



**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**

**Departamento de Ciências Agrárias**

**Fertilização *In Vitro* Heteróloga utilizando ovócitos de bovino  
e sêmen de garanhão**

**Nuna Isabel Garcia Faria**

**Orientador: Professor Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva**

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Angra do Heroísmo, 2011

*“É justamente a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante.”*

*Paulo Coelho*

**Aos meus Pais**

## **Agradecimentos**

Chegado o fim deste trabalho, gostaria de expressar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a minha formação académica, bem como para o meu crescimento pessoal.

Aos meus Pais, José Fernando e Fátima, que apesar da distância nunca me deixaram sentir só, apoiando e incentivando-me em todos os momentos. A eles, um sincero muito obrigado, pela forma como me educaram, pelos valores que me transmitiram, por serem as pessoas que são, tornando desta forma impossível descrever a admiração, o orgulho e o amor que sinto por eles.

Aos meus avós pelo carinho, amizade e apoio demonstrado.

Ao meu padrinho Humberto que esteve sempre presente no meu coração.

Ao professor Doutor Moreira da Silva pela confiança manifestada ao disponibilizar-se para a orientação deste trabalho, bem como pela total disponibilidade humana, amizade, boa disposição no trabalho, sabedoria e dedicação com que me acompanhou durante todo o estágio.

A todos os professores da Universidade dos Açores que contribuíram para a minha formação académica e pessoal.

Ao Doutor António Chaveiro pela sua disponibilidade, colaboração e ensinamentos na orientação deste trabalho.

À Mestre Isabel Carvalhais e à Dr.<sup>a</sup> Marwa Faheem pela oportunidade de novos conhecimentos.

À Doutora Erica Baron pela total disponibilidade demonstrada.

Ao dr. Ricardo Agrícola pelos ensinamentos transmitidos.

À Engenheira Carla Cerqueira que para além de colega de trabalho é acima de tudo como uma irmã, sempre disponível a ajudar, dando sempre uma palavra de apoio, de incentivo, de carinho e de amizade, mantendo-se sempre presente nos momentos bons e menos bons da minha vida.

À Marla Candeia pela sua presença na minha vida, pelo seu carinho, amizade e apoio demonstrado.

À Elisabete Cerqueira pela sua sincera amizade.

À Cátia Monteiro pelo companheirismo, força transmitida e pela sincera amizade.

À Yara pelo companheirismo e calma transmitida ao longo de todo o meu percurso académico.

Aos meus colegas de Mestrado da edição 2009/2011 pelos bons momentos passados nas nossas viagens de visitas de estudo.

Ao Noé Branco e ao Mestre Reinaldo Pimentel pela amizade e disponibilidade sempre demonstrada.

À Natal pela boa disposição e amizade transmitida aos longo de todos estes anos.

À Quinta do Malhinha pela total disponibilidade, simpatia e paciência demonstrada e que sem a sua boa vontade a realização deste trabalho não teria sido possível.

Aos técnicos do Matadouro da ilha Terceira por todo o apoio que tão generosamente me prestaram.

A todos os meus amigos, companheiros dos bons e maus momentos, que de alguma força contribuíram para que agora possa alcançar esta importante meta da minha vida.

E finalmente, não me sendo possível enumerar todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram e apoiaram ao longo desta caminhada.

A todos o meu sincero agradecimento

Bem Hajam!

**Índice**

Agradecimentos.....	i
Índice.....	iv
Abreviaturas.....	v
Resumo.....	1
Abstract.....	3
I- Introdução.....	5
II - Revisão Bibliográfica.....	8
2.1. Aparelho Reprodutor Feminino de um Bovino.....	8
2.1.1. Ciclo Sexual.....	8
2.1.1. Ciclo ovárico.....	12
2.1.2. Fase Folicular.....	12
2.1.3. Fase Luteínica.....	13
2.2. Foliculogénese.....	14
2.2.1. Avaliação dos folículos.....	16
2.2.2. Aspectos morfológicos dos folículos.....	16
2.3. Ovogénese.....	18
2.3.1. Crescimento dos ovócitos.....	20
2.3.2. Qualidade dos ovócitos.....	20
2.4. Aparelho reprodutor masculino da espécie equina.....	22
2.4.1. Testículos.....	22
2.4.2. Epidídimo.....	22
2.4.3. Ducto Deferente.....	23
2.4.4. Escroto e Músculo Cremaster.....	23
2.4.5. Cordão Espermático.....	23
2.4.6. Canal Inguinal.....	23
2.4.7. Glândulas Sexuais Acessórias.....	24
2.4.8. Pénis.....	24
2.5. Espermatogénese.....	24
2.6. Espermiogénese.....	25

---

2.7. Espermiacção .....	26
2.8. Composição do sémen.....	26
2.8.1. Constituição e Características Morfológicas do Espermatozóide .....	27
2.8.1.1. Cabeça .....	28
2.8.1.2. Peça Intermediária.....	29
2.8.1.3. Cauda.....	30
2.9. Conceito de Capacitação Espermática e Reacção Acrossómica .....	30
2.10. Recolha de Sémen .....	32
2.10.1. Vagina Artificial.....	32
2.11. Criopreservação do Sémen de Equino.....	33
2.12. Avaliação do Sémen.....	35
2.12.1. Análise Macroscópica .....	35
2.12.2. Análises Microscópicas.....	35
2.12.3. Citometria de Fluxo.....	37
2.12.3.1. Limitações e aplicações da Citometria de Fluxo .....	39
2.12.3.2. Fluorocromos .....	39
2.12.3.3. SYBR – 14 .....	40
2.12.3.4. FITC-PNA .....	40
2.12.3.5. PI.....	41
2.12.3.6. SYBR-14 E PI .....	41
2.12.3.7. FITC-PNA e PI.....	42
2.12.3.8. Processamento de Amostras.....	44
2.12.3.9. Avaliação da Viabilidade Espermática.....	44
2.12.3.10. Avaliação da Integridade Acrossómica .....	45
2.13. História técnica Fertilização <i>In Vitro</i> .....	46
2.13.1 Técnica de Fertilização <i>in vitro</i> .....	48
2.13.1.1. Definição de Fertilização .....	48
2.13.1.2. Aplicações e Limitações da FIV .....	48
2.13.2. Fertilização <i>In Vitro</i> Heteróloga.....	49
III – MATERIAIS E MÉTODOS .....	50
3.1. Reagentes .....	50
3.2. Recolha dos Ovários.....	51
3.3. Punção Folicular.....	52

---

3.4. Meio de Recolha dos COC's .....	53
3.5. Obervação, Selecção, Contagem e Lavagem dos COC's.....	53
3.6. Maturação dos COC's .....	54
3.7. Preparação dos ovócitos para a Fecundação In Vitro Heteróloga .....	54
3.8. Meio de fertilização e de Lavagem do sémen – TYH Medium .....	54
3.9. Recolha e Preparação do Sémen .....	55
3.10. Fecundação <i>In Vitro</i> Heteróloga .....	57
3.11. Fixação e Obervação.....	57
3.12. Citometria de Fluxo.....	58
3.13. Análise e Tratamento de Dados .....	59
IV – Resultados e Discussão .....	60
4.1. Avaliação Macroscópica do Sémen .....	60
4.2. Avaliação Microscópica do Sémen Fresco .....	61
4.3. Avaliação Microscópica do Sémen Congelado.....	62
4.4. Fecundação <i>In Vitro</i> Heteróloga .....	64
4.5. Citometria de Fluxo.....	65
V-Conclusão e Perspectivas Futuras .....	70
VI – Referências Bibliográficas .....	71

## **Abreviaturas**

**ADN** – Ácido Desoxirribonucleico

**BSA** - Soro de Albumina de Bovino

**COC** – Complexo *cumulus oophurus*

**E<sub>2</sub>** – Estradiol

**FITC** – *Fluorescein Isothiocyanate*

**FIV** – Fertilização *In Vitro*

**FSH** – Hormona Folículo Estimulante

**GnRH** – Hormona Libertadora das Gonadotrofinas

**HosT** – Teste Hiposmótico

**LH** – Hormona Luteinizante

**P<sub>4</sub>** – Progesterona

**PBS** – Solução Tampão de Fosfato

**PGF<sub>2</sub>α** – Prostaglandina F 2α

**PI** – Propídio Iodado

**PVA** - Álcool Polivinílico

**Spz** – Espermatozóides

**ZP** – Zona Pelúcida

## Resumo

A técnica de Fertilização *In Vitro* (FIV) pode ser utilizada para determinar o potencial de fertilização de sémen uma vez que permite identificar e avaliar as características seminais e observar a ligação e penetração da zona pélucida por parte dos espermatozóides (Spz). No caso de espécies em vias de extinção ou que não sejam utilizadas para consumo tornando-se difícil o acesso aos gâmetas femininos para se proceder à técnica da FIV, recorre-se à técnica da FIV heteróloga. Esta técnica consiste na utilização de gâmetas femininos de uma espécie diferentes da dos gâmetas masculinos e permite-nos avaliar a motilidade, a reacção acrossómica, a penetração no ovócito, a descondensação do DNA e formação de pró-núcleos.

Desta forma, este estudo foi efectuado para determinar a capacidade fecundante de dois garanhões utilizando sémen fresco e congelado, recorrendo à técnica de fertilização *in vitro* heteróloga, utilizando ovócitos bovinos desprovidos de zona pelúcida.

A recolha de sémen foi efectuada com uma vagina artificial, modelo Hannover. Após a recolha foram efectuadas avaliações macroscópicas e microscópicas ao sémen: volume, motilidade total, motilidade progressiva e o teste hiposmótico (HosT) e concentração espermática. Após a congelação/descongelação do sémen foram efectuadas avaliações microscópicas.

A avaliação da integridade da membrana acrossómica e da membrana plasmática foi efectuada através da técnica de citometria de fluxo, utilizando fluorocromos SYBR-14 e *propidium iodide* (PI) e *fluorescein isothiocyanate conjugated with Peanut Agglutinin* (FITC-PNA) respectivamente.

Na técnica de fertilização *in vitro* heteróloga utilizou-se um total de 373 ovócitos co-incubados com sémen fresco e congelado de dois garanhões. Após 18 horas de co-incubação os ovócitos foram fixados numa solução de etanol: ácido acético (3:1, v/v) e corados com 4',6- diamidino-2-phenylindole (DAPI). Os ovócitos que apresentaram cabeças de espermatozóides descondensadas ou formação de pró- núcleos foram considerados fertilizados.

No que concerne aos resultados da avaliação macroscópica o ejaculado do garanhão A registou um volume de sémen livre de gel de  $52,5 \pm 2,5$  ml e o garanhão B de  $22,5 \pm 3,2$  ml. Na avaliação microscópica, no que concerne à motilidade total dos espermatozóides, com sémen fresco, o garanhão A apresentou valores de  $52,5 \pm 4,8\%$  de espermatozóides e o garanhão B de  $40 \pm 4,1\%$  e com sémen congelado/descongelado o garanhão A apresentou valores de  $51,7 \pm 1,7\%$  e o garanhão B de  $10,7 \pm 0,7\%$  de Spz. Quanto à motilidade progressiva, nas amostras de sémen fresco o garanhão A apresentou valores de  $40 \pm 7,1\%$  Spz e o garanhão B de  $27,5 \pm 2,5\%$  Spz, nas amostras de sémen congelado o garanhão A registou valores de  $43,3 \pm 1,7\%$  de Spz e o garanhão B de  $7 \pm 0,6\%$  de Spz. Quanto aos valores do teste HostT, nas amostras de sémen fresco o garanhão A apresentou valores de  $61 \pm 5,2\%$  Spz e o garanhão B de  $47,5 \pm 11,3\%$  Spz, nas amostras de sémen congelado o garanhão A apresentou valores médios de  $48,7 \pm 2,9\%$  Spz e o garanhão B de  $18,7 \pm 2,7\%$  Spz. Relativamente à concentração espermática dos ejaculados, o garanhão A apresentou valores de  $199 \times 10^6 \pm 33,6 \times 10^6$  Spz/ml e o garanhão B  $168 \times 10^6 \pm 53 \times 10^6$  Spz/ml.

No que diz respeito aos resultados da técnica de citometria de fluxo, o garanhão A apresentou valores estatisticamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) para o sémen fresco e congelado, quando comparado com o garanhão B. Desta forma, na avaliação da integridade da membrana acrossómica o sémen fresco apresentou valores de  $91,04 \pm$

0,7% e o sémen congelado de  $76,4 \pm 7,79\%$ . O garanhão B apresentou valores de  $27.44 \pm 2.59$  no sémen fresco e de  $25.92 \pm 2.97\%$  no sémen congelado. No que diz respeito à integridade da membrana plasmática o garanhão A registou valores, no sémen fresco, de  $83.6 \pm 1.55\%$  e no sémen congelado de  $57.69 \pm 9.01\%$ . O garanhão B apresentou valores de sémen fresco e sémen congelado de  $16.57 \pm 3.17\%$  versus  $6.87 \pm 1.05\%$ , respectivamente.

Os resultados da fertilização *in vitro* heteróloga demonstraram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os dois garanhões no que diz respeito à capacidade fecundante. Assim, o garanhão A registou taxas de fertilização com sémen fresco de  $51,9 \pm 2,25\%$  e com sémen congelado de  $34,41 \pm 2,7\%$  tendo o garanhão B, com sémen fresco registado valores de fertilização de  $48,1 \pm 6,95\%$  e com sémen congelado de  $13,7 \pm 1,6\%$ .

Com a realização deste estudo pode-se inferir que a FIV heteróloga pode ser uma técnica alternativa para identificar as diferenças seminais entre machos, podendo servir como ferramenta para prever o potencial de fertilidade do sémen de garanhões.

**Abstract**

The technique of in vitro fertilization (IVF) can be used to determine the potential fertility of semen as it allows identifying and assessing the seminal characteristics observing binding and penetration of the zona pellucida by the sperm. In the case of endangered species or species that are not used for food consumption it is difficult to have access to female gametes to make the technique of IVF so we use the technique of heterologous IVF. In this technique female gametes of a different kind of male gametes are used, allowing to assess the motility, acrosome reaction, penetration into the oocyte, decondensation of DNA and formation of pronuclei.

The present study was designed to evaluate the interaction between fresh/frozen-thawed stallion spermatozoa and zona pellucida (ZP) free bovine oocytes using heterologous fertilization.

Semen was collected from two stallions (A and B) by an artificial vagina, Hannover model. After collecting macroscopic and microscopic semen evaluation has been performed: volume, total motility, progressive motility and hypoosmotic test (HosT) and sperm concentration. Evaluations were also performed after thawing. The assessment of membrane integrity and acrosome and plasma membranes was performed by flow cytometry technique, using SYBR-14, propidium iodide (PI) and fluorescein isothiocyanates conjugated with Peanut Agglutinin (FITC-PNA).

For the heterologous IVF a total of 373 oocytes were co-incubated with fresh and frozen/thawed semen of the two stallions. After 18 hours co-incubation of the oocytes were fixed in a solution of ethanol: acetic acid (3:1, v/v) and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Oocytes presented decondensed sperm heads or formation of two polar bodies were considered as fertilized.

Results of macroscopic evaluation of the gel-free semen was  $52.5 \pm 2.5$  ml for stallion A and  $22.5 \pm 3.2$  ml for stallion B. Concerning fresh sperm motility, results were  $52.5 \pm 4.8\%$  and  $40 \pm 4.1\%$  respectively for stallion A and B, being  $51.7 \pm 1.7\%$  and  $10.7 \pm 0.7\%$  respectively for the stallion A and B in thawed sperm. For progressive motility stallion A and B were respectively  $40 \pm 7.1\%$  and  $27.5 \pm 2.5\%$  for fresh sperm, being  $43, 3 \pm 1.7\%$  and  $7 \pm 0.6\%$  for thawed sperm. Host test represented  $61 \pm 5.2\%$  and  $47.5 \pm 11.3\%$ , respectively for stallion A and B in fresh sperm and  $48.7 \pm 2.9\%$  and  $18.7 \pm 2.7\%$  for thawed sperm. Stallion A presented a concentration of  $199 \times 10^6 \pm 33.6 \times 10^6$  Spz / ml and the stallion B  $168 \times 10^6 \pm 53 \times 10^6$  Spz / ml.

By flow cytometry, it has been observed that fresh and frozen-thawed semen of the stallion A represented better results for the acrosome integrity ( $91.04 \pm 0.7\%$  versus  $76.4 \pm 7.79\%$ , respectively) than the observed for the Stallion B ( $27.44 \pm 2.59\%$  versus  $25.92 \pm 2.97\%$ , respectively) ( $P < 0.05$ ). Stallion A presented  $83.6 \pm 1.55\%$  and  $57.69 \pm 9.01\%$  respectively for fresh and thawed sperm for membrane integrity, while only  $16.57 \pm 3.17\%$  and  $6.87 \pm 1.05\%$  of the sperm, represented membrane integrity for stallion B.

Results of fertilization demonstrated statistical differences ( $P < 0.05$ ) between stallions. For Stallion A,  $51,9 \pm 2.25\%$  and  $34,4 \pm 2.7\%$  of oocytes have been penetrated, respectively with fresh and frozen-thawed sperm, while for Stallion B only  $48.1 \pm 6.95\%$  and  $13.7 \pm 1.60\%$  oocytes have been penetrated, respectively, by fresh and frozen-thawed sperm

With this study it can be assumed that heterologous IVF can be an alternative technique to identify the seminal ability to fertilize being a tool to predict the potential fertility of stallions.

## I- Introdução

A primeira inseminação artificial realizada na espécie equina ocorreu aproximadamente em 1322 a.C., quando um chefe árabe, usou de artifícios, impregnando um chumaço de algodão com as secreções de uma égua em cio. Aproximando-se do melhor garanhão da tribo rival, conseguiu excitá-lo com as secreções da fêmea e obteve uma ejaculação. O sémen foi colhido sobre outro chumaço de algodão, o qual, foi introduzido na vagina de uma égua no estro, ocorrendo posteriormente o nascimento de um potro (Barth e Oko, 1989).

Ao longo dos anos foram desenvolvidas e aperfeiçoadas diferentes técnicas de recolha de sémen em equinos de forma a obter maior eficácia no que diz respeito ao número de doses de sémen por recolha bem como o desenvolvimento de técnicas de avaliação das características do sémen. Destas as mais usadas são a avaliação da morfologia (Barth, 1992) e, motilidade espermática, ambas avaliadas ao microscópio óptico (Holt *et al.*, 1997; Kjaestad *et al.*, 1993), compostos bioquímicos do líquido seminal (Hirao, 1975), integridade do acrossoma (Correa *et al.*, 1997) e da membrana plasmática (Pérez *et al.*, 1997), a concentração espermática (Zhang *et al.*, 1998) além de diferentes técnicas para avaliar a reacção acrossómica (Januskauskas, 2000; Larsson *et al.*, 2000). Apesar destas técnicas terem sido desenvolvidas para relacionar as características seminais com a capacidade fecundante, poucos parâmetros mostram uma correlação significativa entre estes dois factores.

Actualmente vários trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de avaliar a actividade metabólica dos espermatozóides, recorrendo à técnica da citometria de fluxo. Esta técnica consiste na contagem e caracterização rápida de partículas microscópicas em suspensão num meio líquido, previamente incubadas em diferentes fluorocromos, os

quais são seleccionados de acordo com a avaliação pretendida. Estas partículas são depois orientadas num fluxo laminar e interceptadas uma a uma por um feixe de luz (Laser), sendo as partículas em análise excitadas por esta fonte luminosa, emitindo radiação de diferentes comprimentos de onda. Com a expansão de diferentes fluorocromos, esta técnica provou ser uma ferramenta viável na caracterização/avaliação e contagem de populações de células ou de constituintes celulares que eram completamente desconhecidas (Burvenich *et al.*, 1992)

A fertilização *in vitro* (FIV) pode ser um método adequado para avaliar a capacidade fecundante, permitindo a avaliação da interacção entre ovócitos/espermatozóides que ocorrem durante a fertilização *in vivo*.

