograma de amostra incubada com 1 $\mu$ M de melatonina, corada com JC-1, ao tempo 2 (3h). Detecção de fluorescência verde (green) e laranja (orange). Distinção entre três populações: (H) alto potencial de membrana. (I) potencial intermédio de membrana. (F) baixo potencial.



Foram encontradas diferenças significativas entre os quatro indivíduos (não apresentadas) em todos os parâmetros espermáticos analisados (dados não expostos). Por esta razão, os gráficos de citómetro apresentados não podem ser considerados como representativos dos resultados globais, senão apenas exemplificativos de alguns dos valores obtidos.

## 11. Discussão

A análise dos dados obtidos permite concluir que em termos de parâmetros cinéticos não ocorreram alterações, após introdução de melatonina no meio e incubação prolongada. Foi recentemente efectuada uma avaliação semelhante em sémen humano, comparando os valores dos controlos com os de amostras submetidas a uma concentração de melatonina de 1mM, 30 minutos antes da exposição a dois agentes oxidantes: um agonista mobilizador de cálcio e peróxido de oxigénio, com posterior detecção de vários valores, entre eles a produção de espécies reactivas de oxigénio nas mitocôndrias e viabilidade celular. Em todas as provas realizadas, a incubação com melatonina melhorou os parâmetros medidos, apesar de esta melhoria não se verificar em células não submetidas ao contacto prévio com as espécies oxidantes. Confirmou-se pela primeira vez com este trabalho o papel protector da melatonina contra o stress oxidativo e apoptose em espermatozóides humanos, consequência directa ou indirecta da sua acção quelante de radicais livres (Espino, et al., 2010). Comparando estes resultados com os do trabalho realizado (tabelas 1 e 2), para além da utilização de outra espécie, considera-se que a principal diferença se deve ao facto de não se terem exposto as amostras a nenhum tipo de estímulo oxidativo adicional, pelo qual os resultados podem não

ter revelado uma correlação tão inequívoca como os obtidos por esta equipa. Ainda assim, a detecção de uma diminuição significativa na população celular que sofreu uma apoptose recente (YO-PRO+/Eth+), associada ao relativo aumento de células mortas (Eth+), permite considerar um efeito subtil da melatonina como protectora da apoptose celular, podendo considerar-se que esta hormona antioxidante não actua sobre as células cujo processo apoptótico é já decorrente, mas bloqueia de certa forma início deste processo e o aumento da permeabilidade de membrana (tabelas 3 e 4).

Um estudo idêntico em espermatozóides de ovino (Casao, et al., 2010), submetem-se as células a concentrações de melatonina de 1 $\mu$ M, 10nM e 100pM, e efectuaram-se análises de motilidade às zero, uma e três horas de incubação, através do programa informático CASA; e citométricas, para avaliação da viabilidade, por integridade da membrana plasmática, estado de capacitação, detecção da translocação membranária de fosfatidilserina e ainda avaliação da fertilidade por processo de fertilização *in vitro*. Na análise dos resultados obtidos, concluiu-se que não ocorreram alterações na motilidade e viabilidade espermática, dados relativamente concordantes com os obtidos no trabalho realizado. Em termos de desorganização de membrana, 1 $\mu$ M de melatonina diminuiu a proporção de células com membrana alterada, enquanto que 100pM aumentou este valor. Neste caso, comparando com o trabalho realizado, tanto a concentração 50pM como a de 200pM, respectivamente às zero e três horas, foram favorecedoras deste processo, não se detectando qualquer alteração com a concentração 1 $\mu$ M. Esta diferença pode dever-se ao facto de não ter sido utilizado qualquer meio capacitante, pelo que este processo não sofreu uma análise em condições fisiológicas. De qualquer das formas, pode considerar-se que concentrações relativamente baixas de melatonina, como sendo 50 e 200pM, favorecem a desorganização membranar. Quanto ao estado apoptótico, no trabalho de (Casao, et al., 2010), detectou-se um aumento de espermatozóides alterados e mortos com a exposição a 100pM ao tempo zero horas, e uma diminuição destes após três horas de exposição a 1 $\mu$ M de melatonina, sendo que concentrações inferiores foram incapazes de exercer este efeito protector. No trabalho realizado, a viabilidade espermática apenas sofreu uma variação na população de células que sofreram apoptose recente, não se estabelecendo uma relação inequívoca entre estes dois factores.