Alguns autores usam testes de FIV para prever a fertilidade do macho, utilizando ovócitos intactos ou seja, que possuem zona pelúcida (Zhang *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1999; Papadopoulos *et al.*, 2005; Taberner *et al.*, 2009). Contudo, apesar de para algumas espécies, por exemplo bovinos, suínos, caprinos ovinos, etc, ser relativamente fácil a obtenção de ovócitos, nomeadamente aquando do abate dos animais, para espécies selvagens ou em perigo de extinção esta prática torna-se impossível. Tal como para as espécies em vias de extinção para o caso dos equinos a obtenção de ovócitos também se torna difícil, uma vez que na maior parte dos países europeus não existe o hábito de consumir carne desta espécie. Nestes casos, a FIV heteróloga apresenta-se como uma excelente técnica para avaliação da capacidade de fertilização de sémen fresco ou congelado (Taberner *et al.*, 2009).

Desta forma, o principal objectivo do presente estudo foi determinar as características seminais de garanhões após a recolha e após a congelação/descongelação, recorrendo à técnica da microscopia óptica e de Citometria de Fluxo. Seguidamente foi avaliada a capacidade fecundante do sémen recorrendo à

técnica da Fertilização *In Vitro Heteróloga*, utilizando ovócitos de bovinos desprovidos de zona pelúcida.

## **II - Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Aparelho Reprodutor Feminino de um Bovino**

O aparelho reprodutor feminino, nos mamíferos, é formado por dois ovários, duas trompas de Falópio, o útero, a vagina e a genitália externa. Desde a puberdade (aparecimento da primeira ovulação) à menopausa (período em que ocorrem modificações cíclicas que se tornam irregulares e por fim acabam por desaparecer), o aparelho reprodutor feminino sofre modificações cíclicas, estruturais e funcionais. Estas modificações são controladas por um mecanismo neuro – humoral. Este mecanismo depende de vários factores de ordem genética e de manejo. A actividade sexual cíclica inicia-se por volta de um ano de idade, mas pode variar desde os quatro meses de idade até aos dois anos. A actividade sexual cíclica nos bovinos, não é influenciada pelo fotoperíodo nem por factores sazonais.

No período seguinte à menopausa, o aparelho reprodutor sofre uma lenta involução.

#### **2.1.1. Ciclo Sexual**

Têm forma de amêndoa, podendo medir até 5 cm e possui uma espessura máxima de 2.5 cm, contendo um formato oval e localizando-se na cavidade abdominal. Apresenta a região medular, contendo numerosos vasos sanguíneos e tecido conjuntivo frouxo, e a cortical, onde predominam os folículos, contendo os ovócitos. Entre estas duas regiões não existem limites nítidos. A superfície do ovário é revestida por epitélio simples, cúbico na sua maioria, mas apresenta-se pavimentoso em certas áreas. Sob esse

epitélio o estroma forma uma camada de tecido conjuntivo denso em vasos, a albugínea do ovário, responsável pela cor esbranquiçada desse órgão.

O ovário possui duas funções de extrema importância: produzir células germinativas (ovócitos) através de um processo designado por *oogenesis* e produzir hormonas necessárias à reprodução (estrogénios (E2) e a progesterona (P4)). No ovário, encontra-se folículos primordiais, constituídos por uma célula germinativa rodeada de uma camada de células – células do *cumulus oophorus* (COCs). Esta célula germinativa tem a capacidade de maturar até ovócito, caso o folículo atinja o estado de folículo maduro.

Os ovários actuam, também, como glândulas endócrinas, produzindo as hormonas esteróides, o estradiol e a progesterona. O estradiol é produzido pelos folículos em desenvolvimento, e a progesterona pelo corpo lúteo. Assim sendo, os ovários, para além da função de produzirem óvulos, que são as células sexuais femininas, também produzem hormonas. Esta produção hormonal é designada por secreção interna ou endócrina e é responsável pelas diferentes fases da procriação, também podendo ser designado por Ciclo Estral (Hafez, 1987). A produção de prostaglandina F 2 $\alpha$  (PGF 2 $\alpha$ ), de origem uterina interage com as hormonas produzidas nos ovários com o objectivo de produzir um ovócito fertilizável e susceptível de um posterior desenvolvimento (Marques, 1998).

Desta forma, os ovários têm duas funções inter – relacionadas, sendo elas a produção de gâmetas maduros (ovócitos e a sua libertação). Esta produção de gâmetas é designada de função exócrina. No entanto, também possuem uma função endócrina, produzindo hormonas esteróides. Esta produção de hormonas ocorre em estruturas complexas denominadas por folículos (Hafez, 1987).

Assim, designa-se por ciclo sexual o intervalo entre um cio e o cio seguinte.

À nascença, cerca de 150 000 folículos primordiais estão presentes em “pools” estáticos no ovário de uma vaca (Erickson, 1983). Perto da puberdade, estes folículos entram em crescimento e menos de 100 irão ovular durante a vida do animal (Hansel e Convey, 1996). A maioria dos folículos degenera à nascença por um processo chamado de atresia, sendo considerado um tipo de apoptose. Este processo de apoptose folicular ocorre durante toda a vida, terminando após a menopausa, quando os últimos folículos desaparecem.

No caso dos bovinos, o ciclo sexual da vaca tem uma duração média de 21 dias, podendo variar entre os 18 e os 24 dias. Segundo Silva (1998), o crescimento folicular é regulado por um mecanismo de retro – controle positivo e negativo entre o ovário e o sistema hipotálamo – hipófise e possui três componentes: a componente celular, a componente hormonal e a componente comportamental.

Dentro do ciclo sexual, distinguem-se dois ciclos: ovárico e o menstrual.

O ciclo ovárico é, normalmente, dividido em duas fases: a fase folicular caracterizada pelo período de crescimento dos folículos seguido pela ovulação, e que nos bovinos possui uma duração de 2 a 4 dias, e a fase luteínica, também designada de período pós ovulatório, que possui uma duração de 18 a 19 dias (Hansel *et al.*, 1973).

No decorrer do ciclo sexual, ocorrem uma série de factores endócrinos e parócrinos que envolvem a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) sintetizada pelas células neurosecretoras no hipotálamo. A GnRH estimula a libertação de duas hormonas produzidas pela hipófise que actuam nos ovários: a hormona foliculo - estimulante (FSH) que estimula o desenvolvimento dos folículos e a produção de estrogénio pelas células foliculares, e a hormona luteinizante (LH) que actua como ponto-chave para a ovulação, libertando o ovócito secundário e estimulando as células foliculares e o corpo lúteo a produzir progesterona (Hafez, 1982).

Assim sendo, a vaca é considerada uma fêmea poliestrica contínua, pois após a puberdade os ciclos éstricos são interrompidos unicamente pela gestação e lactação. O ciclo sexual dos bovinos é classificado em quatro fases distintas: Estro (dia 0), designa-se pelo período de receptividade sexual; Metaestro (varia entre o dia 1 ao dia 4) e corresponde ao período pós ovulatório; Diestro (engloba do 5º ao 18º) e corresponde à fase luteínica e finalmente o Proestro (corresponde aos dias 19 a 21). Nesta fase a concentração de progesterona está baixa e ocorre um rápido crescimento folicular estimulado pelo FSH e LH que determinam aumento do estrógeno. Ocorrem comportamentos que demonstram uma aproximação do estro, com um aumento marcado na actividade do sistema reprodutor. No estro (cio), a fêmea encontra-se sob forte estimulação de estrogêneos e aceita a monta pelo macho ou por outra fêmea, o estrógeno apresenta-se com um padrão de picos e relacionado com o LH, semelhante ao proestro. Em torno de 4 a 6 horas do início do cio ocorre uma onda pré-ovulatória de LH com duração média de 8 horas. Esta fase é caracterizada por um aumento tanto na amplitude quanto na frequência dos picos de LH. A progesterona encontra-se em níveis basais. Assim sendo, nas fases de proestro e estro, há crescimento folicular na falta de um corpo lúteo funcional, e a principal hormona produzido é o estrógeno. A fase que sucede o estro é o metaestro, que se inicia no momento em que a fêmea não aceita mais a monta e ocorre a ovulação, com a formação do corpo hemorrágico e, posteriormente, o corpo lúteo. Os níveis de progesterona começam a aumentar aproximadamente ao 3º dia atingindo um pico por volta do 12º dia. Do 12º ao 17º dia, que corresponde à fase de diestro, caracteriza-se pela presença de um corpo lúteo funcional, ocorrendo o aumento de progesterona e baixando os níveis de estrógenos (Grunert & Gregory, 1989; Noakes, 1997; Noakes, 2001; Moraes, 2003).

A duração do cio e a ovulação apresentam pequenas variações entre fêmeas da mesma espécie, em função de factores endógenos e exógenos. Quando não ocorre fecundação, o intervalo médio entre dois cios consecutivos é de 21 dias e é denominado de ciclo estral. Este ciclo divide-se em duas fases distintas: a fase folicular, que corresponde ao proestro e o estro, e a fase luteínica, que corresponde ao metaestro e ao diestro (Peters e Ball, 1995).

### **2.1.1. Ciclo ovário**

A LH e a FSH produzem mudanças cíclicas nos ovários (desde o desenvolvimento dos folículos, à ovulação e à formação do corpo lúteo). Esta interacção entre estas hormonas é conhecida como ciclo ovário. Durante cada ciclo, a hormona FSH promove o crescimento folicular de vários folículos primários, no entanto, apenas um único folículo primário se desenvolve em folículo maduro ou de De Graff, e liberta o seu ovócito.

### **2.1.2. Fase Folicular**

O período de desenvolvimento folicular é constituído por duas fases: proestro e estro. O proestro tem uma duração de dois a três dias e é caracterizado pelo declínio nos níveis de progesterona, pelo desenvolvimento folicular e pelo aumento dos níveis de estradiol no sangue (Antunes *et al.*, 2008).

Nesta fase, a secreção de FSH e LH do lóbulo anterior da hipófise deve-se à libertação da GnRH pelo hipotálamo. Os níveis elevados de FSH no sangue induzem o desenvolvimento dos folículos em consonância com a LH, que estimula a maturação. A produção de estradiol pelos folículos aumenta à medida que o folículo se desenvolve.

Após uma determinada concentração, o estradiol estimula a manifestação do cio e a libertação de LH, iniciando-se assim a segunda fase.

No estro, os elevados níveis de estradiol, além de induzir a manifestação física do cio, termina com a ovulação (Sallisbury e Vandermark, 1961) e são, também, responsáveis pela dilatação da cérvix, pela síntese e secreção do muco vaginal e pelo transporte dos espermatozóides para o tracto reprodutivo feminino. Na ausência da progesterona, os elevados níveis de estrogénios, actuam nos receptores no hipotálamo para induzir a receptividade sexual. Nesta fase, a elevada secreção de estrogénios, devido ao retrocontrolo positivo, estimula a descarga da GnRH e liberta descargas pré – ovulatória de LH e reduzidas quantidades de FSH. Assim sendo, a ovulação ocorre quando há a ruptura do folículo e consequentemente a libertação do ovócito (Evans e Maxwell, 1990; Henderson *et al.*, 1990; Allrich, 1983).

A estação do ano, a idade entre outros factores influencia a duração do estro (Peters e Ball, 1995). No entanto, o manejo, a raça e os factores ambientais também influenciam na variação da duração do estro.

### **2.1.3. Fase Luteínica**

Esta fase inicia-se com o fim da manifestação do cio e tem início com o período de desenvolvimento do corpo lúteo. Esta fase subdivide-se em metaestro e diestro.

O metaestro tem como característica principal a ovulação. Nos bovinos, a ovulação ocorre nas 12 a 16 horas após o fim do cio.

O corpo lúteo produz progesterona, hormona esta, que é responsável pela manutenção da gestação.

O diestro caracteriza-se pelo período em que o corpo lúteo passa a ser funcional e começa a sintetizar e libertar níveis elevados de progesterona.

O diestro é o ciclo de maior duração, sensivelmente 15 dias.

Se o ovócito for fecundado, o corpo lúteo é mantém-se e os níveis de progesterona permanecem elevados durante o período de gestação. No caso de não ocorrer fecundação, dá-se a regressão do corpo lúteo, aproximadamente 17 dias após o cio, e os níveis de progesterona no sangue diminuirão, permitindo o desenvolvimento de um novo ciclo estral. A  $PGF2\alpha$ , é uma hormona produzida no útero, e tem como finalidade a destruição do corpo lúteo, ou seja, a luteólise (Gordon, 1994).

A partir do 10º dia, o corpo lúteo amadurece e torna-se mais sensível à acção luteolítica da  $PGF2\alpha$  (King & Kiracofs, 1982; Berardinelli & Adair, 1989).

## 2.2. Foliculogénese

Segundo Driancourt *et al.* (1991), a foliculogénese comporta todas as etapas do desenvolvimento do folículo, desde a sua formação até à ovulação ou à sua atresia (Figura 2.1).

A camada cortical no ovário, ocupa a maior parte do volume dos ovários e é a camada cortical propriamente dita, sendo nela que se encontram os folículos ovários, que são as unidades funcionais básicas das gónadas femininas. Nestes folículos, as funções endócrinas e germinativas estão vinculadas funcional e histologicamente, pois as células da teca e da granulosa que envolvem os ovócitos são as principais responsáveis pela síntese de estrogéneos. Assim sendo, são as suas células somáticas que irão contribuir para grande parte na realização desta função, sendo essenciais para a reprodução e sobrevivência das espécies (Armstrong e Gore – Langton, 1994).

No folículo, gera-se um micro ambiente propício ao crescimento e maturação do ovócito. Também é no folículo, que se produzem hormonas esteroides, como a progesterona e os estrogénios (Hagemann, 1999).

Segundo Hafez (1987), a foliculogênese é composta por duas fases distintas. A primeira fase corresponde ao desenvolvimento do folículo e está dependente de um controlo intra – ovárico. A segunda fase, o controlo intra – ovárico é feito por hormonas gonadotróficas.

Os folículos podem ser classificados segundo o seu tamanho e grau de evolução.

Um folículo ovárico é uma agregação esférica de células que contêm o gâmeta em desenvolvimento. O crescimento e o desenvolvimento dos folículos são acompanhados por alterações nos gâmetas associados. A continuidade cíclica do desenvolvimento folicular caracteriza-se através da identificação de folículos na superfície do ovário, sendo estes classificados como folículos primordiais, folículos primários, folículos secundários, folículos terciários, folículos de De Graff e folículo pré – ovulatório.

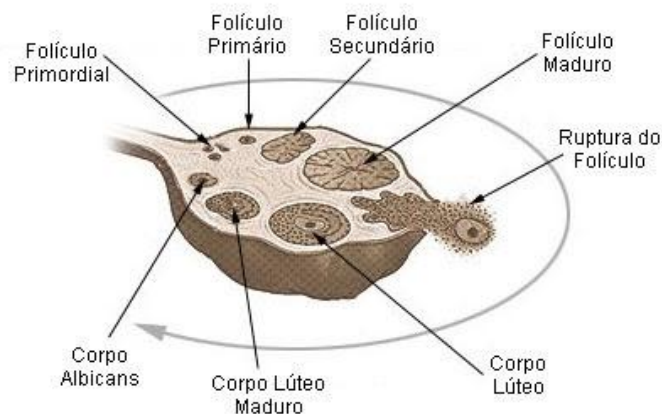


Figura 2.1. – Esquema da evolução folicular, desde o folículo primordial até ao corpo albicans, passando pelos estádios intermédios de folículo primário, secundário e terciário. Adaptado de <http://veterinariadeouro.blogspot.com/2010/07/fisiopatologia-da-reproducao.html>.

### 2.2.1. Avaliação dos folículos

Segundo Hagemann (1999), um folículo não é constituído unicamente pelo ovócito, mas também por mais três tipos de células, sendo elas a teca, as células da granulosa e as células do *cumulus oophorus*. Estas células têm a capacidade de manter o ovócito no estado meiótico quiescente.

Independentemente do ciclo sexual ou da idade da fêmea, encontra-se uma população heterogênea de folículos em diferentes estados de foliculogênese, incluindo a fase de crescimento, a fase de estabilização do crescimento e a fase atrésica. A atrésia folicular significa a destruição do ovócito, relacionando-se a qualidade do folículo com a capacidade de desenvolvimento posterior daquela célula germinativa (Marques, 1998).

### 2.2.2. Aspectos morfológicos dos folículos

Existem três tipos de folículos: os primordiais, em crescimento ou secundários e os vesiculares, também conhecidos como terciários ou antrais. Os folículos terciários ou antrais são caracterizados pela presença de uma cavidade cheia de líquido, designado por *antrum* e pela diferenciação das células da granulosa e das tecas (Erickson, 1996). Alguns autores diferenciam ainda os folículos primordiais dos folículos primários, pelo número e forma das células da granulosa (Hulshof *et al.*, 1992).

Os ovários, segundo o seu estado fisiológico, contêm uma grande quantidade de folículos primordiais, uma população mais limitada de folículos pré – antrais (variam de 100 a 1000) e antrais (variam de 50 a 300). O tempo que estes folículos necessitam para o seu crescimento desde as fases primordial e pré – antral, até ao estado de ovulação varia, pode ser de alguns dias ou semanas (Driancourt, 2001).

Segundo Potes (1989) cada folículo primordial encontra-se no interior do estroma cortical e caracteriza-se por possuir dimensões inferiores a 30 -40 µm. Cada

foliculo primário, resulta na transformação de um foliculo primordial. Esta transformação, envolve alterações no ovócito primário, no que diz respeito às células da granulosa e aos elementos do estroma. As células da granulosa ficam em forma de cubo, no entanto, o foliculo primário ainda contém o ovócito primário. Este foliculo possui um diametro que varia entre os 40 a 60  $\mu\text{m}$  (Beckers *et al.*, 1996).

O crescimento do foliculo primário, faz com que as células da granulosa se comecem a dividir por mitoses, e a camada celular à volta do ovócito comece a engrossar. Através deste processo, o foliculo primário evolui para foliculo secundário. Assim sendo, o foliculo secundário, é identificado pelo aumento das células da granulosa associadas ao ovócito primário e pelo desenvolvimento da zona pelúcida entre o ovócito e as células da granulosa.

As células da granulosa dividem-se através de mitoses, constituindo a corona radiata. As células do estroma diferenciam-se em duas camadas, formando a teca interna e a teca externa. As células da teca são separadas das células da granulosa por uma membrana basal. A teca interna é formada por células epiteliais de maiores dimensões e por uma intensa rede vascular. A teca externa é constituída por uma camada de células fibroblásticas.

A actividade secretora das células da granulosa, faz com que os foliculos terciários se desenvolvam. Pequenas fendas intercelulares, preenchidas por líquido folicular, formam o *antrum* folicular. Estes processos fazem parte do crescimento contínuo do foliculo. Na ligação das células da granulosa às células da corona radiata encontra-se o *cumulus oophorus*. As células da corona radiata são constituídas por prolongamentos citoplasmáticos que penetram a zona pelúcida.

O foliculo maduro ou foliculo de De Graff, possui 1 cm de diâmetro e forma uma vesícula transparente que fica saliente na superficie do ovário. Nesta fase, o

ovócito já é secundário, mas permanece no centro da cavidade ou do *antrum* folicular, que se encontra envolvido pela zona pelúcida que está rodeada pelas células da granulosa e preso à parede do folículo por um pedículo (*cumulus oophorus*). Estas células, em contacto com a zona pelúcida, tornam-se alongadas e formam a corona radiata, que acompanha o ovócito quando este é libertado pelo ovário.

Os folículos pré-ovulatórios são aqueles que chegam à fase final do crescimento e são susceptíveis de ovular, logo que haja uma descarga de gonadotrofinas, isto é, um pico de LH, ou quando é injectado uma quantidade suficiente de LH (Driancourt *et al.*, 1991). As características morfológicas de um folículo pré-ovulatório são: tamanho máximo, número de células da granulosa máxima, actividade mitótica das células da granulosa mínima e atresia nos folículos de tamanho imediatamente inferior (Driancourt *et al.*, 1991). Segundo os mesmos autores, as características fisiológicas dos folículos são uma elevada razão de estradiol/ androgénios e/ou estradiol/ progesterona no fluido folicular. Pelo contrário, nos folículos atréticos, esta razão baixa, devido à paragem da aromatização da testosterona. Outra característica a ter em conta é a presença de receptores de LH nas células da granulosa, que se encontram ausentes ou não funcionais nos folículos atréticos. Outra característica está relacionada com a produção de inibina elevada. O fluxo sanguíneo muito elevado é outra característica a ter em conta.

### **2.3. Ovogénese**

É o processo em que ocorre a formação dos gâmetas femininos nas gónadas femininas, também denominados por ovários (Figura 2.2.).

Tem início na fase pré-natal e termina na puberdade, no fim da maturação sexual. Durante a ovogénese os ovócitos permanecem retidos no estágio de diploténo da prófase na primeira divisão meiótica, desde a vida fetal até pouco antes da ovulação.

O processo de formação do óvulo distingue-se em três fases: germinativa ou multiplicação, crescimento e de maturação.

Na fase de multiplicação ou germinativa, as células germinativas, também designadas por ovogónias, dividem-se por mitose, terminando após o crescimento.

Na fase de crescimento as ovogónias terminam a sua multiplicação e crescem, aumentando a capacidade do citoplasma, transformando-se em ovócitos I, também designados por ovócitos primários ou de primeira ordem.

Na última fase, de maturação, ocorre meiose em que o ovócito I através da divisão I da meiose, origina duas células – filhas de diferentes tamanhos: uma que retém, praticamente, todo o citoplasma do ovócito I e outra muito pequena que contém o núcleo envolvido por uma fina película de citoplasma. O ovócito II, também designado por secundário ou de segunda ordem é a maior célula. A célula envolvida por uma fina película de citoplasma é designada por primeiro glóbulo ou corpúsculo polar. Na divisão II da meiose, o ovócito II origina uma célula grande, o óvulo, e outra pequena o segundo glóbulo ou corpúsculo polar, que se pode dividir originando dois corpúsculos polares.

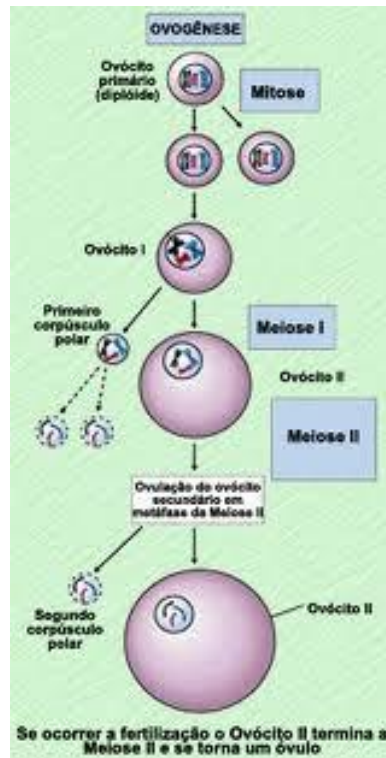


Figura 2.2. – Figura representativa do processo da Ovogênese. Adaptado de [http://200.145.142.234/embriologia\\_NOVO/D-Gametogenese\\_feminina/4\\_11.htm](http://200.145.142.234/embriologia_NOVO/D-Gametogenese_feminina/4_11.htm).

### 2.3.1. Crescimento dos ovócitos

A fase de crescimento dos ovócitos varia de espécie para espécie, mas de forma geral ocorre mais rápido nas espécies de pequeno porte do que nas espécies de grande porte. Nesta fase ocorre a construção da zona pelúcida e a acumulação de diversos produtos necessários para a fertilização e desenvolvimento embrionário precoce (Sirard, 2001). Durante o crescimento dos ovócitos o núcleo, o nucléolo, as mitocôndrias, o complexo de Golgi, os ribossomos e os grânulos corticais sofrem alterações.

### 2.3.2. Qualidade dos ovócitos

O complexo *cumulus-oophorus* engloba o ovócito propriamente dito e as células do *cumulus*. O ovócito é constituído por um núcleo, organelos citoplasmáticos e

citoplasma (ooplasma) e encontra-se envolvido por uma membrana espessa denominada de zona pelúcida (Antunes *et al.*, 2008).

A morfologia do complexo *cumulus-oophorus* está intimamente relacionada com o grau de atresia do folículo que o contém e está directamente relacionada com a viabilidade dos ovócitos. Desta forma, classifica-se os COC consoante a sua qualidade e homogeneidade do citoplasma, dividindo-os em quatro grupos distintos, classificados de 1 a 4, onde os COC de qualidade 1 e 2 são utilizados para a FIV e os de qualidade 3 e 4 são rejeitados (Antunes *et al.*, 2008).

Os COC de qualidade 1 são caracterizados por ter as células do *cumulus* presentes, compactas e completas, não se distinguindo uma das outras, rodeando todo o ovócito com o mínimo de cinco camadas de células e de cor uniforme. Só os COC que apresentam citoplasma homogéneo e um *cumulus* denso e completo é que podem ser classificados de categoria 1.

Os COC de qualidade 2 possuem um número de camada de células da granulosa igual ou superior a cinco, envolvendo todo o ovócito e apresenta um aspecto do *cumulus*-ovócito compacto. O citoplasma dos ovócitos pode apresentar zonas mais densas e com diferentes pigmentações. A existência de uma destas características ou a junção das duas faz com que os ovócitos se incluam na categoria 2.

Os COC de qualidade 3 apresentam grande heterogeneidade no ooplasma. O complexo *cumulus-oophorus* pode ou não estar presente na sua totalidade, o número de camada de células do complexo é igual ou superior a 3, podendo existir partes do ovócito descobertas, sem células do *cumulus* a revesti-las. O ooplasma do ovócito pode apresentar zonas com pigmentação diferentes, não sendo totalmente homogéneo. A presença de uma ou mais destas características leva a classificar os ovócitos na categoria de qualidade 3.

Os COC de qualidade 4 apresentam um número de camadas de *cumulus-oophorus* inferior a três ou estar totalmente desprovido de células; podem também estar presentes na sua totalidade mas com células dissociadas (*cumulus* expandido). O ooplasma do ovócito na maior parte dos casos é heterogéneo. A presença de uma ou mais destas características indica que os COC se inserem na categoria 4 (Antunes *et al.*, 2008).

## **2.4. Aparelho reprodutor masculino da espécie equina**

O aparelho reprodutor masculino é constituído por dois testículos que se encontram envolvidos pelo escroto, órgãos acessórios (condutos e glândulas) e o pénis.

### **2.4.1. Testículos**

É nos testículos que se produzem os espermatozóides e a testosterona.

Cada testículo é formado por tubos seminíferos, rodeados de uma cápsula fibrosa – albugínea. Possuem células de Leydig, que segregam a testosterona, encontram-se no tecido conjuntivo entre os tubos seminíferos.

### **2.4.2. Epidídimo**

O epidídimo, do Grego *epi* (dentro) e *didymoi* (germinativo ou testículo), é um órgão alongado, localizado na superfície do testículo. É monotubular, enrolado em espiral e transporta os espermatozóides dos vasos eferentes para os vasos deferentes (Sullivan *et al.*, 2005). Anatomicamente, está dividido em três segmentos: a cabeça, onde o espermatozóide adquire motilidade progressiva; o corpo, onde adquire capacidades fecundantes; a cauda, local de armazenamento. As células epididimais são

especializadas não só em criar o ambiente para amadurecer o espermatozóide, mas também para realizar a protecção imunológica (Shivaji, 1988).

#### **2.4.3. Ducto Deferente**

É um tubo muscular que, no momento da ejaculação impulsiona os espermatozoides desde o epidídimo até à uretra prostática.

#### **2.4.4. Escroto e Músculo Cremaster**

O escroto é uma estrutura sacular que contém os testículos. Por debaixo da camada cutânea externa encontra-se outra de tecido fibroelástico denominada túnica dartos. O escroto conjuntamente com o músculo cremaster, tem como função a regulação da temperatura dos testículos. Ao contrair as fibras musculares, quando está frio, os testículos adquirirem uma posição contígua com a parede abdominal, afastando-os quando está calor.

#### **2.4.5. Cordão Espermático**

O testículo ao descer desde a sua origem para o saco escrotal, arrasta vasos e nervos espermáticos. Estes elementos formam uma parte activa muito importante do cordão espermático, o qual engloba também o ducto deferente.

#### **2.4.6. Canal Inguinal**

Estende-se desde a cavidade abdominal até ao exterior e contém o cordão espermático e os vasos e nervos inguinais.

#### **2.4.7. Glândulas Sexuais Acessórias**

São denominadas de ampolas dos ductos deferentes, as vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbouretrais. Estas glândulas segregam uma grande parte do líquido seminal indispensável como meio de transporte, nutrição e protecção dos espermatozóides contra o excesso de acidez do ducto genital feminino.

#### **2.4.8. Pénis**

É o órgão masculino da cópula, sendo composto essencialmente por tecido eréctil, e inclui a parte extrapélvica da uretra. Está apoiada pela fáscia do pénis e a pele, e a sua porção pré-escrotal encontra-se inserida numa bolsa cutânea – o prepúcio.

O pénis consiste essencialmente em dois corpos erécteis: o corpo cavernoso e o corpo esponjoso, constituídos principalmente por tecido elástico e muscular. A erecção peniana antes da cópula deve-se à penetração de maior quantidade de sangue pelos troncos arteriais do que de saída pelos venosos, que leva ao aumento do tamanho e rigidez do órgão e também à contracção do músculo erector do pénis.

#### **2.5. Espermatogénese**

A espermatogénese (figura 2.3) é um processo básico da reprodução do macho e resulta no processo e produção de espermatozóides. Este processo é dividido em quatro fases: Fase de Multiplicação – as células germinativas masculinas ou espermatogónios dividem-se através de sucessivas mitoses e são células dipolóides ( $2n$ ); Fase de Crescimento – corresponde ao intervalo em que o espermatogónio deixa de se multiplicar e ocorre o crescimento do mesmo. Desta forma, o Espermatogónio transforma-se em Espermatócito I; Fase de Maturação – os Espermatócitos I, também designados por Espermatócitos Primários ou de Primeira Ordem sofrem o processo de

divisão meiótica, dando origem a Espermatócitos II, ocorrendo posteriormente a segunda divisão meiótica originando os Espermátidas. Tanto os Espermatócitos II como as Espermátidas são células haplóides ( $n$ ); Fase de Diferenciação – ocorre a transformação da espermátida em Espermatozóide.

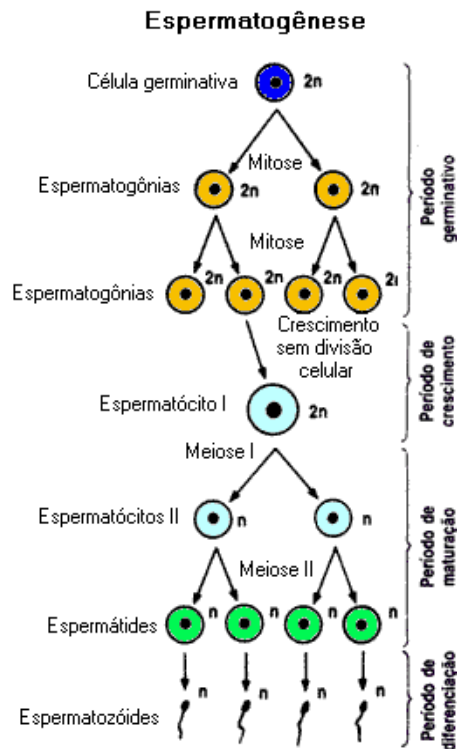


Figura 2.3. – Esquema representativo do processo de Espermatogênese. Adaptado de <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo15.php>.

## 2.6. Espermiogênese

Denomina-se por espermiogênese o processo pelo qual os espermátídios se diferenciam em espermatozóides. A evolução de uma célula redonda sem núcleo distinto para um espermatozóide altamente organizado deve-se ao alongamento e achatamento do núcleo condensado, dando forma à cabeça do espermatozóide; à eliminação de grande parte do citoplasma; à organização da superfície da célula em

domínios específicos, constituídos por grupos distintos de lípidos e proteínas, desprovidos de mobilidade; e à reorganização dos organelos citoplasmáticos: fusão das vesículas do complexo de Golgi para a formação do acrossoma, reorganização dos centríolos para formação do flagelo e repartição das mitocôndrias em torno da base da cauda (Junqueira e Carneiro, 2004).

## **2.7. Espermição**

A espermição é o processo da libertação dos espermatozoides imóveis que flutuam na corrente de fluido produzido pelas células de Sertoli, dos canais eferentes até ao epidídimo, onde vão maturar e permanecer até à ejaculação (Hafez, 1993).

## **2.8. Composição do sémen**

O sémen produzido pelo garanhão é constituído por duas partes: plasma seminal e espermatozoides. O plasma seminal tem várias funções, funciona como substrato para o transporte de espermatozoides para a égua, permite e inicia a maturação dos espermatozoides indicada pela motilidade (pois os espermatozoides permanecem imóveis antes de contactarem com o plasma seminal), assegura a sobrevivência e motilidade dos espermatozoides pelo fornecimento de energia principalmente sob a forma de glucose e protege-os de flutuações da pressão osmótica. Previne, ainda, a oxidação dos componentes bioquímicos (Morel 1999).

Um ejaculado divide-se em três fracções: pré-espermática, rica em esperma, e pós-espermática (Mann *et al.*, 1963). A porção pré-espermática não possui geralmente espermatozoides, e se possuir são velhos e inviáveis. Tem origem nas glândulas prostática e bulbouretrais e tem função lubrificante e de limpeza da uretra, sendo libertada antes de o garanhão penetrar a égua. A sua consistência é aquosa e possui entre

10 a 20ml de volume. A segunda fracção é a maior e mais rica em espermatozóides. Contém 80-90% de espermatozóides e 80-90% de componentes bioquímicos do sémen. Tem aspecto leitoso e consiste em vários jactos de ejaculado que em média constituem 40-80ml do volume total. A porção de fluído tem maioritariamente origem nas ampolas seminais e nas glândulas bulbouretrais, com possível contribuição da próstata e glândulas vesiculares (Morel, 1999). A terceira fracção, pós espermática, também designada por fracção de gel é depositada após a porção rica em espermatozóides. Tem origem nas glândulas vesiculares e o seu volume pode ser desde nulo a 80ml, variando com a estação do ano e individualmente em cada garanhão especialmente de acordo com a idade, sendo menor na época não reprodutiva e em garanhões mais jovens (Morel, 1999).

### **2.8.1. Constituição e Características Morfológicas do Espermatozóide**

Os espermatozóides dos garanhões são gâmetas masculinos produzidos nos tubos seminíferos dos testículos, possuindo um comprimento de  $87,85 \pm 7,02 \mu\text{m}$  (Bielanski and Kaczmariski, 1979; Amann and Graham, 1993; Johnson *et al.*, 1997; Juhász *et al.*, 2000) e são formados por três partes distintas: a cabeça, peça intermediária e cauda (Figura 2.4.).

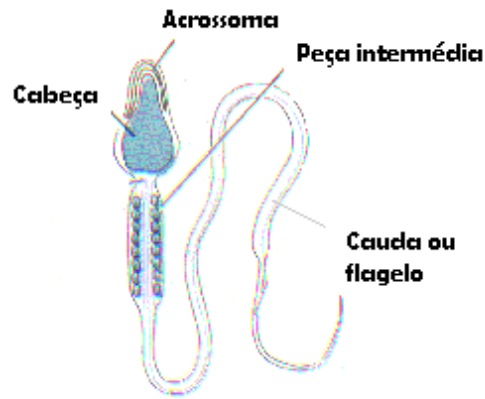


Figura 2.4. Partes Constituintes do Espermatozóide de Mamífero. Adaptado de <http://blogdebiologia.files.wordpress.com/2009/10/espermatozoide1.gif?w=255&h=230>

#### 2.8.1.1. Cabeça

Tem forma elíptica, ligeiramente mais espessa na parte posterior. Possui um comprimento de  $6,62 \pm 0,02\mu\text{m}$  e uma largura de  $3,26 \pm 0,19\mu\text{m}$ . A parte anterior da cabeça está envolvida pelo acrossoma (Juhász *et al.*, 2000). O acrossoma consiste num saco membranoso invertido (Setchel, 1977), formando uma estrutura semelhante a um capacete, que cobre um meio a dois terços da porção anterior do núcleo, diferenciando-se a partir do complexo de Golgi do espermatídeo, apresentando um papel vital na fecundação/fertilização (White, 1962; Krogenoes *et al.* Citado por Silva e Versteegen, 1995). O acrossoma, rodeado pela membrana, contém enzimas hidrolíticas, situando-se na parte anterior do núcleo (Bedford e Hoskins, 1990). Este contém uma quantidade de enzimas semelhantes às encontradas nos lisossomas de uma célula, inclusive a hialuronidase, que podem digerir filamentos dos tecidos, e enzimas proteolíticas. Estas enzimas desempenham papel importante para que ocorra a penetração do material genético masculino no ovócito (Gyton & Hall, 1997).

Na zona equatorial da cabeça encontra-se o núcleo, uma formação citológica de grande interesse, devido aos fenómenos procreativos e genéticos. O seu componente fundamental é o RNA e o DNA (Pérez e Gutiérrez, 1985). No núcleo encontra-se cromatina condensada e apenas um membro de cada par de cromossomas (Eddy e O'Brien, 1993).

A membrana plasmática é composta por lípidos, maioritariamente fosfolípidos, colesterol e proteínas. Os lípidos estão dispostos por camadas onde a parte hidrofílica está disposta para o exterior e a hidrofóbica para o interior. As proteínas estão interligadas com os lípidos. A relação entre o colesterol e a natureza dos fosfolípidos determinam a flexibilidade da membrana (Hammerstedt *et al.*, 1990; Juhász *et al.*, 2000). A membrana plasmática tem permeabilidade selectiva e actua como uma barreira, mantendo, diferenças de composição intra e extra celular. Danos nesta estrutura, podem levar a perda da homeostase com posterior morte celular (Aman & Pickett, 1987).

A integridade e funcionalidade da membrana plasmática são indispensáveis para a viabilidade da célula, uma vez que condicionam a manutenção da permeabilidade selectiva, actividades metabólicas intracelulares, pH e composição iónica (Kumi – Diakata e Badtram, 1994; Rota *et al.*, 1996; Juhász *et al.*, 2000).

#### **2.8.1.2. Peça Intermediária**

Encontra-se na parte posterior da cabeça, correspondendo à zona de inserção da cauda. É uma estrutura pequena, complexa e frágil onde se encontra o centríolo, ponto de origem do filamento axial que é a estrutura principal da cauda. Em épocas quentes ou em situações de stress a peça intermediária pode lesionar-se, separando a cauda da cabeça (White, 1962; Setchel, 1977).