A actividade anti-apoptótica da melatonina foi comprovada também em outras células por (Choi, et al., 2008), remetendo para a capacidade de neutralização directa de um elevado numero de radicais livres tóxicos (Peyrot, Houee-Levin, & Ducrocq, 2006) e aumento da expressão genética das enzimas antioxidantes (Reiter, et al., 2000).

Quanto aos valores de fertilização *in vitro* no trabalho de (Casao, et al., 2010), em carneiros, foram as amostras submetidas a menores concentrações de melatonina que obtiveram os melhores resultados, sendo a concentração 100pM significativamente mais vantajosa que a de 1µM. Isto pode dever-se ao facto de uma menor concentração provocar um aumento de células capacitadas, permitindo uma fertilização precoce. Fujinoki e a sua equipa (2008), comprovaram este efeito da melatonina sobre a capacitação e hiperactivação espermática, obtendo os melhores resultados com a concentração 1nM, em espermatozóides de hamster. Isto pode associar-se a uma elevada concentração fisiológica de melatonina no tracto reprodutivo feminino, e especificamente no fluído folicular, interveniente na aceleração destes processos. No trabalho efectuado por (Ronnberg, Kauppila, Leppaluoto, Martikainen, & Vakkuri, 1990), já tinha sido comprovado este dado, pela detecção de concentrações mais elevadas de melatonina em fluido pré-ovulatório folicular humano, quando comparadas com a concentração sérica.

Contudo, o efeito inibitório de uma dose mais elevada de melatonina (1µM) na capacitação pode ser contrariado pelo efeito capacitante da adição ao meio de fertilização de soro de ovelha em estro e/ou heparina e hipotaurina (Casao, et al., 2010). Estes dados são parcialmente coincidentes com os resultados obtidos no trabalho realizado, dado que apenas em duas das concentrações utilizadas (50 e 200pM) a melatonina exerceu um efeito potenciador da desorganização membranar e possivelmente capacitação, apesar de este variar consoante o tempo de incubação. Mais uma vez, o facto de não ter sido utilizado qualquer meio capacitante impede a correcta comparação destes dados com os obtidos em outros trabalhos.

Para poderem ser hiperactivados, os espermatozóides de hamster necessitam cálcio extracelular e albumina. Dado que a melatonina aumenta significativamente a hiperactivação nestas condições, pode concluir-se que esta hormona é reguladora desta função. Isto pode dever-se à propriedade da melatonina de diminuição da produção de AMP cíclico e de óxido nítrico nas células e tecidos (Frungeri, et al., 2005). Dado que o movimento flagelar espermático é dependente do AMP cíclico, e uma baixa concentração de óxido nítrico tem uma influência positiva na capacitação (apesar da acção nefasta de grandes quantidades) (Agarwal, Makker, & Sharma, 2008), podemos concluir que a melatonina diminui a quantidade de óxido nítrico, modulando a capacitação espermática. No trabalho realizado apenas as concentrações de 50pM e 200pM pareceram ter influência marcada sobre a desorganização lipídica na membrana, não parecendo ocorrer qualquer diminuição desta com

a adição de uma concentração mais elevada.

O efeito duplo da melatonina na capacitação pode ainda ser explicado pela sua capacidade como antioxidante: doses reduzidas desta hormona poderão melhorar a capacitação por diminuição de radicais livres e espécies reactivas de oxigénio (Tamura, et al., 2008), permitindo que algumas destas substâncias continuem a actuar como mensageiros secundários (de Lamirande & Gagnon, 1993), enquanto que doses elevadas impedem a capacitação por remoção de todos os agentes oxidantes, assim como antioxidantes como a superóxido dismutase e a catalase (Drevet, 2006). A acção bloqueadora da capacitação detectada pode ainda ser explicada por ligação da melatonina à proteína intracelular calmodulina, como descrito por (Bendahmane, Lynch, & Tulsiani, 2001; Tulsiani, Zeng, & Abou-Haila, 2007).

Espermatozóides capacitados exibem a reacção acrossómica e hiperactivação, sendo que está comprovado que a progesterona, o factor de crescimento da zona pelúcida e a serotonina favorecem a reacção acrossómica. No estudo de Fujinoki (2008), concluiu-se adicionalmente que a hiperactivação espermática no tracto reprodutor feminino está provavelmente dependente da melatonina produzida e secretada pelos ovários. Neste estudo concluiu-se que a melatonina em concentrações de 1pM a 1µM aumenta a hiperactivação mas não a motilidade espermática.

A peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados da membrana lipídica é considerado um dos mecanismos que impede a função espermática (Aitken, Clarkson, & Fishel, 1989). O alto conteúdo em ácidos gordos deste tipo na membrana espermática é necessário para uma adequada fluidez e conseqüente motilidade, integridade estrutural e ainda permitir a correcta fusão de membranas, indispensável à fertilização. Como explicado anteriormente, a elevada susceptibilidade dos espermatozóides à oxidação reside principalmente na elevada quantidade deste tipo de ácidos gordos, que constituem um alvo fácil das espécies reactivas de oxigénio, resultando numa diminuição da motilidade espermática, presumivelmente por uma perda rápida de ATP intracelular, o que danifica o axonema (de Lamirande & Gagnon, 1993), assim como um aumento nos defeitos morfológicos da peça intermédia, afectando a capacitação espermática e a reacção do acrossoma (Rao & Gangadharan, 2008).

No trabalho realizado foi a peroxidação lipídica o parâmetro mais afectado pela acção antioxidante da melatonina. Enquanto que na primeira medição, o efeito apenas se detectou nas amostras incubadas com 200pM e 1µM, às três horas este efeito foi significativo em todas as amostras incubadas com melatonina, sendo mais acentuado consoante maior a concentração de hormona.

(Baumber, et al., 2000), comprovou a produção de peróxido de hidrogénio e anião superóxido pelos espermatozóides equinos, em condições de elevado stress oxidativo, que têm como consequência a redução da motilidade mas não da viabilidade ou integridade acrossómica. O facto de não ter sido detectada uma maior peroxidação lipídica ou uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial (associado com a síntese de ATP, transporte de proteínas e metabolitos e homeostase do cálcio), surgiu como argumento de que a motilidade é o melhor indicador para o estado de oxidação destas células. Contudo, no trabalho realizado, não foram detectadas quaisquer alterações significativas na cinética espermática, apesar da marcada redução na peroxidação lipídica membranar. Esta constatação pode surgir como indício de que a motilidade e peroxidação são afectadas por um mecanismo diferente ou ainda que a melatonina não exerce um efeito declarado sobre a cinética espermática.

Por comparação entre as figuras 11 e 12 pode constatar-se que a produção de espécies reactivas de oxigénio e consequente peroxidação lipídica se dá principalmente na peça intermédia, ou seja, onde se concentram as mitocôndrias, e que o efeito protector da melatonina se exerce sobre esta área. Este dado é coincidente com o trabalho desenvolvido por Koppers e a sua equipa (2008).

Quanto ao potencial de membrana mitocondrial, as ligeiras diferenças detectadas, apenas ao tempo três horas, são principalmente significativas nas amostras incubadas com a concentração mais elevada de melatonina, ocorrendo uma clara diminuição da população de mitocôndrias com baixo potencial de membrana, e um aumento na população mista, ou seja, com baixo e alto potencial. Este papel protector da melatonina sobre a funcionabilidade mitocondrial é consistente com o estudo elaborado por (Brown, 1992), que estabeleceu uma relação entre o efeito das espécies oxidativas sobre a respiração mitocondrial e o potencial efeito quelante da melatonina sobre estas espécies. O trabalho desenvolvido por Reiter e colegas (2007) também justifica este efeito, dado que esta equipa confirmou esta indolamina como quelante de radicais livres, estimulante e sinérgica de enzimas antioxidantes e possuidora de um papel activo na redução da fuga de electrões da cadeia de transporte mitocondrial.