A peça intermediária é tida como uma importante reserva energética suplementar para o espermatozóide, pois é nesta zona em que o espermatozóide é rodeado por uma mitocôndria espiralada, que contém enzimas ligadas ao metabolismo oxidativo do espermatozóide (Bloom e Birch-Anderson, 1960; Juhász *et al.*, 2000), fornecendo-lhe reservas energéticas e conseqüentemente motilidade (Bishop citado por Setchel, 1977).

### **2.8.1.3. Cauda**

A cauda é o elemento locomotor dos espermatozóides, sendo o seu movimento causa responsável pela propulsão dos espermatozóides nos líquidos. Tem um comprimento médio de  $80,45 \pm 6,16 \mu\text{m}$ . Pode ser diferenciada em três regiões: Peça próxima – é a parte mais grossa da cauda, está rodeada por uma lâmina mitocondrial, que lhe confere energia necessária para a locomoção (Juhász *et al.*, 2000); Peça Principal – é a estrutura mais comprida da cauda e contém os elementos propulsores da mesma (Juhász *et al.*, 2000); Peça Terminal – é uma estrutura relativamente curta e desempenha uma função motora.

## **2.9. Conceito de Capacitação Espermática e Reacção Acrossômica**

Nos mamíferos, os espermatozóides sofrem um processo de exocitose, designado por reacção acrossômica, antes de fertilizar os óvulos. Para que ocorra a reacção acrossômica nos espermatozóides ejaculados, é necessário que estes sofram uma série de alterações, processo este, designado por capacitação, o qual ocorre *in vivo* durante a passagem dos espermatozóides através da genitália feminina ou *in vitro* durante a incubação dos espermatozóides em meios de cultura apropriados (Yanagimachi, 1988).

A capacitação do espermatozóide permite: a união deste com a zona pelúcida, a reacção acrossómica e a hipermotilidade que permite aos espermatozóides deslizarem sobre um fluído viscoso do oviducto e penetrar na zona pelúcida (Yanagimachi, 1988).

A reacção acrossómica (Figura 2.5) é um processo irreversível e é essencial para a fertilização. Este processo envolve a fusão e a formação de uma vesícula da membrana do acrossoma com a membrana plasmática da célula espermática, o que permite a liberação das suas enzimas hidrolíticas. A reacção somente ocorre após a ligação do espermatozóide com a zona pelúcida (Yanagimachi, 1994).

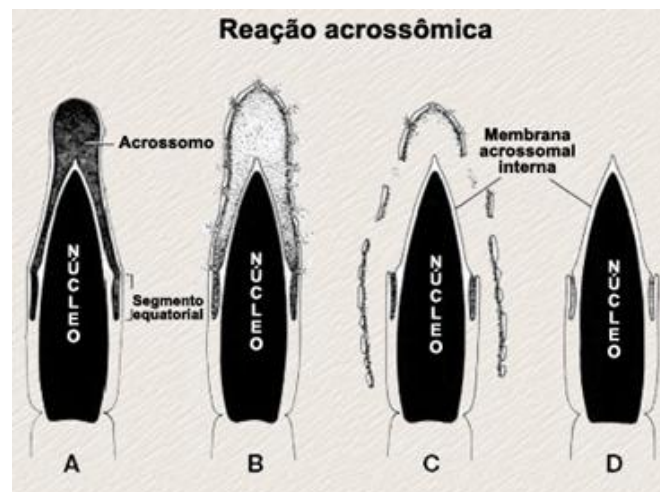


Figura 2.5. – Alterações morfológicas na cabeça dos espermatozóides mamíferos durante a reacção acrossómica. A – Vesícula do acrossoma intacta, antes da reacção; B – Fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática do espermatozóide, formando as vesículas acrossomais; C) Progressiva perda da membrana e dos conteúdos acrossomais; D- Finalização da reacção acrossómica com a exposição da membrana acrossomal interna. Adaptado de [http://200.145.142.234/embriologia\\_NOVO/EFecundacao\\_interna\\_e\\_externa/5\\_11.htm](http://200.145.142.234/embriologia_NOVO/EFecundacao_interna_e_externa/5_11.htm).

## **2.10. Recolha de Sêmen**

A recolha de sêmen é feita, genericamente com vagina artificial e inclui a utilização de um manequim ou de uma égua em estro (Silva, 2006).

A recolha de sêmen implica os seguintes materiais e equipamentos: vagina artificial, incluindo manga de borracha; sistema de aquecimento de água e termómetro; lubrificante não espermicida e copo de recolha (Silva, 2006). A recolha e a qualidade do ejaculado têm forte relação com o ambiente em que são feitas as colheitas e com a forma de condução do garanhão.

### **2.10.1. Vagina Artificial**

A vagina artificial é uma imitação da vagina de uma égua, proporcionando uma temperatura, pressão e lubrificação adequadas para facilitar a ejaculação (Hafez, 1988).

A montagem da vagina inicia-se pela colocação da manga de borracha no interior do corpo da vagina. Com a manga bem alinhada, as extremidades exteriorizadas são rebatidas sobre os bordos do corpo da vagina e bem fixas com elásticos colocados em volta das extremidades rebatidas. A manga deve ficar esticada, embora não excessivamente. A manga interior deve ser rebatida e fixa sobre o bordo da extremidade proximal do corpo da vagina, ficando a extremidade distal livre e pronta a receber o copo de recolha. Estes copos são de plástico, têm graduação que permite determinar o volume do ejaculado e permitem a adaptação de um filtro para eliminação imediata da fracção com gel e de detritos adicionados ao ejaculado durante a recolha. Os copos de recolha devem ser mantidos em estufa a 37 °C, caso esteja disponível e, essencialmente nas colheitas feitas ao ar livre, o copo de recolha deve ser envolvido por material isolante (Silva, 2006).

Depois de verificada a temperatura interior da vagina artificial, aproximadamente de 44 °C, deve-se confirmar com termómetro, inserindo-o no interior da vagina e acertar caso seja necessário, o qual deve ser lubrificado com lubrificante não espermicida (Froman e Amann, 1983). O copo de recolha deve ser colocado na extremidade da manga interior da vagina. Após recolha, a manga descartável deve ser removida da vagina artificial e deve ser esticada e inclinada em direcção ao copo para facilitar a drenagem completa do sémen. O copo de recolha deve, então, ser separado da manga e transferido para a zona de observação e avaliação do ejaculado (Silva, 2006).

### **2.11. Criopreservação do Sémen de Equino**

Vários factores devem ser considerados no congelamento de sémen de garanhões: exposição dos espermatozóides à refrigeração, danos causados pelos cristais de gelo e mudanças intracelulares devido à desidratação (Amann & Pickett, 1987).

Para ocorrer fertilização, o espermatozóide deve possuir as seguintes características no congelamento e descongelamento: metabolismo para produção e energia; motilidade progressiva; enzimas localizadas no acrossoma e proteínas na membrana plasmática. Estes quatro factores são importantes para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da égua e para a ligação do mesmo com a membrana plasmática do ovócito para a fertilização. A destruição de componentes da célula espermática, associada a um ou mais factores acima descritos pode reduzir a fertilidade. Um espermatozóide móvel nem sempre é fértil, normalmente tem uma produção adequada de energia, podendo no entanto, sofrer danos noutros factores (Amann & Pickett, 1987). Quando uma amostra de espermatozóides passa pelo processo de congelação, formam-se cristais de gelo extracelular quando a temperatura se aproxima dos 0°C. Tal acontece devido ao aumento da concentração de sais no líquido

extracelular. A água movimenta-se do interior do espermatozóide para o meio extracelular, desidratando progressivamente a célula. Para que haja sucesso na congelação deve haver equilíbrio entre a velocidade de congelamento e a concentração de sais intracelulares (Amann & Pickett, 1987).

Os danos causados aos tecidos durante os processos de congelamento e descongelamento devem-se a vários factores: formação de cristais de gelo intracelulares, que afectam a estrutura da célula; concentração de soluto resultante do processo de desidratação, que ocorre durante o congelamento tanto no meio extra como intracelular e interacção entre esses dois factores (Pickett, 1986).

Se a redução do volume celular atingir um mínimo crítico, a bicamada de fosfolípidos da membrana celular fica comprimida, danificando a sua estrutura e conseqüentemente as funções de transporte e de protecção da membrana. A danificação da membrana promove uma ponte para entrada do gelo extracelular para o interior da célula (Storey & Storey, 1990).

Os crioprotectores possuem várias funções: diminuem a formação de cristais de gelo intracelulares, evitando a desidratação das células (Mazur, 1970; Meryman *et al.*, 1977; McGann, 1978; Jondet *et al.*, 1984), exercem uma acção estabilizadora durante as mudanças de um estado líquido para o sólido e vice-versa no descongelamento, diminuindo os efeitos das altas concentrações osmóticas durante a desidratação celular. (Seidel Jr, 1986). Apesar dos benefícios dos crioprotectores, não existe uma técnica de criopreservação celular que garanta 100% de sobrevivência após o congelamento/descongelamento, devido à sua toxicidade que limita a eficácia da acção crioprotectora (Fahy, 1986), podendo, também, alterar a polaridade do meio extracelular e lesar as membranas (Arnold *et al.*, 1983).

## 2.12. Avaliação do Sêmen

A avaliação do sêmen é feita através do número de espermatozóides e a sua motilidade, a morfologia do espermatozóide num ejaculado (Rodriguez- Martinez *et al.*, 1996), provas de fluorescência e integridade do acrossoma (Chaveiro, 1999).

Vários métodos de análise seminal têm sido desenvolvidos para avaliar mais objectivamente os parâmetros funcionais do espermatozóide de forma a relacionar parâmetros seminais com a fertilidade (Papadopoulos *et al.*, 2005).

Para avaliação da capacidade fertilizante, utiliza-se a fusão do espermatozóide com a zona pelúcida, a indução da reacção acrossómica, o teste de penetração do espermatozóide com a zona pelúcida, a fertilização *in vitro* e o desenvolvimento embrionário (Chaveiro, 1999).

### 2.12.1. Análise Macroscópica

- Aparência: O sêmen fresco de garanhão, possui uma aparência de cor branca acinzentada e opaca. Detritos, urina ou sangue no ejaculado afectam gravemente os espermatozóides e indicam problemas no aparelho reprodutor ou urinário do garanhão (Juhász *et al.*, 2000).

- Volume: determinado a partir da ejaculação. O gel deve ser removido durante ou imediatamente após a recolha de sêmen (Juhász *et al.*, 2000).

### 2.12.2. Análises Microscópicas

- Motilidade: A avaliação da motilidade dos espermatozóides é um dos mais importantes testes realizados. Os resultados obtidos são subjectivos quando efectuados por um observador, por isso, requerem que seja uma pessoa com boa experiência, para que os resultados sejam de confiança. Contudo, a percentagem de motilidade

espermática avaliada visualmente não está altamente correlacionada com a fertilidade (Juhász *et al.*, 2000).

A análise realiza-se numa escala de 0 (sem mobilidade) a 5 (movimentos de onda muito rápidos) (Evans e Maxwell, 1990).

- Concentração: A determinação da concentração dos espermatozóides no ejaculado é importante, pois é através deste parâmetro que se determina a dose correcta para a Inseminação Artificial ou para calcular o volume das amostras de sémen (Juhász *et al.*, 2000). Segundo Morel (1999), a concentração de espermatozóides no ejaculado é influenciada por variados factores, entre eles a estação do ano, idade, tamanho testicular, frequência de uso, raça, além de factores ambientais (incluindo temperatura, radiação, nutrição e produtos químicos tóxicos e fármacos), anomalias físicas e hormonais, doenças e infecções.

- Número Total de Espermatozóides: É calculado através do volume e da concentração. A produção de espermatozóides depende da idade, do volume testicular, da capacidade de reserva de espermatozóides no epidídimo, da época de reprodução e frequência de recolhas (Pickett, 1993; Juhász *et al.*, 2000).

- Hipoosmotic Swelling Test (HosT): É um teste relativamente simples no que diz respeito à avaliação da integridade funcional da membrana que reveste a parte principal da cauda do espermatozóide. Para que ocorram processos de capacitação, reacção do acrossoma e ligação da célula espermática à superfície do ovócito é necessário que a membrana plasmática esteja bioquimicamente activa. Inicialmente, este teste foi desenvolvido para sémen humano (Jeyendran *et al.*, 1984), mais tarde foi

utilizado em sémen de bovino (Correa & Zavos, 1994; Correa *et al.*, 1997) e suínos (Vasquez *et al.*, 1999; Melo & Henry, 1999; Lagares *et al.*, 2002; Fürst, 2006).

Durante o teste hiposmótico, a actividade bioquímica do espermatozóide promove o influxo da água, em decorrência da maior osmolaridade presente no interior da célula espermática, desencadeando o aumento do volume interno para o equilíbrio entre o compartimento extracelular. O aumento do volume é associado à expansão da membrana celular que cobre a cauda, provocando o enrolamento da mesma. Este fenómeno ocorre em situações em que o espermatozóide possui a membrana funcionalmente intacta. O enrolamento inicia-se na extremidade da parte distal da cauda e prossegue para a peça intermediária e cabeça, onde a pressão osmótica é reduzida (Drevius & Eriksson, 1966; Jeyendran *et al.*, 1984).

### **2.12.3. Citometria de Fluxo**

O primeiro citómetro foi desenvolvido por Kamenstry e os seus colaboradores em 1965 (Kamenstry *et al.*, 1965).

O poder do citómetro de fluxo reside na capacidade de medir vários parâmetros em dezenas de milhares de células individuais em poucos minutos. Assim sendo, este método pode ser usado para definir e enumerar com precisão subpopulações. Uma vez identificada, cada subpopulação poderá ser separada e usada para novos estudos ou até ser separadas fisicamente. Desta forma, podem-se classificar dois tipos básicos de citometria de fluxo: os que só analisam células e os que analisam células e também as separam fisicamente (Moreira da Silva, 1994).

Têm por princípio básico aspirar as células ou partículas de uma suspensão previamente preparada, forçando-as a passar uma de cada vez, sequencialmente, por uma câmara especial (“*flow cell*”). Assim, as partículas ficam envolvidas e centralizadas

num fluxo contínuo de líquido (“*sheath fluid*”), sendo interceptadas por um feixe de laser. Após a intercepção pelo feixe luminoso, dois tipos de fenómenos físicos sucedem, dispersão da luz e fluorescência, dando informação acerca da célula.

Existem várias características intrínsecas às células que provocam dispersão da luz: o tamanho, o núcleo, a membrana celular, os organelos interiores, a forma e a superfície (rugosa ou lisa). A dispersão da luz não se processa em todas as direcções de igual forma, sendo que a maior dispersão é no sentido frontal, ou seja directamente para a frente. Denomina-se “*forward scatter*” - FSC ao tipo de luz que possui dispersão frontal e tem como função medir o tamanho da célula. A luz que possui dispersão formando um ângulo recto designa-se de “*Side Scatter*” – SSC, não apresentando correlação com o tamanho da célula, mas com a densidade celular e dos organelos, encontrando-se, desta forma, dependente da complexidade da célula (Orfao e González de Buitrago, 1995).

Segundo Bertho *et al.* (2000), os corantes fluorescentes específicos (fluorocromos) são utilizados para observar os componentes celulares que se deseja, uma vez excitados pelo laser emitem luz de acordo com as características fluorescentes e são utilizadas para examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares.

Desta forma, uma população de células passa pelos tubos capilares, que contém um sistema óptico que regista os parâmetros que se deseja medir, transferindo os dados para um computador (Orfao *et al.*, 1995). Através do sistema óptico regista-se como a célula reage após o estímulo com o laser de argón em relação à dispersão da luz incidente e a sua capacidade de emitir fluorescência. As lentes colocadas próximas da zona de intercepção recolhem a luz dispersa e enviam-na para tubos fotomultiplicadores que convertem o sinal luminoso em impulsos eléctricos. Os fotões de luz dispersos e emitidos pela célula são separados por vários comprimentos de onda,

por vários filtros ópticos e espelhos que apenas deixam passar a luz de comprimento de onda desejado. Os fotomultiplicadores, geram sinais eléctricos que são amplificados, sendo acumulados numa frequência de distribuição ou histograma (Bertho *et al.*, 2000). A amostragem dos dados, análises e interpretação são realizadas através de softwares específicos.

#### **2.12.3.1. Limitações e aplicações da Citometria de Fluxo**

Esta técnica torna-se vantajosa, uma vez que é uma técnica semi-automatizada, em que processa e analisa conjuntamente, um grande número de amostras, mesmo utilizando pequenas amostras num espaço de tempo, relativamente reduzido, permite analisar várias características celulares, tais como o tamanho, complexidade, ADN, entre outros (Gorczyca *et al.*, 2004).

Existe a necessidade de cuidados especiais na aplicação da técnica, de modo que a sua sensibilidade e praticabilidade sejam acompanhadas de precisão, tornando-se uma técnica dispendiosa, pois requer a presença de técnicos especializados (Gorczyca *et al.*, 2004).

#### **2.12.3.2. Fluorocromos**

Utilizados em citometria de fluxo, os fluorocromos são compostos fluorescentes que têm como funcionalidade a avaliação de estruturas celulares, actuando como marcadores de um aspecto celular a quantificar. Os compostos fluorescentes devem ser combinados de forma cuidadosa, com diferenças mínimas no espectro de emissão para quantificar individualmente os diferentes aspectos a medir e a observar (Harrison e Vickers, 1990).

A aglutinina de *Arachis hypogea* (FITC-PNA) é utilizada em citometria de fluxo para fazer a distinção entre um acrossoma intacto e um acrossoma que sofreu danos na sua estrutura (Rathi *et al.*, 2001). Os fluorocromos utilizados para o estudo de ácidos nucleicos são o Propídio Iodado (PI), o Brómio de Etídio, o Laranja de Acridina, o Hoechst 33342, o Laranja de Tiazol, a Mitramicina e a Cromomicina A3.

Existem diferentes formas de marcar estruturas celulares e as suas funções: através da ligação dos fluorocromos aos componentes celulares específicos; ou distribuindo-se num compartimento celular específico (marcadores de núcleo, mitocôndrias e vacúolos), ou especificamente num organelo celular de acordo com o seu estado funcional (mitocôndria) ou utilizando ligantes específicos, anticorpos ou lectinas conjugados com fluorocromos; ou através de uma marcação negativa (Harrison e Vickers, 1990).

#### **2.12.3.3. SYBR – 14**

É um ácido nucleico que se liga ao núcleo das células com membrana plasmática intacta, determinando assim as células vivas ao emitir uma fluorescência verde, sendo excitado com laser de argon de 488nm de comprimento de onda (Duane *et al.*, 1995).

#### **2.12.3.4. FITC-PNA**

Um dos primeiros fluorocromo a ser utilizado foi o FITC-PNA, *Fluorescein Isothiocyanate – Conjugated – Arachis hypogea*, é uma molécula pequena com alta afinidade para proteínas, sendo excitada com laser de argon de 488nm de comprimento de onda. (Rathi *et al.*, 2001).

Este fluorocromo é utilizado para distinguir um acrossoma intacto de um acrossoma danificado (Cross & Watson, 1994), colorando os acrossomas danificados,

uma vez que o PNA liga-se a acrossomas danificados, emitindo uma fluorescência verde, com comprimento de onda de 525 nm (Mocé *et al.*, 2006).

#### **2.12.3.5. PI**

Este fluorocromo é excitado por um feixe de luz de 488nm de comprimento de onda, emitindo uma fluorescência vermelha, com aproximadamente 620 nm de intensidade. Une-se à membrana citoplasmática quando esta se encontra danificada, interligando-se com o ADN.