## **12. Conclusão**

Desde 1993, quando foi descoberta a função de quelante de radicais livres da melatonina, têm sido realizados inumeros projectos de investigação a este respeito. Unanimemente, esta hormona é considerada como quelante de radicais livres tanto de oxigénio como de

nitrogénio, em várias organelas subcelulares, funcionando ainda como estimulante de enzimas antioxidantes. Esta capacidade expressa-se por todo o organismo, não sendo o aparelho reprodutivo uma excepção.

As propriedades da melatonina como antioxidante estão demonstradas e, por isso, convertem-na numa molécula eficiente na protecção de macro-moléculas celulares da oxidação. Por exemplo, 2mM reduzem em 70% os efeitos nefastos causados por radiação ionizante ao DNA, enquanto que para obter o mesmo efeito se necessita 1M de DMSO (Sarabia, et al., 2009).

No caso das células espermáticas, o seu elevado valor biológico e complexa estrutura e funcionabilidade tornam-nas num objecto importante de pesquisa, no que diz respeito ao stress oxidativo.

Em estudos anteriores foi já constatado o facto de que as espécies reactivas de oxigénio são mediadoras importantes da função espermática, estando envolvidas na indução e desenvolvimento da hiperactivação, capacitação e reacção do acrossoma. Contudo, a sua produção excessiva resulta em peroxidação lipídica e alterações na membrana, levando à diminuição de motilidade (Rao & Gangadharan, 2008), inactivação das enzimas glucolíticas e ataque das membranas acrossómicas, tendo ainda como consequência a oxidação do DNA, e impedimento de uma correcta fertilização (Gil-Guzman, et al., 2001).

Neste trabalho, a melatonina provou mais uma vez ser um potente antioxidante, especialmente no que diz respeito à prevenção da peroxidação lipídica ocorrente na peça intermédia do espermatozóide, para além de terem sido detectados outras consequências menos significativas.

Apesar do efeito protector desta indolamina, o seu efeito não se encontra ainda clarificado na maioria dos casos, razão pela qual futuros trabalhos são necessários nesta área.

### 13. Bibliografía

- Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*, 59(1), 2-11.
- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 79(4), 829-843.
- Aguilar, E., & Tresguerres, J. A. F. (1992). Fisiología del sistema endocrino. In J. A. F. Tresguerres (Ed.), *Fisiología Humana* (pp. 930-931). Madrid: MCGRAW-HILL, INTERAMERICANA DE ESPAÑA.
- Aitken, R. J. (2004). Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. *Reprod Fertil Dev*, 16(7), 655-664.
- Aitken, R. J. (2006). Sperm function tests and fertility. *Int J Androl*, 29(1), 69-75; discussion 105-108.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S., & Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod*, 41(1), 183-197.
- Aitken, R. J., Harkiss, D., & Buckingham, D. W. (1993). Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 35(3), 302-315.
- Aitken, R. J., Wingate, J. K., De Iulius, G. N., & McLaughlin, E. A. (2007). Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol Hum Reprod*, 13(4), 203-211.
- Amann, R. P. (1993). Physiology and endocrinology. In A. O. McKinnon, Voss, J. L. (Ed.), *Equine Reproduction* (6th ed., pp. 658-688). Iowa: Blackwell.
- Amann, R. P., & Graham, J. K. (1993). Spermatozoal function. In A. O. McKinnon & J. L. Voss (Eds.), *Equine Reproduction* (6th ed., pp. 715-745). Iowa: Blackwell.
- Arendt, J., & Skene, D. J. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*, 9(1), 25-39.
- Ball, B. A., & Vo, A. (2002). Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. *J Androl*, 23(2), 259-269.
- Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V., & Davies-Morel, M. C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl*, 21(6), 895-902.
- Bendahmane, M., Lynch, C., 2nd, & Tulsiani, D. R. (2001). Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Arch Biochem Biophys*, 390(1), 1-8.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295(5557), 1070-1073.
- Bielski, B. H., Arudi, R. L., & Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 258(8), 4759-4761.
- Bornman, M. S., Oosthuizen, J. M., Barnard, H. C., Schulenburg, G. W., Boomker, D., & Reif, S. (1989). Melatonin and sperm motility. *Andrologia*, 21(5), 483-485.
- Brouwers, J. F., Silva, P. F., & Gadella, B. M. (2005). New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*, 63(2), 458-469.
- Brown, G. C. (1992). Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J*, 284 ( Pt 1), 1-13.
- Brum, A. M., Sabeur, K., & Ball, B. A. (2008). Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*, 69(9), 1041-1055.
- Cardinali, D. P., & Pevet, P. (1998). Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*, 2(3), 175-190.
- Casao, A., Mendoza, N., Perez-Pe, R., Grasa, P., Abecia, J. A., Forcada, F., et al. (2010). Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res*, 48(1), 39-46.
- Chenier, T. S. (2009). Anatomy and physical examination of the stallion. In J. C. Samper (Ed.), *Equine breeding management and artificial insemination* (2nd ed., pp. 1-74). Missouri: Saunders ELSEVIER.

- Choi, J., Park, S. M., Lee, E., Kim, J. H., Jeong, Y. I., Lee, J. Y., et al. (2008). Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. *Mol Reprod Dev*, 75(7), 1127-1135.
- Christensen, P., Whitfield, C. H., & Parkinson, T. J. (1996). In vitro induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. *Theriogenology*, 45(6), 1201-1210.
- Cleaver, B. D., Grubaugh, W. R., Davis, S. D., Sheerin, P. C., Franklin, K. J., & Sharp, D. C. (1991). Effect of constant light exposure on circulating gonadotrophin levels and hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) content in the ovariectomized pony mare. *J Reprod Fertil Suppl*, 44, 259-266.
- de Almeida, E. A., Martinez, G. R., Klitzke, C. F., de Medeiros, M. H., & Di Mascio, P. (2003). Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen (O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δg)) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine. *J Pineal Res*, 35(2), 131-137.
- De Iuliis, G. N., Wingate, J. K., Koppers, A. J., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2006). Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(5), 1968-1975.
- de Lamirande, E., & Gagnon, C. (1993). Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med*, 14(2), 157-166.
- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., & Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, 2(1), 48-54.
- Deichsel, K., Palm, F., Koblichke, P., Budik, S., & Aurich, C. (2008). Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*, 69(8), 940-945.
- Dijk, D. J., & von Schantz, M. (2005). Timing and consolidation of human sleep, wakefulness, and performance by a symphony of oscillators. *J Biol Rhythms*, 20(4), 279-290.
- Drevet, J. R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol*, 250(1-2), 70-79.
- Drummen, G. P., Gadella, B. M., Post, J. A., & Brouwers, J. F. (2004). Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY(581/591). *Free Radic Biol Med*, 36(12), 1635-1644.
- du Plessis, S. S., Hagenaar, K., & Lampiao, F. (2010). The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia*, 42(2), 112-116.
- El-Sokkary, G. H., Kamel, E. S., & Reiter, R. J. (2003). Prophylactic effect of melatonin in reducing lead-induced neurotoxicity in the rat. *Cell Mol Biol Lett*, 8(2), 461-470.
- Ericsson, S. A., Garner, D. L., Thomas, C. A., Downing, T. W., & Marshall, C. E. (1993). Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 39(5), 1009-1024.
- Espey, L. L. (1994). Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod*, 50(2), 233-238.
- Espino, J., Bejarano, I., Ortiz, A., Lozano, G. M., Garcia, J. F., Pariente, J. A., et al. (2010). Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. *Fertil Steril*.
- Foote, R. H. (2003). Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci*, 75(1-2), 119-139.
- Frungieri, M. B., Mayerhofer, A., Zitta, K., Pignataro, O. P., Calandra, R. S., & Gonzalez-Calvar, S. I. (2005). Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology*, 146(3), 1541-1552.
- Fujinoki, M. (2008). Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction*, 136(5), 533-541.