#### **2.12.3.6. SYBR-14 E PI**

A conjugação dos fluorocromos SYBR-14 e PI permite a determinação em simultâneo da viabilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozóides, o SYBR-14 emite uma fluorescência verde e o PI uma fluorescência vermelha. Através da junção destes dois fluorocromos, obtém-se três populações: coradas com SYBR-14 que determinam a população de espermatozóides vivos (R1), coradas com PI que determinam a população de espermatozóides mortos (R2), e os corados com SYBR-14 e PI que determinam a população de espermatozóides moribundos (R3) (Figura 2.6).

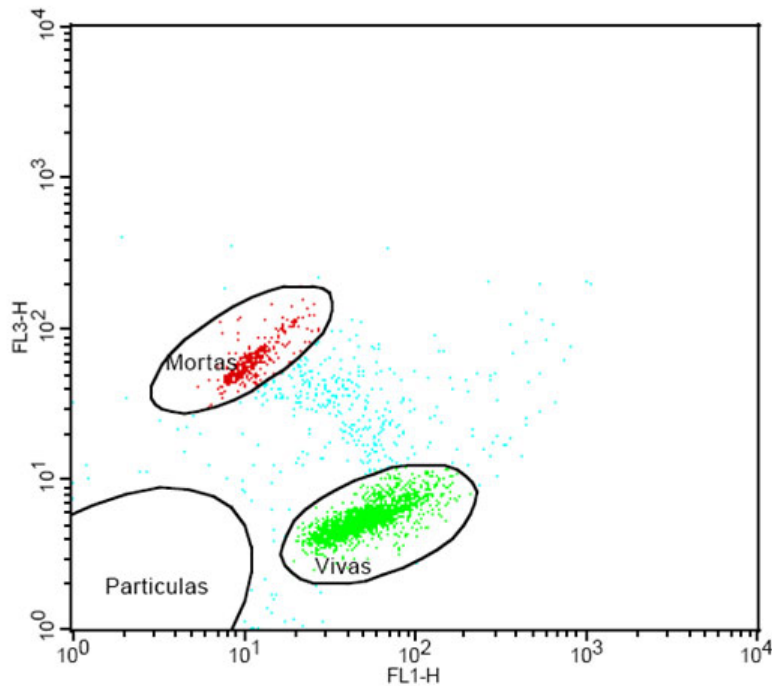


Figura 2.6. Figura representativa da análise por citometria de fluxo de sêmen de garanhão para avaliar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. A fluorescência emitida pelo SYBR 14 é detectada pelo FL1 (eixo das abcissas – X). A fluorescência emitida pelo PI é detectada pelo FL3 (eixo das ordenadas). Os espermatozoides que emitem fluorescência verde são corados com SYBR 14 e representam a população de espermatozoides vivos. Os espermatozoides corados que emitem a fluorescência vermelha são corados com o fluorocromo PI e representam a população de espermatozoides mortos.

#### 2.12.3.7. FITC-PNA e PI

A junção dos fluorocromos FITC-PNA e PI permite a determinação em simultâneo da viabilidade e da integridade do acrossoma dos espermatozoides, emitindo o FITC-PNA uma fluorescência verde e o PI uma fluorescência vermelha. Através desta junção, obtém-se quatro populações de espermatozoides: vivos com o acrossoma

intacto, marcados negativamente pelo Propídio Iodeto e positivamente pelo FITC-PNA (LL); vivos com o acrossoma danificado, marcados negativamente com o Propídio Iodeto e FITC-PNA (LR); mortos com o acrossoma intacto, marcados positivamente com o Propídio de Iodeto e com o FITC-PNA (UL); mortos com o acrossoma danificado, marcados positivamente com o Propídio Iodeto e negativamente com a FITC-PNA (UR) (Figura 2.7).

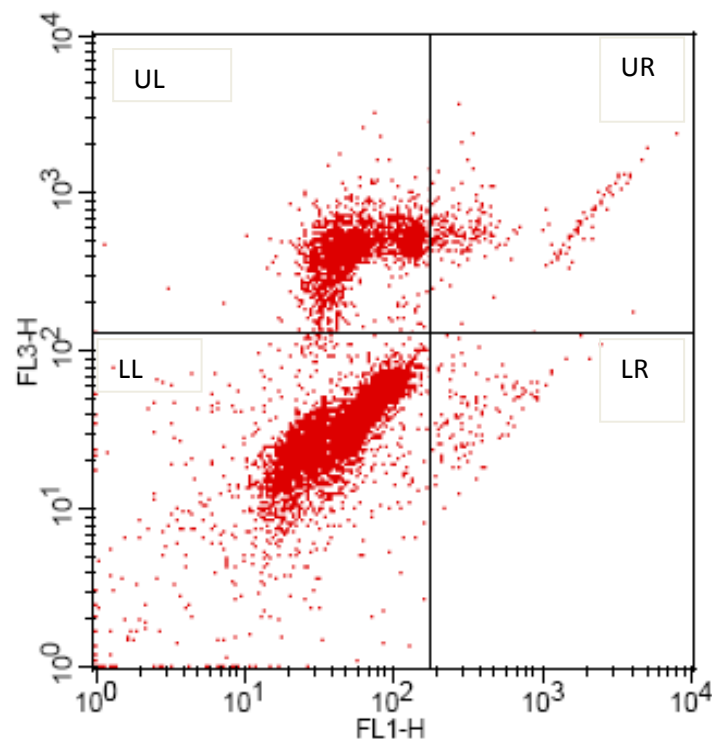


Figura 2.7.- Figura representativa da análise por citometria de fluxo de sêmen de garanhão para avaliar a integridade acrossômica dos espermatozoides. A fluorescência emitida pelo FITC-PNA é detectada pelo FL1 (eixo das abcissas – X). A fluorescência emitida pelo PI é detectada pelo FL3 (eixo das ordenadas). Todos os espermatozoides marcados com o fluorocromo PI e localizados acima da linha horizontal são considerados mortos com o acrossoma intacto (UL) ou mortos com acrossoma danificado (UR). Os espermatozoides viáveis são assinalados pelo FITC-PNA e

delimitados por uma linha vertical na figura, sendo considerados espermatozóides vivos com acrossoma intacto (LL) e espermatozóides vivos com acrossoma danificado (LR).

#### **2.12.3.8. Processamento de Amostras**

O requisito principal para que uma amostra seja analisada em citometria de fluxo é que esteja em suspensão monodispersa (Bacal e Faulhaber, 2003). A temperatura e o armazenamento são factores importantes, pois podem influenciar a viabilidade celular (Orfao e Gonzáles de Buitrago, 1995).

#### **2.12.3.9. Avaliação da Viabilidade Espermática**

Segundo Ericsson *et al.* (1989), o número de espermatozóides viáveis existentes numa dose de inseminação está correlacionado com a capacidade fecundante da mesma. Contudo, os testes tradicionais de avaliação da integridade da membrana do espermatozóide quando relacionados com a fertilidade não apresentam resultados eficazes (Graham *et al.*, 1990), sendo o uso de diferentes fluorocromos o método mais correcto na análise da viabilidade espermática (Juhász *et al.*, 2000).

Com a evolução das técnicas de citometria de fluxo a utilização de dupla coloração da população em estudo, tornou-se prática recorrente. Desta forma, para avaliar a viabilidade espermática, pode-se recorrer a diferentes fluorocromos conjugados. Neste estudo, utilizou-se os fluorocromos SYBR-14 e PI de forma a classificar a população de espermatozóides como vivos/mortos. O PI liga-se ao ADN dos espermatozóides mortos e moribundos emitindo uma fluorescência vermelha, enquanto que o SYBR-14 liga-se ao ADN dos espermatozóides vivos emitindo uma fluorescência verde (Garner *et al.*, 1986)

### 2.12.3.10. Avaliação da Integridade Acrossômica

Para fertilizar um ovócito, o espermatozóide deve possuir a membrana do acrossoma intacta. O espermatozóide sofre reacção acrossômica para que ocorra penetração na zona pelúcida e fusão com a membrana do ovócito (Juhász *et al.*, 2000).

Entende-se por reacção acrossômica, a fusão progressiva da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa do espermatozóide.

Várias técnicas têm sido utilizadas para diferenciar o acrossoma intacto do danificado (Gros and Meizel, 1989; Juhász *et al.*, 2000). A resposta fisiológica da reacção acrossômica é um processo que só ocorre em espermatozoides vivos, denominando-se por reacção acrossômica verdadeira. A danificação do acrossoma pode ocorrer devido a alterações degenerativas da membrana, em situações de congelamento de sémen e é denominada por reacção acrossômica falsa (Bedford, 1970; Juhász *et al.*, 2000). Para diferenciar estas duas reacções são utilizadas colorações acrossômicas recorrendo a vários tipos de fluorocromos (Crosse *et al.*, 1986; Varner *et al.*, 1987; Casey *et al.*, 1993; Meyers, 1996). A coloração do acrossoma pode ser usada para avaliação das anormalidades acrossômicas; avaliação do efeito da criopreservação na integridade do acrossoma e avaliação do acrossoma durante a capacitação para fertilização *in vitro*. Em espécies, como nos bovinos, o acrossoma é de grande dimensão sendo possível a sua visualização ao microscópio de contraste de fase, sem ser necessário recorrer ao uso de fluorocromos. Em outras espécies, como em ratos, humanos e em equinos, o acrossoma é de pequena dimensão e por isso, torna-se necessária a utilização de fluorocromos (Cross e Meizel, 1989).

Nos equinos, têm sido desenvolvidas várias técnicas para avaliar a reacção acrossômica, incluindo a utilização do FITC – PSA (*Fluorescein Isothiocynate – Conjugatd- Pisum sativum*) e FITC-PNA (*Fluorescein Isothiocyanate – Conjugated –*

*Arachis hypogea*). A visualização do acrossoma com o FITC-PNA mostra claramente os diferentes estádios da reacção acrossómica e é utilizado para a avaliação dos danos da membrana acrossómica sem que haja permeabilização da célula (Farlin *et al.*, 1992; Szász, 1999).

### **2.13. História técnica Fertilização *In Vitro***

Há mais de um século, observou-se pela primeira vez, a fecundação de um óvulo de uma estrela-do-mar com a posterior formação da primeira célula do futuro embrião.

Os primeiros trabalhos realizados em embriologia de mamíferos foram realizados em coelhos devido às suas características biológicas favoráveis.

Em 1875, Van Beneden, descreveu estados embrionários pré-implantados e no ano de 1890 Heape, descreveu o processo de transferência de embriões para o oviducto. Mais tarde, em 1929, Lewis e Gregory procederam à realização de um filme de sucessivas clivagens de uma mórula em cultura. Contudo, a compreensão das necessidades nutricionais e das limitações impostas pelas características físico-químicas dos meios de melhor qualidade, permitiram progressos significativos na área da cultura de embriões fertilizados *in vitro*.

Em 1956, Wesley Whitten propôs uma nova formulação para os meios de cultura, que passaria a ser utilizada tanto na recolha como na cultura dos embriões, aumentando o número de embriões implantados com sucesso. Whitten desenvolveu um meio utilizando uma solução de Krebs-Ringer bicarbonato, suplementada com albumina sérica bovina, promovendo assim as clivagens de um embrião de um rato com uma célula até ao estado blastocisto.

Em 1959, Chang marcou a história da FIV, ao relatar o nascimento do primeiro mamífero, um coelho, a partir desta técnica. Desde aí, até ao final dos anos 70, outros

relatos de nascimentos de mamíferos saudáveis foram registados. Após Chang, Whittingham em 1968, obteve sucesso trabalhando com ratos e mais tarde Toyoda e Chang definiram a FIV para ratos. Em 1978 deu-se um novo avanço na FIV, Steptoe e Edwards obtiveram sucesso no nascimento do primeiro bebé humano.

No que diz respeito a animais de produção animal, só na década de 70 surgiram os primeiros relatos de sucesso no nascimento após maturação *in vitro*, seguida de transferência para a fertilização dos embriões *in vivo*. Em 1971 filhotes saudáveis de ovelhas foram produzidas por Crosby e pela sua equipa. No mesmo ano, Leman e Dziuk obtiveram sucesso num trabalho efectuado com porcos, resultado confirmado mais tarde, em 1984, por Motlik e Fulka. O primeiro nascimento de um bezerro a ser produzido por esta técnica foi descrito em 1970, e foi realizada por Sreenan e pela sua equipa.

Até esta data, não existiam relatos de produção de bezerros pela FIV. Mesmo com as técnicas de transferências de embriões produzidos *in vivo* em bovinos a ser muito utilizada na década de 70, os esforços para produzir bezerros *in vitro* foram considerados por Blandau em 1980 um “total fracasso”. Mesmo após as afirmações de Blandau sobre as dificuldades de produzir um bezerro *in vitro*, Brackett *et al.* (1982) foram os primeiros a descrever o nascimento de um bezerro sadio a partir da FIV. Este nascimento deu-se a 9 de Junho de 1981, revolucionando a técnica da FIV e da comunidade científica.

No ensaio de Brackett *et al.* em 1982, trabalhando com bovinos, utilizaram 22 doadoras e 7 receptoras. Para a fertilização foi utilizado sémen de animais seleccionados para a inseminação artificial que indicavam uma boa qualidade seminal. O sémen utilizado foi tanto fresco como congelado. Os ovócitos foram recolhidos por via cirúrgica, num total de 177 ovócitos, dos quais 52% fertilizaram. Apesar da elevada

percentagem de embriões produzidos, só uma gestação foi obtida. O embrião foi transferido no estado de quatro células. Assim sendo, o primeiro bezerro que nasceu pela técnica da FIV, pesava 45 kg e ao longo dos meses de desenvolvimento não foram observadas alterações no desenvolvimento e no comportamento do animal.

Desde este progresso, a produção *in vitro* (PIV) de bovinos sofreu um grande impulso por se ter verificado que existia um grande potencial tanto para a espécie humana como animal.

### **2.13.1 Técnica de Fertilização *in vitro***

#### **2.12.1.1. Definição de Fertilização**

A fertilização é um fenómeno biológico complexo, que ocorre entre os gâmetas masculinos e femininos. O gâmeta de cada um dos sexos é composto por células haplóides, que quando se fundem, formam uma célula diplóide, originando um ovo ou zigoto. O zigoto ou ovo é portador de caracteres hereditários, tanto de origem paterna, como de origem materna (Crozet, 1991).

A fertilização *in vitro* (FIV) é uma técnica de reprodução assistida que consiste na incubação dos espermatozóides com os ovócitos em meios que podem fornecer elementos exigidos para a maturação final, para a fusão e são ainda capazes de suportar os primeiros estados de desenvolvimento embrionário (Guerin *et al.*, 1996).

#### **2.13.1.2. Aplicações e Limitações da FIV**

A técnica de FIV tem sido utilizada para diferentes seguimentos da reprodução assistida das áreas humana e animal. Inicialmente, esta técnica era aplicada para estudar fenómenos fisiológicos relacionados com os gâmetas masculinos e femininos. A partir

destes estudos, houve um melhor entendimento dos fenómenos de crescimento, maturação e fecundação de ovócitos, da capacitação espermática, bem como do desenvolvimento embrionário precoce e dos seus mecanismos de regulação.

A FIV tem apoiado o desenvolvimento de biotécnicas como o caso da clonagem por transferência nuclear, transgênese, sexagem de espermatozóides e embriões, criopreservação de ovócitos e embriões.

Segundo Graham & Mocé (2005) o potencial de fertilização de uma amostra de sémen pode ser obtido pela identificação e avaliação das características seminais correlacionando os resultados com a técnica de FIV, uma vez que a avaliação simultânea da ligação e penetração da ZP oferecem uma relevância biológica para este tipo de ensaio, dado que nem todos os espermatozóides que se ligam à ZP são capazes de a penetrar (Waberski *et al.*, 2005). O número de espermatozóides ligados à ZP e os que se encontram no espaço perivitelino é considerado proporcional à capacidade fertilizante dos espermatozóides (Codde e Berger, 1995).

No entanto, esta técnica não pode ser utilizada como avaliação de rotina devido aos custos e ao tempo necessário para todo o processo (Coetzee *et al.*, 1998).

### **2.13.2. Fertilização *In Vitro* Heteróloga**

A FIV heteróloga surgiu como um método de avaliação da capacidade fecundante do sémen fresco e congelado (Taberner *et al.*, 2009), onde os gâmetas femininos utilizados não são da mesma espécie que os gâmetas masculinos. Apesar de vários autores defenderem que a FIV providencia uma técnica útil para aferir a fertilidade (Censyra, 1994; Brahmksutri *et al.*, 1999; Bryne *et al.*, 2000; Popwell e Flowers, 2004; Ruíz-Sánchez *et al.*, 2006), a FIV heteróloga tem vantagens em relação à fertilização homóloga, pois reduz o tempo dispendido por avaliação (Papadopoulos,

2005). Efectivamente, enquanto que o teste de FIV homóloga decorre durante 13 a 14 dias o teste de FIV heteróloga decorre apenas durante 5 a 6 dias, ao mesmo tempo que reduz os custos envolvidos na FIV homóloga e aumenta o número de repetições devido a uma maior disponibilidade de ovários de vaca e de ovócitos por ovário. Esta técnica permite avaliar uma série de funções do sémen em simultâneo (motilidade, reacção acrossómica, penetração no ovócito e descondensação do ADN), a qual avalia melhor as características seminais que qualquer dos testes que avaliam apenas uma característica específica (Bousquet and Brackett, 1981, 1982; Bousquet *et al.*, 1983; Brahmkshtri *et al.*, 1999; Taberner *et al.*, 2009), podendo ser utilizada para avaliar a capacidade de penetração do espermatozóide (Wheeler and Seidel, 1987; Tatemoto *et al.*, 1994; Matás *et al.*, 1996; Hay *et al.*, 1997; Gadea *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 2000).

Ovócitos de mamíferos têm sido utilizados em testes para verificar a capacidade fecundante de sémen humano (Yanagimachi *et al.*, 1976; Terada *et al.*, 2004; Liu e Baker, 1992; Canovas *et al.*, 2007; Taberner *et al.*, 2009), de felinos em extinção (Swanson and Wildt, 1997; Baudi *et al.*, 2008), de espécie bovina não doméstica (McHugh e Rutledge, 1998), de equinos (Brackett *et al.*, 1982; Choi *et al.*, 2003; Campos-Chillón *et al.*, 2007) e de asnos (Taberner *et al.*, 2009).

Segundo Brackett *et al.* (1982) a primeira avaliação da viabilidade de sémen de garanhão através da penetração de ovócitos desprovidos de zona pelúcida, foi efectuada em hamsters com uma taxa de penetração 83%.

Landim-Alvarenga *et al.* (2001) reportou a utilização de ovócitos de bovino para a fertilização *in vitro* heteróloga, tratados com calcium inophore A23187 e obtiveram uma taxa de penetração de 26%.

Choi *et al.* (2003) efectuou um estudo para verificar a capacitação do sémen de equino utilizando soro de albumina de bovino (BSA) ou álcool polivinílico (PVA)

obtendo taxas de penetração de 47%. Nestes testes, os ovócitos são penetrados por espermatozoides e fixados, de forma a verificar se no interior do ovócito existe espermatozoides com descondensação da cabeça ou formação de pró - núcleo masculino

### III – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho, sem referência em contrário, foram adquiridos essencialmente à companhia Sigma Chemical CO. (St. Louis, Mo, USA) e à Merck (Darmstadt, Alemanha) (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1:** Referência dos reagentes utilizados.