- Gadella, B. M., & Harrison, R. A. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, *127*(11), 2407-2420.
- Gadella, B. M., Rath, R., Brouwers, J. F., Stout, T. A., & Colenbrander, B. (2001). Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci*, *68*(3-4), 249-265.
- Gallon, F., Marchetti, C., Jouy, N., & Marchetti, P. (2006). The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril*, *86*(5), 1526-1530.
- Gavella, M., & Lipovac, V. (2000). Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Arch Androl*, *44*(1), 23-27.
- Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Alvarez, J. G., Thomas, A. J., Jr., et al. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*, *16*(9), 1922-1930.
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, *63*(2), 445-457.
- Gonzalez, F., & Gottlieb, E. (2007). Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. *Apoptosis*, *12*(5), 877-885.
- Graham, J. K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*, *68*(3-4), 239-247.
- Gravance, C. G., Garner, D. L., Baumber, J., & Ball, B. A. (2000). Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, *53*(9), 1691-1703.
- Green, S., & Fishel, S. (1999). Morphology comparison of individually selected hyperactivated and non-hyperactivated human spermatozoa. *Hum Reprod*, *14*(1), 123-130.
- Grossman, E., Laudon, M., Yalcin, R., Zengil, H., Peleg, E., Sharabi, Y., et al. (2006). Melatonin reduces night blood pressure in patients with nocturnal hypertension. *Am J Med*, *119*(10), 898-902.
- Guerrero, J. M., & Reiter, R. J. (2002). Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem*, *2*(2), 167-179.
- Hardeland, R. (2005). Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, *27*(2), 119-130.
- Harrison, R. A. (1996). Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev*, *8*(4), 581-594.
- Harrison, R. A., & Gadella, B. M. (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*, *63*(2), 342-351.
- Hsu, C., Han, B., Liu, M., Yeh, C., & Casida, J. E. (2000). Phosphine-induced oxidative damage in rats: attenuation by melatonin. *Free Radic Biol Med*, *28*(4), 636-642.
- Karasek, M. (2004). Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol*, *39*(11-12), 1723-1729.
- Kareskoski, M., & Katila, T. (2008). Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim Reprod Sci*, *107*(3-4), 249-256.
- Kodama, H., Yamaguchi, R., Fukuda, J., Kasai, H., & Tanaka, T. (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*, *68*(3), 519-524.
- Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, *93*(8), 3199-3207.
- Korkmaz, A., Reiter, R. J., Topal, T., Manchester, L. C., Oter, S., & Tan, D. X. (2009). Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med*, *15*(1-2), 43-50.
- Lachaud, C., Tesarik, J., Canadas, M. L., & Mendoza, C. (2004). Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod*, *19*(3), 607-610.
- Langner, M., & Hui, S. W. (1993). Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta*, *1149*(1), 175-179.

- Lee, Y. M., Chen, H. R., Hsiao, G., Sheu, J. R., Wang, J. J., & Yen, M. H. (2002). Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J Pineal Res*, 33(2), 72-80.
- Love, C. C., Thompson, J. A., Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Blanchard, T. L., Lowry, V. K., et al. (2003). Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*, 60(6), 1127-1138.
- Luboshitzky, R., Shen-Orr, Z., Nave, R., Lavi, S., & Lavie, P. (2002). Melatonin administration alters semen quality in healthy men. *J Androl*, 23(4), 572-578.
- Meinecke, B., Mostle, E., Topfer-Petersen, E., Aurich, C., Gerstberger, R., & Barth, S. W. (2002). Endocrinología general. In W. v. Engelhardt & G. Breves (Eds.), *Fisiología Veterinaria* (pp. 567-577). Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Mennella, M. R., & Jones, M. R. (1977). The activity of some nucleolytic enzymes in semen and in the secretion of the male reproductive tract. *Andrologia*, 9(1), 15-22.
- Merkies, K., Chenier, T., Plante, C., & Buhr, M. M. (2000). Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Theriogenology*, 54(8), 1215-1224.
- Meyers, S. A. (2009). Sperm physiology. In J. C. Samper (Ed.), *Equine breeding management and artificial insemination* (2nd ed., pp. 47-55). Missouri: Saunders ELSEVIER.
- Moore, R. Y. (1978). Neural control of pineal function in mammals and birds. *J Neural Transm Suppl*(13), 47-58.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Hasko, G., Hawkins, B. J., Madesh, M., & Pacher, P. (2007). Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat Protoc*, 2(9), 2295-2301.
- Neild, D. M., Brouwers, J. F., Colenbrander, B., Aguero, A., & Gadella, B. M. (2005). Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 72(2), 230-238.
- Neill, J. M., & Olds-Clarke, P. (1987). A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res*, 18(2), 121-140.
- Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galan, Y., Varela-Fernandez, E., Gallardo-Bolanos, J. M., Muriel, A., Gonzalez-Fernandez, L., et al. (2008). Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J Androl*, 29(2), 213-221.
- Ortega Ferrusola, C., Gonzalez Fernandez, L., Morrell, J. M., Salazar Sandoval, C., Macias Garcia, B., Rodriguez-Martinez, H., et al. (2009). Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*, 138(1), 55-63.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922.
- Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J., Cardinali, D. P., Poeggeler, B., & Hardeland, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*, 273(13), 2813-2838.
- Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J., Zisapel, N., et al. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*, 85(3), 335-353.
- Pandi-Perumal, S. R., Zisapel, N., Srinivasan, V., & Cardinali, D. P. (2005). Melatonin and sleep in aging population. *Exp Gerontol*, 40(12), 911-925.
- Peña, F. J., & Rodríguez, H. (2006). Citometría de flujo: aplicaciones en el estudio del espermatozoide porcino In S. Bonet, E. Martínez, J. E. Rodríguez & X. Barrera (Eds.), *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino: Biotecnología de la Reproducción Porcina*. (pp. 133-144). Girona: Universitat de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina.
- Pena, F. J., Rodriguez Martinez, H., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., Gonzalez Fernandez, L., & Macias Garcia, B. (2009). Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod Domest Anim*, 44(2), 345-349.

- Pena, F. J., Saravia, F., Johannisson, A., Walgren, M., & Rodriguez-Martinez, H. (2005). A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *Int J Androl*, 28(2), 107-114.
- Peyrot, F., Houee-Levin, C., & Ducrocq, C. (2006). Melatonin nitrosation promoted by NO\*2; comparison with the peroxyxynitrite reaction. *Free Radic Res*, 40(9), 910-920.
- Poeggeler, B., Reiter, R. J., Tan, D. X., Chen, L. D., & Manchester, L. C. (1993). Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res*, 14(4), 151-168.
- Rao, M. V., & Gangadharan, B. (2008). Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol In Vitro*, 22(4), 935-942.
- Rasola, A., & Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*, 12(5), 815-833.
- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M. M., & Gadella, B. M. (2001). Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, 65(2), 462-470.
- Reiter, R. J., Paredes, S. D., Manchester, L. C., & Tan, D. X. (2009). Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 44(4), 175-200.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Lopez-Burillo, S., Sainz, R. M., & Mayo, J. C. (2003). Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol*, 527, 539-548.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Mayo, J. C., & Sainz, R. M. (2009). Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod*, 81(3), 445-456.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Qi, W., Manchester, L. C., Karbownik, M., & Calvo, J. R. (2000). Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept*, 9(3-4), 160-171.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Terron, M. P., Flores, L. J., & Czarnocki, Z. (2007). Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol*, 54(1), 1-9.
- Ressmeyer, A. R., Mayo, J. C., Zelosko, V., Sainz, R. M., Tan, D. X., Poeggeler, B., et al. (2003). Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep*, 8(4), 205-213.
- Rodriguez-Gil, J. E. (2006). Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reprod Domest Anim*, 41 Suppl 2, 11-20.
- Ronnberg, L., Kauppila, A., Leppaluoto, J., Martikainen, H., & Vakkuri, O. (1990). Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, 71(2), 492-496.
- Rosales-Corral, S., Tan, D. X., Reiter, R. J., Valdivia-Velazquez, M., Martinez-Barboza, G., Acosta-Martinez, J. P., et al. (2003). Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid-beta peptide in rat brain: a comparative, in vivo study versus vitamin C and E. *J Pineal Res*, 35(2), 80-84.
- Roser, J. F. (2009). Reproductive endocrinology of the stallion. In J. C. Samper (Ed.), *Equine breeding management and artificial insemination* (2nd ed., pp. 17-31). Missouri: Saunders ELSEVIER.
- Salti, R., Galluzzi, F., Bindi, G., Perfetto, F., Tarquini, R., Halberg, F., et al. (2000). Nocturnal melatonin patterns in children. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(6), 2137-2144.
- Sarabia, L., Maurer, I., & Bustos-Obregon, E. (2009). Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicol Environ Saf*, 72(2), 663-668.
- Shiu, S. Y., Li, L., Siu, S. W., Xi, S. C., Fong, S. W., & Pang, S. F. (2000). Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. *Biol Signals Recept*, 9(3-4), 172-187.
- Sieme, H. (2009). Semen evaluation. In J. C. Samper (Ed.), *Equine breeding management and artificial insemination* (2nd ed., pp. 57-74). Missouri: Saunders ELSEVIER.