Reagente	Referência	Fornecedor
Cloreto de Sódio	1.06404	Merck
Piruvato de Sódio	P2256	Sigma
Cloreto de Potássio	1.04936	Sigma
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	S-5011	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.04873	Sigma
Glucose	G-7021	Sigma
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	M – 2393	Sigma
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	1.02382	Merck
Penicilamina	P4875	Sigma
Streptomicina	S9137	Sigma
Hepes	M7528	Sigma
TCM 199	M 4530	Sigma
Gentamicina	G1264	Sigma
Nistatina	N4014	Sigma
FCS	A 7906	Sigma
FSH	F-2293	Sigma

Estradiol	E-2257	Sigma
Glutamina	G 6013	Sigma
Fenol Vermelho	5530	Sigma
Potassium Penicilina G	P 3032	Sigma
Hyaluronidase	H 3506	Sigma
Pronase	P-8811	Sigma
8-Bromoadenosine 3',5'- Cyclic monophosphate	B5386	Sigma
BSA	A-9647	Sigma
Anexina V-FITC	51-65874X	BD Pharmigen
Propídio Iodado	51 – 66211E	BD Parmigen
Óleo Mineral	M -5310	Sigma

### 3.2. Recolha dos Ovários

A recolha dos ovários foi efectuada no Matadouro da Ilha Terceira - IAMA, imediatamente após o abate das vacas, sem qualquer referência ao estado de gestação e do seu ciclo sexual. Foram recolhidos 116 ovários, os quais foram lavados e colocados em frascos com Solução Tampão de Fosfato salino (“*Phosphate Buffered Saline*” – PBS) (Tabela 3.2), previamente aquecida em banho-maria a 37° e transportados para o laboratório de Reprodução Animal da UA, num recipiente térmico, esterilizado e hermético, tendo sido processados num período nunca superior a duas horas.

**Tabela 3.2:** Composição do meio de lavagem dos ovários (Solução PBS; Quantidade: 1 Litro)

Reagentes	Quantidades
NaCl	8g
Piruvato de Sódio	0.036g
KCL	0.2g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.15g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g
Glucose	1g
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.1g
CaCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.1g
Penicilamina	1 x 10 <sup>6</sup> U
Streptomicina	0.5g
Kanamicina	5mg

### 3.3. Punção Folicular

O líquido folicular foi aspirado dos folículos visíveis presentes na superfície do ovário através da punção com uma agulha de 18,5 G aplicada a uma agulha de 10 ml. Os folículos com diâmetro entre 4 a 10 mm foram puncionados, excepto os folículos com aspecto quístico ou luteínizado. Após a aspiração dos folículos, o conteúdo da seringa foi lentamente vertido para tubos de Falcon de 15 ml, previamente aquecidos em banho-maria, a 38,5°C com meio de recolha. Após punção, os tubos foram mantidos em repouso durante cerca de 20 minutos de forma a permitir a sedimentação dos *complexos cumulus-oophurus* (COC's).

### 3.4. Meio de Recolha dos COC's

Após a sedimentação, os COC's foram recolhidos com uma pipeta de Pasteur e procedeu-se à lavagem dos mesmos em meio de recolha, composto pelos seguintes reagentes (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3.** Composição do meio de recolha.

Reagentes	Quantidade
Meio de Cultura de Tecidos 199 (TCM 199)	45 ml
Hepes	25mM
Soro de Vaca em Cio	ml
Gentamicina	5µg/ml
Penistreptomicina	50µg/ml
Nistamicina	50µg/ml

### 3.5. Obervação, Selecção, Contagem e Lavagem dos COC's

Os COC's foram aspirados do fundo do tubo, utilizando uma pipeta de Pasteur e colocados numa caixa de Petri de 60mm de diâmetro esterilizada, com meio de recolha. Com o auxílio de uma lupa e uma micropipeta, numa placa aquecida a uma temperatura de 38,5°C, os COC's foram seleccionados de acordo com a sua morfologia (Antunes *et al.*, 2008) e divididos em categorias de qualidade 1, 2, 3 e 4, tendo sido descartados os COC's do tipo 3 e 4. Após a selecção, os COC's tipo 1 e 2 passaram por dois banhos de lavagem com o meio de recolha e uma lavagem com o meio de maturação. Todas estas

operações foram efectuadas na câmara de fluxo laminar, de forma a garantir um ambiente de assepsia.

### **3.6. Maturação dos COC's**

Após as três lavagens, os COC's foram colocados em caixas de Petri de 35mm, onde maturaram durante 24 horas numa incubadora (Heraeus 6000) a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar e 100% de humidade relativa.

### **3.7. Preparação dos ovócitos para a Fecundação In Vitro Heteróloga**

Após a maturação, os COC's foram colocados em grupos de cinco numa caixa de Petri com PBS, aquecido a 38,5°C, contendo 300U/ml de Hyaluronidase e pipetados para remover as células da granulosa (Choi *et al.*, 2003) e colocados numa placa de Petri com 0,3% de pronase, de forma a remover a Zona Pelúcida (ZP) (Taberner *et al.*, 2009). De seguida, foram efectuados três banhos de lavagem com o meio TYH e colocados em caixas de 4 poços (NUNC), com dez ovócitos por cada poço. Os poços continham 100µl do meio TYH suplementado com BSA e cobertos com óleo mineral da Sigma. No total foram utilizados 373 ovócitos maturados, distribuídos por sete sessões.

### **3.8. Meio de fertilização e de Lavagem do sémen – TYH Medium**

Na preparação do meio TYH utilizou-se os seguintes reagentes (Toyoda *et al.*, 1971) (Tabela 3.4).

**Tabela 3.4.** Composição do meio TYH

Reagentes	Quantidades
NaCl	119,37mM
KCl	4,78mM
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,71 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.19mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,19mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,07 mM
Glucose	5,56 mM
Piruvato de Sódio	0,5 mM
Potássio Penicilina G	75µg/ml
Sulfato de estreptomicina	50 µg/ml
Fenol vermelho	2 µg/ml
BSA ( Fração V)	4 mg/ml

### 3.9. Recolha e Preparação do Sémen

Foram utilizados dois garanhões, um com seis e o outro com oito anos de idade, tendo sido efectuadas no total sete recolhas de sémen a cada garanhão, nos meses de Fevereiro e Março, recorrendo a uma vagina artificial modelo Hannover, com uma temperatura interior de aproximadamente 44°C (Silva, 2006) com uma égua em cio. As três primeiras recolhas foram efectuadas para a limpeza do sémen. Após a recolha, o sémen foi imediatamente filtrado e retirou-se uma amostra para uma lâmina aquecida a 37°C, de forma a ser avaliado ao microscópio óptico a 400X, a mobilidade total e progressiva (Kenney *et al.*, 1983).

O sémen, foi avaliado pelo volume, viabilidade, morfologia, motilidade total e progressiva, concentração espermática e pelo teste hiposmótico (HosT) (Juhász *et al.*, 2000).

A motilidade progressiva e motilidade total dos espermatozóides foi analisada colocando uma gota de 20 µl de sémen, numa lâmina e lamela pré-aquecida, a 37°C, ao microscópio ótico com uma ampliação de 400X. A avaliação de cada característica foi realizada de forma subjectiva, pelo mesmo observador, conforme definição de Kenny *et al.* (1983). Considerou-se como motilidade total a percentagem de movimento.

A concentração espermática, após diluição de 1: 100, foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer.

De seguida, o sémen foi diluído a 1:1 (v/v) com diluidor Kenney (Kenney *et al.*, 1975), distribuído por tubos de Falcon em quantidades iguais, consoante o volume do ejaculado e centrifugado a 600 x g durante cinco minutos (Choi *et al.*, 2003). Após a centrifugação, o sobrenadante foi eliminado e o sémen dividido em duas partes de forma a ser utilizado a fresco e outra parte congelado. À fracção de sémen a ser utilizada em fresco foi adicionado 4 ml de meio TYH suplementado com 0,4% de BSA e novamente centrifugado 300 x g durante 5 minutos.

De seguida, retirou-se o sobrenadante, colocou-se 100 µl do meio TYH suplementado com 0,4% de BSA e adicionou-se 0,5mM de 8-bromoadenosina cíclica monofosfato (8BrcAMP), colocando a amostra na incubadora a 38,5°C e a 5% de CO<sub>2</sub> no ar e saturada de humidade a uma concentração espermática de 5 x 10<sup>7</sup> Spz/ml durante 3,5 horas.

Na fracção de sémen destinado à congelação, adicionou-se 1ml do diluidor GENT e procedeu-se à diluição para que a concentração espermática final fosse de 200 x 10<sup>6</sup> Spz/ml e procedeu-se ao enchimento das palhinhas de 0,5 ml e selou-se com PVA.

As palhinhas foram colocadas no frigorífico a uma temperatura de 5°C durante duas horas, procedendo-se, de seguida, à congelação do sémen com vapores de azoto líquido durante 20 minutos, sendo posteriormente armazenadas no contentor de azoto líquido.

Para descongelar, o sémen foi colocado em banho-maria a 37°C, durante 30 segundos. De seguida, foi colocado num tubo de Falcon com 4ml do meio TYH aquecido a 37°C e centrifugado durante 5 minutos a 600 x g. Após centrifugação retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µl do meio TYH com 0,5mM de 8BrcAMP e colocou-se na incubadora a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar e saturada de humidade, durante 20 minutos.

### **3.10. Fecundação *In Vitro* Heteróloga**

Após a preparação dos ovócitos e do sémen, procedeu-se à FIV, onde os gâmetas femininos e masculinos foram co-incubados durante 18 horas a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar e saturada de humidade.

### **3.11. Fixação e Observação**

Passadas as dezoito horas, colocou-se os ovócitos numa solução de etanol : ácido acético (3:1, v/v) durante 24 horas (Choi *et al.*, 2003). De seguida, as células foram colocadas numa lâmina e coradas com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), procedendo-se à observação ao microscópio de fluorescência a 400X. Foram considerados ovócitos penetrados os que apresentaram no seu interior descondensação da cabeça do espermatozóide ou formação de dois pró - núcleos (feminino e masculino).

### **3.12. Citometria de Fluxo**

Para a análise da membrana plasmática foram adicionados dois fluorocromos à amostra de sémen. Adicionou-se SYBR-14, que emite uma fluorescência verde, marcando todas as células com a membrana plasmática intactas e o fluorocromo PI, que emite uma fluorescência vermelha, marcando todas as células com membrana plasmática danificada (Nagy *et al.*, 2003).

Para a determinação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide, efectuou-se uma solução prévia que continha 2 ml de meio de PBS, 2 µl de solução de 0,1mM de SYBR-14 e 5 µl de solução de 2 mM de PI. Retirou-se 590 µl da solução previamente preparada para um tubo de Falcon de 5 ml ao qual foi adicionado 10 µl de sémen com uma concentração final de  $5 \times 10^7$  Spz/ml.

Para a análise da integridade da membrana acrossómica foram adicionadas as sondas fluorescentes PI e a aglutinina de *Arachis hypogea* (FITC-PNA), segundo Rathi *et al.* (2001).

Para a determinação da integridade acrossómica do espermatozóide, em 490µl de meio PBS foram adicionados 2 µl de solução 2 mM de PI, 30 µl de solução 0,1 mM de FITC-PNA e 10µl de sémen com uma concentração final de  $5 \times 10^7$  Spz/ml. Para ambas as amostras, após 15 minutos de incubação no escuro a 37°C, as amostras foram analisadas num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences; San Jose, CA, USA), equipado com uma fonte luminosa laser de argon, com comprimento de onda de 488nm.

A aquisição de dados e parâmetros de análise foram ajustados para a selecção incluir somente células individuais, excluindo restos e agregados.

Para cada célula foram identificados o FCS (tamanho), SSC (complexidade), e a intensidade da fluorescência verde (FL1) e fluorescência vermelha (FL3), utilizando o software CellQuest®.

Para cada amostra, foram avaliados um total de 10 000 espermatozoides, tendo sido determinado o seu tamanho expresso como “Forward scatter” (FSC) e a sua estrutura interna através do “Side scatter” (SSC).

Os testes para determinar a integridade da membrana plasmática e a integridade do acrossoma foram efectuados separadamente. A FL1, detectou as células com membrana intacta coradas pelo fluorocromo SYBR-14 e as células que sofreram reacção acrossómica, coradas pelo fluorocromo FITC-PNA e foi captada através de um filtro de 520 nm, enquanto a FL3 detectou as células mortas coradas pelo fluorocromo PI e foi captada através de um filtro de 535 nm.

### **3.13. Análise e Tratamento de Dados**

Para análise estatística foi utilizada uma ANOVA para avaliar os resultados obtidos. No caso da existência de diferenças significativas foi aplicado o método LSD (*Least Square Differences*) para análise *post-hoc*, utilizando o software SPSS 17.0 (SPSS Inc).

## IV – Resultados e Discussão

No presente estudo, foi avaliado o efeito da congelação na capacidade de fecundação do sémen de garanhão, recorrendo à fecundação heteróloga com ovócitos de bovino. O sémen foi recolhido nos meses de Fevereiro e Março numa latitude de 38° 40' Norte e longitude de 27° 10'Oeste.

### 4.1. Avaliação Macroscópica do Sémen

O ejaculado do garanhão A registou um volume de sémen livre de gel de  $52,5 \pm 2,5$  ml e o garanhão B de  $22,5 \pm 3,2$  ml (Figura 4.1). Sabe-se que no hemisfério Norte a produção de Spz e a função endócrina testicular são mais elevadas durante a Primavera/Verão do que durante o Outono/Inverno, embora a incidência de anomalias morfológicas tenda a ser menor em ejaculados obtidos no Inverno (Magistrini *et al.*, 1987; Janett *et al.*, 2003 Silva *et al.* 2007). O volume dos ejaculados, que é menor no Inverno, determina que ejaculados obtidos nesta estação do ano sejam significativamente diferentes dos colhidos na Primavera e no Verão relativamente ao número total de espermatozóides, ao número total de espermatozóides vivos e ao número de espermatozóides com movimentos progressivos no ejaculado. Isso significa que parece viável recolher e conservar sémen durante o Inverno mas que o número de doses seminais por ejaculado será inferior ao conseguido com ejaculados colhidos na Primavera ou no Verão.

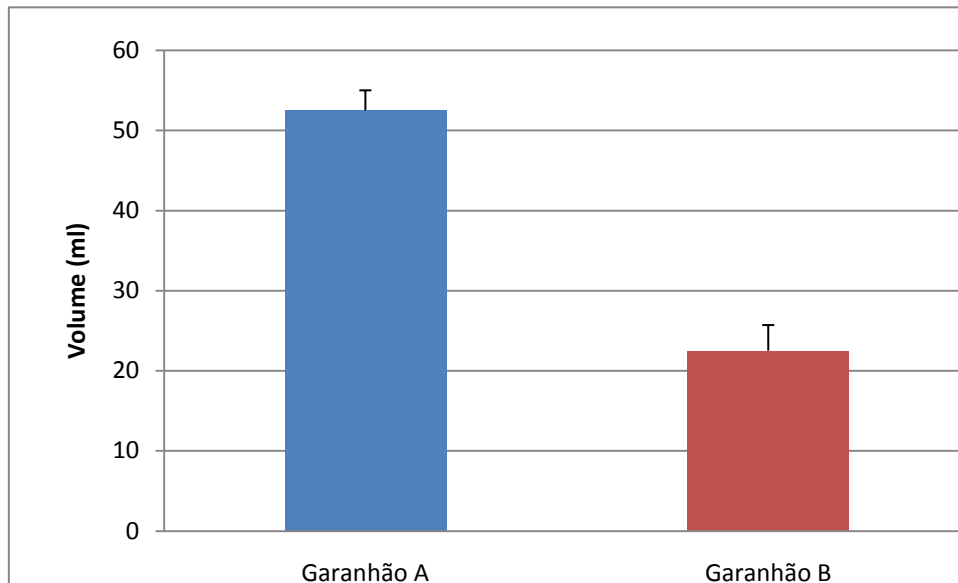


Figura 4.1: Avaliação do volume do sémen fresco do garanhão A ■ e B ■ após recolha recorrendo a vagina artificial. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão de um total de quatro ejaculados por garanhão.

#### 4.2. Avaliação Microscópica do Sémen Fresco

Na avaliação microscópica também são evidentes diferenças no diz respeito à motilidade total dos espermatozóides, em que o garanhão A apresentou valores de 52,5  $\pm$  4,8% e o garanhão B de 40  $\pm$  4,1%. Quanto à motilidade progressiva o garanhão A apresentou valores de 40  $\pm$  7,1% e o garanhão B de 27,5  $\pm$  2,5%.

No que concerne ao HosT, que avalia a funcionalidade e a integridade da membrana que reveste a parte principal da cauda dos espermatozóides indicando os que estão bioquimicamente funcionais, o garanhão A apresentou valores percentuais de 61  $\pm$  5,2 Spz e o garanhão B de 47,5  $\pm$  11,3 Spz (Figura 4.2).

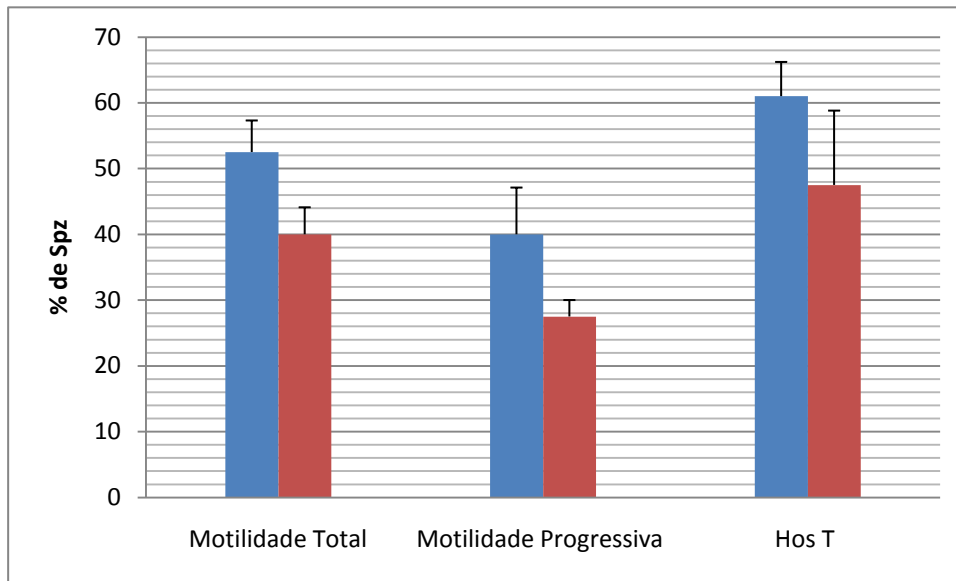


Figura 4.2. Avaliação da motilidade total, motilidade progressiva e Hos T do sémen fresco do garanhão A ■ e B ■. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão de um total de quatro ejaculados por garanhão.

No que diz respeito à concentração espermática, o garanhão A apresentou valores de  $199 \times 10^6 \pm 33,6 \times 10^6$  Spz/ml e o garanhão B  $168 \times 10^6 \pm 53 \times 10^6$  Spz/ml. (Figura 4.3).

### 4.3. Avaliação Microscópica do Sémen Congelado

Após congelação/descongelação, verificaram-se valores médios, no que concerne à motilidade total dos espermatozóides de  $51,7 \pm 1,7\%$  de Spz para o garanhão A e de  $10,7 \pm 0,7\%$  de Spz para o garanhão B.

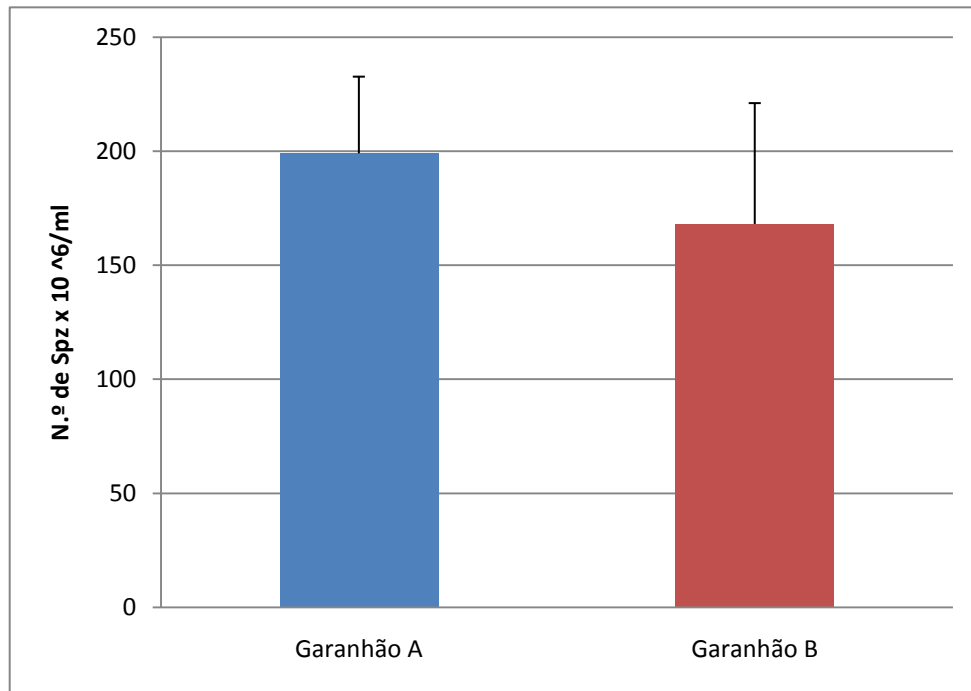


Figura 4.3. Avaliação das características espermáticas microscópicas (concentração espermática) do sémen fresco do garanhão A ■ e B ■. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão de um total de quatro ejaculados por garanhão.

Na motilidade progressiva, o garanhão A registou valores de  $43,3 \pm 1,7\%$  de Spz e o garanhão B de  $7 \pm 0,6\%$  de Spz.

As diferenças na congelação/descongelação da motilidade do sémen dos garanhões podem ser atribuídas a diferentes resistências de congelação de cada garanhão (Combes *et al.*, 2000; Snoeck, 2003). Estes resultados vão de encontro aos estudos realizados por Jasko (1994) e Samper (2000) onde se verificou que a qualidade do sémen de equino é afectada pela criopreservação.

Em relação ao HosT, após congelação/descongelação, o garanhão A apresentou valores médios de  $48,7 \pm 2,9\%$  e o garanhão B de  $18,7 \pm 2,7\%$  (Figura 4.4). Apesar da relativa simplicidade do HosT, há diferentes protocolos, bem como diversas formas de interpretações dos dados. Este facto dificulta a comparação dos testes entre autores,

tornando as conclusões questionáveis, podendo desta forma explicar a grande variação nas respostas de motilidade *versus* concentração espermática. No entanto, Melo *et al.* (2005), afirma que a habilidade do HosT em avaliar a integridade da membrana torna-o um teste complementar importante na avaliação *in vitro* do sémen criopreservado, uma vez que tanto a congelação quanto a refrigeração pode levar a efeitos deletérios sobre a membrana.

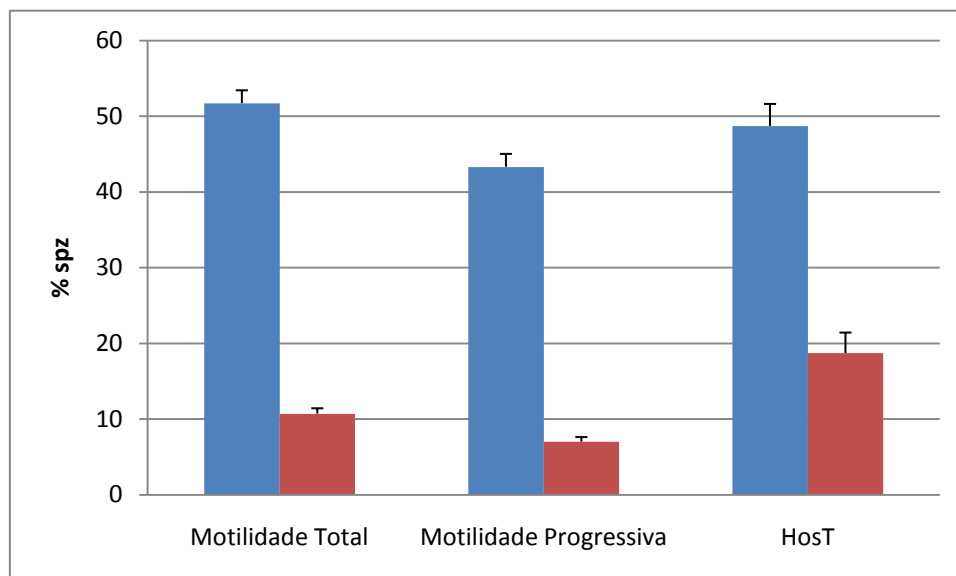


Figura 4.4: Avaliação das características espermáticas microscópicas após a descongelação do sémen do garanhão A ■ e B ■. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão de um total de 3 palhinhas de sémen de 0,5ml de cada garanhão.

#### 4.4. Fecundação *In Vitro* Heteróloga

No que concerne à FIV heteróloga o garanhão A registou taxas de fertilização com sémen fresco de  $51,9 \pm 2,25\%$  e com sémen congelado de  $34,41 \pm 2,7\%$ , apresentando assim diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) no que diz respeito à capacidade fecundante do sémen fresco e congelado. O garanhão B, com sémen fresco registou valores de fertilização de  $48,1 \pm 6,95\%$  e com sémen congelado de  $13,7 \pm 1,6\%$ ,

demonstrando assim diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) na capacidade fecundante do sêmen fresco e congelado.

Comparando a percentagem de ovócitos fertilizados com sêmen fresco dos dois garanhões não se registaram diferenças significativas, entre os dois garanhões, tendo contudo sido observadas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os dois garanhões (Figura 4.5) para o sêmen congelado/descongelado.

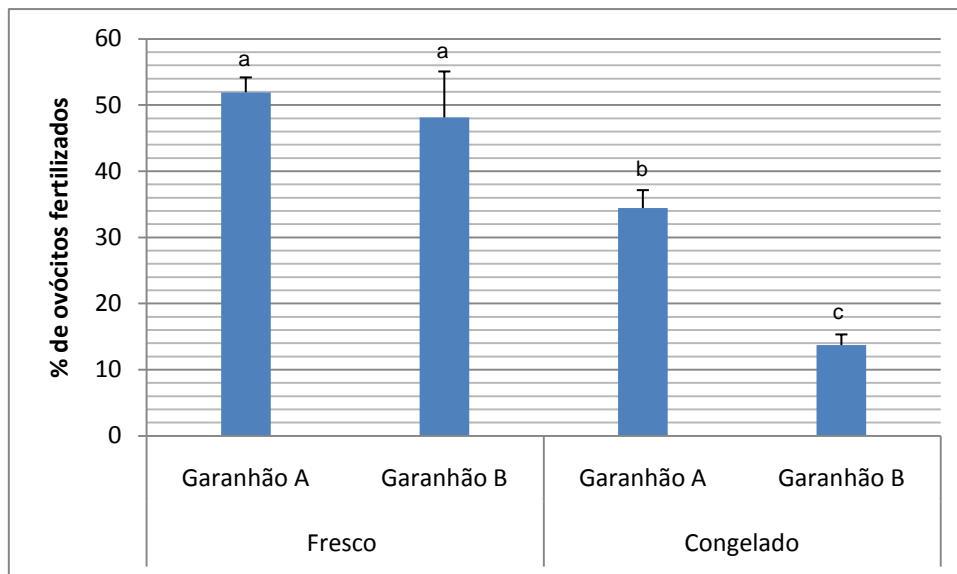


Figura 4.5. Avaliação da capacidade fecundante do sêmen fresco e congelado do garanhão A e B através da técnica FIV heteróloga. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão de um total de 373 ovócitos em 4 manipulações com sêmen fresco e 3 manipulações com sêmen congelado de cada garanhão. Tratamentos com letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.5. Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada de forma a avaliar a integridade do acrossoma e da membrana plasmática (Figura 4.6).

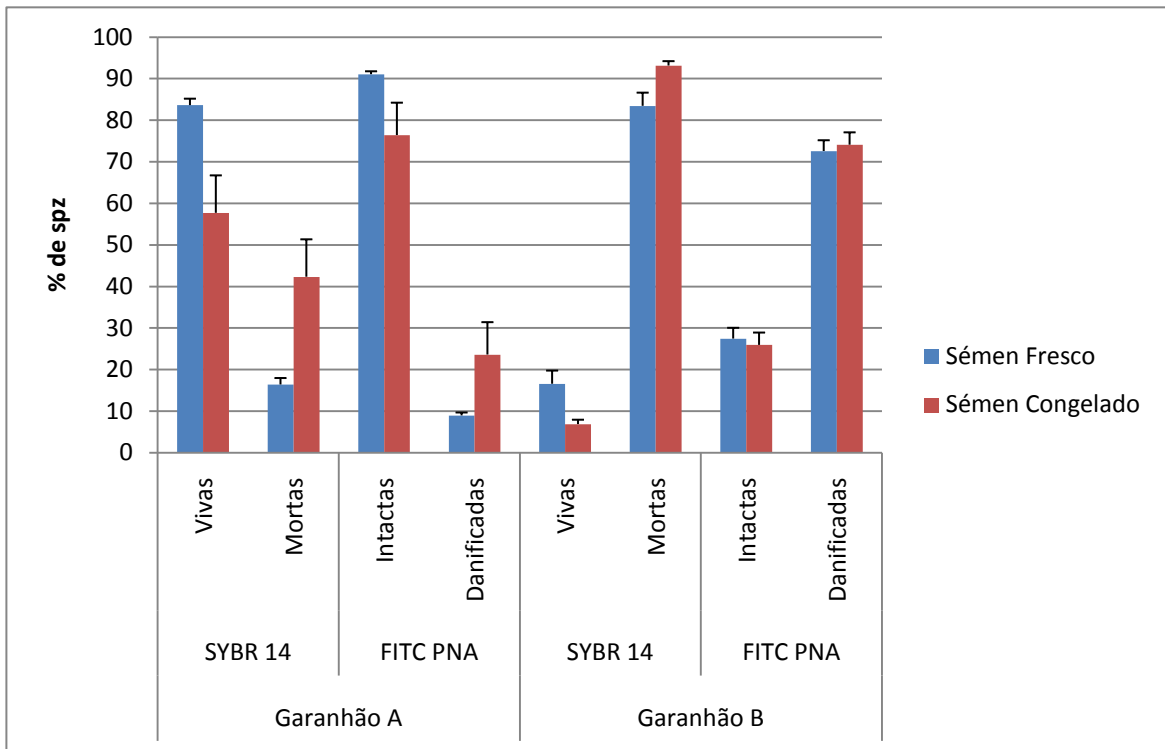


Figura 4.6. Avaliação da integridade acrossômica e da membrana plasmática do sémen fresco e congelado do garanhão A e B utilizando a técnica de citometria de fluxo. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão de um total de quatro ejaculados com sémen fresco e três palhinhas de sémen congelado de 0,5ml por garanhão.

Desta forma, observou-se que o garanhão A apresentou valores médios de espermatozoides vivos de  $83.6 \pm 1.55\%$  contra  $16,4 \pm 1,55\%$  mortos. Este teste foi efectuado utilizando o fluorocromo SYBR-14 em conjugação com o fluorocromo PI. No que diz respeito ao sémen congelado do garanhão A, registou-se um decréscimo na percentagem de espermatozoides vivos/mortos, tendo-se verificado  $57,69 \pm 9,01\%$  de espermatozoides vivos e  $42,31 \pm 9,01\%$  de espermatozoides mortos, apresentando diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre o sémen fresco e congelado deste garanhão.

A avaliação do sémen fresco do garanhão B apresentou valores de  $16,6 \pm 3,17\%$  de espermatozoides vivos contra  $83,4 \pm 3,17\%$  de espermatozoides mortos. No sémen congelado, apresentou valores de  $6,9 \pm 1,05\%$  de espermatozoides vivos contra  $93,1 \pm$

1,05% de espermatozoides mortos, não existindo diferenças significativas entre os valores encontrados para o sémen fresco e congelado.

No que diz respeito à integridade da membrana acrossómica, foram conjugados dois fluorocromos FITC – PNA e o PI. Em relação às amostras de sémen fresco do garanhão A registou-se  $91,04 \pm 0,7\%$  de Spz com a membrana acrossómica intacta e de  $8,96 \pm 0,7\%$  de Spz com a membrana acrossómica danificada. Nas amostras de sémen congelado do mesmo garanhão os valores foram de  $76,4 \pm 7,79\%$  de Spz com membrana acrossómica intacta e  $23,6 \pm 7,79\%$  de Spz com membrana acrossómica danificada, verificando-se diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ). O garanhão B apresentou  $27,44 \pm 2,59\%$  de Spz que possuíam a membrana acrossómica intacta e  $72,56 \pm 2,59\%$  de Spz com a membrana acrossómica danificada. No que diz respeito ao sémen congelado/descongelado, observou-se que  $25,92 \pm 2,97\%$  dos Spz apresentavam membrana acrossómica intacta e  $74,08 \pm 2,97\%$  dos Spz apresentaram membrana acrossómica danificada. Neste garanhão não se registou diferenças significativas no que concerne à integridade da membrana plasmática e acrossómica, comparando o sémen fresco e congelado. Este resultado pode ser justificado pelo efeito individual, pois apesar de ter baixa percentagem de espermatozoides vivos, estes demonstraram possuir resistência ao processo de congelação/descongelação.

Apesar do desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais ainda não é possível fazer o prognóstico da fertilidade do macho com exactidão. Uma possível razão é o facto dos testes efectuados ao sémen testarem parâmetros individuais dos espermatozoides. De forma a ultrapassar esta dificuldade, recorreu-se a uma técnica que testa uma multiplicidade de características, a FIV, sendo considerada por vários autores uma técnica útil para aferir a fertilidade (Braundmeier *et al.*, 2002; Censyra, 1994;

Brahmkshtri *et al.*, 1999; Bryne *et al.*, 2000; Popwell e Flowers, 2004; Ruíz-Sánchez *et al.*, 2006).

Neste estudo os exames efectuados ao sémen do garanhão A *versus* garanhão B, tanto ao nível de microscopia como de citometria de fluxo, registou-se melhores qualidades seminais no garanhão A e verificou-se o mesmo quando se procedeu à fertilização *in vitro* heteróloga.

Os resultados de citometria de fluxo do garanhão B revelaram que não existiram diferenças significativas no que diz respeito à viabilidade do sémen fresco para congelado. No entanto, para este garanhão os resultados da FIV heteróloga demonstraram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) no que concerne à capacidade fecundante do sémen fresco e congelado. A técnica de citometria de fluxo permite obter valores no que diz respeito à viabilidade espermática. A FIV heteróloga possibilita contacto directo entre o gâmeta masculino com o gâmeta feminino de espécies diferentes, permitindo avaliar a capacidade fecundante dos Spz. Neste caso, concluiu-se que o sémen do garanhão B é de baixa viabilidade espermática, o que poderá dificultar a fecundação *in vivo*, pois não possui capacidade de percorrer o aparelho reprodutor da fêmea até fecundar o ovócito.

Registaram-se diferenças significativas no que concerne à fertilização *in vitro* heteróloga com sémen fresco e utilizando sémen após descongelação ( $P \leq 0,05$ ), verificando-se uma variação significativa entre os dois reprodutores, tanto na integridade quanto na funcionalidade da membrana plasmática do sémen congelado, indicando assim uma diversidade de comportamentos entre os parâmetros espermáticos destes animais. Segundo a literatura, o processo de congelação/descongelação do sémen provoca alterações estruturais, bioquímicas e funcionais (Watson, 1995; Holt, 2000; Salomon e Maxwell, 2000; Medeiros *et al.*, 2002), resultando numa redução da

vitalidade e viabilidade. A composição da membrana plasmática é um dos factores que contribuem para a baixa resistência dos espermatozoides da espécie equina às baixas temperaturas impostas pela congelação. Nesta espécie, os espermatozoides são mais sensíveis ao choque térmico durante a redução da temperatura porque possuem menos colesterol na sua membrana plasmática (Amman & Pickett, 1987). Segundo Brinsko *et al.* (2000), o processo de centrifugação pode ainda ocasionar danos nas células espermáticas. A lesão celular é um factor de extrema importância, pois influencia directamente a viabilidade espermática, podendo comprometer as características espermáticas responsáveis pelos processos de capacitação e de fecundação. Mudanças que ocorram da membrana plasmática e acrossómica podem levar a alterações na permeabilidade, na funcionalidade e no metabolismo da célula espermática, podendo prejudicar a motilidade e a capacidade fecundante da mesma (Aman & Graham, 1993).

## **V-Conclusão e Perspectivas Futuras**

Tudo indica que este estudo foi o primeiro em Portugal a descrever a fertilização heteróloga como teste de fertilidade de sémen de equino fresco e criopreservado.

Após realizada a análise dos resultados deste estudo, foi possível concluir que os ovócitos de bovino desprovidos de zona pelúcida são úteis para avaliação citoplasmática e da capacidade de fertilização de sémen de equino, mostrando diferenças significativas entre os garanhões e entre sémen fresco e congelado. Verificou-se também, que a FIV heteróloga pode ser uma alternativa para identificar as diferenças entre machos, sendo uma potencial ferramenta para prever o potencial de fertilidade do sémen.

Concluiu-se também, que os testes de avaliação da integridade e funcionalidade da membrana plasmática do espermatozóide constituem avaliações complementares do possível potencial de fecundação do garanhão, não sendo por si só conclusivos.

A selecção dos parâmetros mais adequados para a previsão da fertilidade de um macho tem sido pesquisada de forma intensiva. O HosT e a motilidade espermática foram reconhecidos como métodos úteis, embora muitos autores não reconheçam a sua utilidade. O citómetro de fluxo é um instrumento de extrema importância no que diz respeito à avaliação da integridade da membrana e do acrossoma, permitindo ter resultados muito fiáveis das características seminais das amostras.

Dado o interesse do presente trabalho, penso que será de propor a continuação do mesmo de forma aperfeiçoar a técnica de FIV heteróloga e de complementar os resultados obtidos nas avaliações seminais com os resultados da FIV heteróloga, criando assim um método fiável de caracterização da capacidade fecundante de amostras de sémen.