- Smith, R., Vantman, D., Ponce, J., Escobar, J., & Lissi, E. (1996). Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod*, *11*(8), 1655-1660.
- Storey, B. T. (2008). Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int J Dev Biol*, *52*(5-6), 427-437.
- Suarez, S. S., & Ho, H. C. (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim*, *38*(2), 119-124.
- Tamura, H., Nakamura, Y., Korkmaz, A., Manchester, L. C., Tan, D. X., Sugino, N., et al. (2009). Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril*, *92*(1), 328-343.
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., et al. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*, *44*(3), 280-287.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., & Reiter, R. J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*, *42*(1), 28-42.
- Tan, D. X., Reiter, R. J., Manchester, L. C., Yan, M. T., El-Sawi, M., Sainz, R. M., et al. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*, *2*(2), 181-197.
- Thomas, C. A., Garner, D. L., DeJarnette, J. M., & Marshall, C. E. (1998). Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod*, *58*(3), 786-793.
- Tricoire, H., Moller, M., Chemineau, P., & Malpoux, B. (2003). Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl*, *61*, 311-321.
- Tulsiani, D. R., Zeng, H. T., & Abou-Haila, A. (2007). Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. *Soc Reprod Fertil Suppl*, *63*, 257-272.
- Turner, R. M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev*, *18*(1-2), 25-38.
- van Buiten, A., Remmen, J. L., & Colenbrander, B. (1998). Fertility of Shetland pony stallions used in different breeding systems: a retrospective study. *Vet Q*, *20*(3), 100-103.
- van Vuuren, R. J., Pitout, M. J., van Aswegen, C. H., & Theron, J. J. (1992). Putative melatonin receptor in human spermatozoa. *Clin Biochem*, *25*(2), 125-127.
- Varner, D. D. (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, *70*(3), 448-462.
- Veeramachaneni, D. N., Moeller, C. L., & Sawyer, H. R. (2006). Sperm morphology in stallions: ultrastructure as a functional and diagnostic tool. *Vet Clin North Am Equine Pract*, *22*(3), 683-692.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, *57*(1), 149-179.
- Vidament, M., Ecot, P., Noue, P., Bourgeois, C., Magistrini, M., & Palmer, E. (2000). Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, *54*(6), 907-919.
- Williamson, P., Mattocks, K., & Schlegel, R. A. (1983). Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *Biochim Biophys Acta*, *732*(2), 387-393.
- Zhu, K., Fukasawa, I., Fujinoki, M., Furuno, M., Inaba, F., Yamazaki, T., et al. (2005). Profiling of proteins associated with cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Cancer*, *15*(5), 747-754.
- Zisapel, N. (2001). Melatonin-dopamine interactions: from basic neurochemistry to a clinical setting. *Cell Mol Neurobiol*, *21*(6), 605-616.