## VI – Referências Bibliográficas

- ❖ Allrich, R.D. (1993). Endocrinology and neural control of oestrus expression in dairy cattle. *Journal of dairy Science*. Capítulo 76 (Suppl.), p.310.
- ❖ Amann, R. P., Graham, J. K. (1993) Spermatozoal function. In: Mckinnon, A. O., Voss, J. L. *Equine Reproduction, Lea&Febiger, Philadelphia*. p.715-745.
- ❖ Amman, R.P., Pickett, B.W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equi. Vet. Sci, Nova York*. v. 7, p. 145-174.
- ❖ Antunes, G.; Marques, A.; Santos, P.; Chaveiro, A.; Moreira da Silva, F. (2008). Atlas do Ovócito e do Embrião Bovino: breves noções de morfologia e endocrinologia. *Principia Editora Lda*. 1ª Edição, p. 51-86.
- ❖ Armstrong, T.D., Gore-Langton, E.R. (1994). Follicular steroidogenesis and its control: the physiology of reproduction, 2 nd edition, eds. Knobil, E. and Weill, J.D., Reven Press.
- ❖ Arnold, K.; Pratsch, L.; Gawrish, K. (1983). Effect of poly (ethylene Glicol) in phospholipids hydration and polarity of the external phase. *Bioch Biophys Acta*, v.782, p.121-128.
- ❖ Bacal, N. S.; Faulhaber, M. H. W. (2003). Introdução à Citometria de Fluxo. Aplicação Prática em Citometria de Fluxo. *Editora Atheneu*. Capítulo1, p. 1-4.
- ❖ Baudi, D. L.; Jewgenow, K.; Pukazhenth, B. S.; Spencoski, K. M.; Santos, A. S.; Reghelin, A. L.; Cândido, M. V.; Javorouski, M. L.; Muller, G.; Morais, R. N. (2008). Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot

(*Leopardus pardalis*) and *tigrina* (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*. v.69, p. 204-2011.

❖ Beckers, J.F., Drion, P.V., Figueiredo, J.R., Goffin, L., Pirottin, D.E., Ectors, F.J. (1996). The ovarian follicles in cow: In vivo growth and in vitro culture. *Reprod. Dom. Anim*; capítulo 31, p. 543-548.

❖ Bedford, J. M. (1970). Sperm Capacitation and Fertilization in Mammals. *Biol. Reprod.* (Suppl.). v.23, p. 128-158.

❖ Bedford JM, Hoskins DD (1990): The mammalian spermatozoon: Morphology, biochemistry and physiology. In Lamming GE (ed): *Marshall's Physiology of Reproductio*. Edinburgh: ChurchillLivingstone. v. 2, p. 379–568.

❖ Bertho, A. L., Santiago, M. A., Coutinho, S. G. (2000) Flow cytometry in the study of cell death. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* . v.95, p. 429-433.

❖ Bielanski, W., Kaczmarek, F. (1979) Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*v.27, p.39-45.

❖ Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*. v. 43, p. 31-49.

❖ Bousquet, D; Brackett, B. G. (1981). Penetration of zona-free hamster ova by bull sperm after frozen storage. *Theriogenology*. v. 15, p. 117.

❖ Bousquet, D.; Brackett, B.G. (1982). Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. *Theriogenology*. v. 17, p. 199–213.

❖ Bousquet, D.; Brackett, B.G; Dressel, M. A.; Allen, C. H. (1983). Efforts to correlate laboratory with field observations on bull sperm fertility. *Theriogenology*. v. 20,p. 601–613.

- ❖ Brackett, R. G.; Bousquet, D.; Boice, M. L.; Donawick, W. J.; Evans, J. F.; Dressel, M. A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*. v.27, p. 147-158.
- ❖ Brackett, B. G.; Cofone, M. A.; Boice, M. L.; Bousquet, D. (1982). Use of zona-free hamster ova to assess fertilizing ability of bull and stallion. *Gamete Res.* v.5, p. 217-227.
- ❖ Brahmkshtri, B. P; Edwin, M. J.; John, M. C.; Nainar, A. M.; Krishnan, A. R. (1999). Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* v. 54 , p. 159–168.
- ❖ Brinsko S, Varner DD, Blanchard TL (2000), “Transported Equine Semen”, Recent Advances in Equine Reproduction, B. A. Ball Ed.
- ❖ Campos-Chillón, L. F.; Barcelo-Fimbres, M.; Carnevale, E. M.; Seidel, G. E. J. (2007). Use of bovine oocytes to evaluate in Vitro fertilizing capacity of equine sperm. *Theriogenology*. v.68, p. 515-516.
- ❖ Canovas, S.; Coy, P.; Gomez, E. (2007). First steps in the development of a functional assay for human sperm using pig oocytes. *J. Androl.* v.28, p. 273-281.
- ❖ Casey, P. J.; Hillman, R. B.; Robertson, K. R.; Yudin, A. I; Liu, I. K. M.; Drobnis, E. Z. (1993). Validation of an acrossomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J. Androl.* v. 14, p. 289-297.
- ❖ Chang, M. C. (1959). Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature (Lond.)*. v.184, p. 466-467.
- ❖ Curtis, S. K. and Amann, R. P. (1981).
- ❖ Chaveiro, A. E. N. (1999). Viability assessment of bovine sperm frozen with a new protocol: flow cytometric study. Angra do Heroísmo.

- ❖ Choi, Y. H.; Landim-Alvarenga, F. C.; Seidel Jr.; Squires, E. L. (2003). Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. *J. Anim. Sci.* v.81, p. 2080-2087.
- ❖ Combes, G. B.; Varner, D. D.; Schroeder, F. (2000). Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fertil. Cambridge.* v. 56, p. 127-132.
- ❖ Comizzoli, P.; Mauget, R.; Mermillod, P. (2001). Assesment of in vitro fertility of deer spermatozoa by heterologous with zona – free bovine oocytes. *Theriogenology.* v. 56, p. 261-274.
- ❖ Correa, J.R.; Zavos, P.M. (1994). The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology.* v. 42, p. 531-360.
- ❖ Correa, J.R.; Pace, M.M.; Zavos, P.M. (1997). Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional test and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Therigenology.* v.48, p. 721-731.
- ❖ Cross, N. L.; Morales; P., Overstreet, J. W., Hanson, F. W. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* v.15, p. 213-226.
- ❖ Cross, N. L., Meizel, S. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.* v.41, p. 635-641.1
- ❖ Cross, N. L. & Watson, S. K. (1994). Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. *Theriogenology.* v. 42, p. 89–98.
- ❖ Crozet, N. (1991). La fecundation in vivo et in vitro, in “ La Reproduction chez les mammiferes et l’homme”. v. 17, p. 315-337.

- ❖ De Figueiredo, J. R.; De Freitas, V. J. F.; Gonçalves, P. B. D. (2002) Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. *Produção in vitro de embriões*. v. 10, p. 195-210.
- ❖ Drevius, L.O., Eriksson, H. (1996). Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell Res.* V. 42, p. 136-156.
- ❖ Driancourt, M.A., Gougeon, A., Royère, D., Thibault, C. (1991). La reproduction chez les mamifères et l’homme. *INRA*.
- ❖ Driancourt, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, Capítulo 55 (6), p. 1211-1239.
- ❖ Ericsson, S. A.; Garner, D. L.; Redelman, D; Ahmed, M. R. (1989) Assessment of the Viability and Fertilizing Potential of Cryopreserved Bovine Spermatozoa Using Dual Fluorescent Staining and Two Flow Cytometric Systems. *Gamete Res.*; v.22, p. 355-368.
- ❖ Erickson, B.H. (1996). Development and senescence of the post natal bovine ovary. *J. Anin. Sci.*, Capítulo 25, p. 800-805.
- ❖ Evans, G.; Maxwell, W. M. C. (1990). Insemination artificial de ovejas y cabras. *Editorial Acribia, S.A.* p. 35-56.
- ❖ Evans , L.W., Muttukrishna, S., Knight, P.G., Groome, N.P. (1997). Development, validation and application of a two-site enzyme-linked immunosorbent assay for activina-AB. *Journal of Endocrinology*. Capítulo 153, p. 221-230.
- ❖ Fahy, G. M. (1986). The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology*, v.23, p.1-13.
- ❖ Farlin, M. E., Jasko, D. J., Graham, J. K., Squires, E. L. (1992) Assessment of Pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*v.32, p. 23-27.

- ❖ Foote, R.H.; Ellington, J.E. 1988 Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology*. v 29, p. 111–123.
- ❖ Fortune, J.E., Rivera, G.M., Evans, A.C.O., Turzillo, A.M. (2001). Differentiation of dominant versus subordinate follicle in cattle. *Biology of Reproduction*. v.65, p. 648-654.
- ❖ Fowler, R. E.; Fox, N. L.; Edwards, R. G.; Steptoe, P. C. 1978. Steroid production from 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone and dehydroepiandrosterone by human granulosa cells in vitro. *J. Reprod. Fert.* v. 54, p. 109-117.
- ❖ Fürst, R. (2006) Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino. Viçosa.
- ❖ Frenette, G.; Légaré, C.; Saez, F.; Sullivan, R. (2005). Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and. *Oxford Journals*. v.11, p. 575-582.
- ❖ Gadea, J., Matás, C., Lucas, X., (1998). Prediction of porcine semen fertility by homologous in Vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* v. 56, p. 95-108.
- ❖ Garner, D. L.; Pinkel, D.; Johnson, L. A.; Pace, M. M. (1986) Assessment of Spermatozoa Function Using Dual Fluorescent Staining and Flow Cytometric Analyses. *Biol. Reprod.* v. 34, p. 127-135.
- ❖ Gordon, I. (1994). Laboratory production of cattle embryos. *Cab International*. Cambridge: University Press.
- ❖ Guerin, P.; Guyader-Joly, C., Mermillod, P. & LeGuiene, B. (1996). La production in vitro et la cryoconservation de l'embryon chez les bovines. *Le Point Vétérinaire, Reproduction des Ruminants*. v.28, p.13-28.
- ❖ Graham JK, Mocé E.(2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, p.492-504.

- ❖ Graham, J. K.; Kunze, E.; Hammerstedt, R. (1990). Analysis of Sperm Cell viability, Acrossomal Integrity and Mitochondrial Function Using Flow Cytometry. *Biol. Reprod.* v. 43, p. 55-63.
- ❖ Hafez, E.S.E. (1987). Reproduction et insemination artificial en animals. *Interamericana – McGraw.*
- ❖ Hafez, B. and Hafez, E. S. E., (2000). Reproduction in Farm Animals. 7th edition. *Lippincott Williams and Wilkens, New York*, pp. 509.
- ❖ Hageman, L.J. (1999). Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology.* v. 8; p. 449-459.
- ❖ Hammerstedt, R. H.; Graham, J. K., Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* v.11, p. 73-88.
- ❖ Hansel, A; Enya, Y. E Suzuki, T. (1973). Corporea lutea of the large domestic animal. *Biology of Reproduction.* v. 8, p. 222-245.
- ❖ Hay, M.A., King, W.A., Gartley, C.J., Leibo, S.P., Goodrowe, K.L. (1997b). Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertil.* v.51, p. 99-108.
- ❖ Harrison, R.A.P., Vickers, S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of the Reproduction and Fertility.* v. 88; p: 343-352.
- ❖ Henderson, E.R., C.T. Robertes, J., Hurtwitz, A., LeReoith, D.E., Adashi, E.Y. (1990). Rat ovarian insulin-like growth factor–II gene expression is theca–interstitial cell-exclusive: Hormonal regulation and receptor distribution. *Endocrinology.* Capítulo 17, p. 3249-3251.
- ❖ Hendriksen, P.J.M., Vos, P.L.A.M., Steenweg, W.N.M., Bevers, M.M., Dieleman, S.J. (2000). Bovine follicular development and its effects on the in vitro

competence of oocytes. Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, capítulo 53, p. 549-561.

- ❖ Hoffmann, B.; Landeck, A. (1999). Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Anim. Reprod Sci.* v.57, p. 89-98.
- ❖ Hulshof, S.C.J., Bevers, M.M., Van der Donk, H.A., Van der Hurk, R. (1992). The isolation and characterizations of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Proceedings of the twelfth international congress on animal reproduction*, The Hague. Capítulo I, p. 336-338.
- ❖ Ireland, J. J. ; Roche, J. F. (1987). Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. *Martinus Nijhoff Publishers*. ISBN 0-89838-855-4. p. 1-18.
- ❖ Janett F.; Thun R, Niederer K.; Burger D.; Hassig M. (2003). Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology*. v. 60, p. 453-461.
- ❖ Jasko, D. J. (1994). Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Vet.* v. 10, p. 156-165.
- ❖ Jeyendran, R.S., Van Der Ven, H.H., Perez- Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* v. 70, p. 219-228.
- ❖ Johnson, L. (1985). Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. *Biol Reprod.* v. 32, p. 1181-1190.

- ❖ Johnson, L.; Blanchard, T. L.; Varner, D. D.; Scrutchfield, W. L. (1997). Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*. V.48, p.1199-1216.
- ❖ Jondet, M.; Dominuque, S.; Scholler, R. (1984) Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte. *Cryobiology*. v.21, p.192-199.
- ❖ Juhász, J.; Nagy, P.; Kulcsár, M.; Huszenicza, GY. (2000). Methods for Semen and Endocrinological Evaluation of the Stallion: A Review. *Acta Vet. Brno*. v.69, p. 247-259.
- ❖ Kamenstry, L.A. (1995).Sex Preselection by Flow Cytometry of X and Y chromosome-bearing Sperm based on DNA Difference: a Review. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 7, p. 893\_903.
- ❖ Kenney, R.M., Bergman, R.V. & Cooper, W.L. (1975). Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In *Proceedings of the 22nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Lexington, KY, USA, 327*.
- ❖ Kenney, R. M.; Hurtgen, J. P.; Pierson, R. (1983). Society for theriogenology manual for clinical fertility evaluation of stallion. *Hasting: Sosciety for Theriogenology*, p.100.
- ❖ Ko, J.C.H., Hastelic, J.P., Del Campo, M.R. & Ginther, O.J. (1991). Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.91, p. 511-519.
- ❖ Kumi-Diaka, J. (1993). Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*. v.39, p. 1279-1289.
- ❖ Lagares, M. A.; Petzoldt, R.; Sieme, H.; Klug, E. (2002). Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia*. v.32, n.º3, p. 163-167.

- ❖ Landim-Alvarenga, F. C.; Alvarenga M. A.; Seidel, G. E.; Squires, E. L.; Graham, J. K. (2001). Penetration of zona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187. *Theriogenology*. v.56, p. 937–953.
- ❖ Larsson, B.; Rodríguez-Martínez, H. (2000). Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. *Animal Reproduction Science*. v.60-61, p. 327-336.
- ❖ Liu, D. Y.; Baker, H. W. (1992). Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding and fertilization rates in vitro. *Fertil. Steril.* v.58, p. 1178-1184.
- ❖ Magistrini, M.; Chanteloube, P.; Palmer E. (1987). Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J Reprod Fertil Suppl.* v. 35, p.127-133.
- ❖ Mann T, Minotakis CS, Polge C (1963). Semen Composition and Metabolism the Stallion and Jackass. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 5,p. 109-122.
- ❖ Marques, C.M. (1998). Contribuição ao estudo da maturação de oócitos e cultura de embriões in vitro.
- ❖ Matás, C., Martínez, E., Vásquez, J. M., Roca, J., Gadea, J.(1996). In vitro penetration assay of boar sperm fertility: effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology*. v.46, p.503-513.
- ❖ Matton, P.; Adalakoun, V.; Couture; Dufour, J. J. (1981). Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle.*J. Anim. Sci.* v. 52, p. 813-820.

- ❖ Mazur, P. (1970) Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, v.199, p.939-949.
- ❖ McGann, L. E.(1978) Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotecture agents. *Cryobiology*, v.15, p.382-390.
- ❖ McHugh, J. A.; Rutledge, J. J. (1998). Heterologous fertilization to characterize spermatozoa of the genus Bos. *Theriogenology*. v.50, p. 185-193.
- ❖ McNatty, K.T., Heath, D.A., Henderson, K.M., Lun, S., Hurst, P.R., Ellis, L.M., Montgomery, G.W., Morrison, L.E., Thurley, D.C. (1984). Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *Journal of reproduction and fertility*, capítulo 72, p. 39-53.
- ❖ Melo, M.I.V.; Henry, M. (1999). Teste hiposmótico na avaliação do semén equino. *Arquivo Brasileiro Medicina Vetrinária Zoocênica*. V. 51, p. 77-78.
- ❖ Meryman, H. R.; Willians, R. J.; Douglas, M. S. J. (1977) Freezing injury from solution effects and its prevetion by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*, v.14, p.287-302.
- ❖ Meyers, S. A. (1996). New methods of diagnosing subfertility in stallions. *J. Equine Vet. Sci.* v.16, p.103-105.
- ❖ Mocé, E; Graham, J. K. e Schenk, J. L. (2006). Effect of Sex-Sorting on the Ability of Fresh and Cryopreserved Bull Sperm to Undergo an Acrossome Reaction. *Sci. Dir., Theriog.* v.66, p. 929-936.
- ❖ Moreira da Silva, J.F. e Burvenich, C. (1994). Studies on Immunity and Reproduction: Oxidative Burst Capacity of Bovine Polymmorphonuclear Leukocytes Around Parturition. Univ. Gent, Facul. Vet. Med., Dept. Vet. Physiol., Biochem. And Biometrics. Merelbeke.

- ❖ Morel MD (1999). Semen evaluation. Equine Artificial Insemination VI, *Cabi Publishing*, p.190-233.
- ❖ Murphy, M. G.; Enright, W. J.; Crowe, M. A.; McConnell, K.; Spicer, L. J.; Boland, M. P.; Roche, J. F. (1991). Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J. Reprod. Fert.* v.92, p.333-338.
- ❖ Orfao, A.Y. ; Gonzalez de Buitrago, J. M. (1995). La Citometría en Laboratorio Clínico. Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular.
- ❖ Ortavant, R., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J.E., Vollant-Nail, P. (1985). Photoperiod : main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals. *Oxford reviews of Reproductive Biology*. Capítulo 7, p. 305-345.
- ❖ Paz, R. C. R.; Züge, R. M.; Barnabe, V. H.; Morato, R. G.; Felipe, P. A. N.; Barnabe, R. C. (2000). Avaliação da capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada em ovócitos heterólogos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v. 37n.º6.
- ❖ Peters, A.R., Ball, P.J.H. (1995). *Reproduction of Cattle*, 2ª edição.
- ❖ Pickett, B. W. (1986). Principles of cryopreservation. In: Techiques for freezing mammalian embryos: short course proceedings. Fort Collins: *Animal Reproduction Laboratory*, Colorado State University, p.4.
- ❖ Pickett, B. W. (1993). Reproductive evaluation of the stallion. In: Mckinnon, A. O., Voss, J. L.: *Equine Reproduction*. *Lea &Febiger*, Philadelphia. p. 755-768.
- ❖ Potes, J.A.C. (1989). Ovulações controladas e superovulação em caprinos. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

- ❖ Rathí, R.; colenbrander, B.; Bevers, M.; Gadella, B. M. (2001). Evaluation of in vitro capacitation os stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*. v.65, p. 462-470.
- ❖ Robalo Silva, J. (2006). Recolha e avaliação de ejaculados de garanhão em condições de campo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*.v. 101, p. 305-309.
- ❖ Robalo Silva, J.; Agrícola, R.; Barbosa, M.; Lopes da Costa, L. (2007). Variação sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sémen e do comportamento sexual de cavalos lusitanos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*.v. 102, p. 119-125.
- ❖ Rodriguez- Martinez, H.; Larsson, B.; Zhang, B. R.; Soderquist, L. (1996). Assessment of bull sperm fertilizing ability. *Reprod. Dom. Anim*.v. 31, p. 515-517.
- ❖ Salisbury, G.W., Vandermark, N.L. (1961). Physiology of reproduction and artificial insemination in cattle. *Freeman, W.H. & Company*, University of Illions.
- ❖ Samper, J. C. (2000). Equine breeding management and artificial insemination. *Philadelphia W. B.Saunders*, p. 306.
- ❖ Savio, J. D.; Keenan, L.; Boland, M. P.; Roche, J. F. (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.* v. 83, p. 663-671.
- ❖ Seidel, G. E. (1986) Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: thecniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings. *Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University*. p. 6-12.

- ❖ Silva, C. C. (1998). Effect of inhibin, activin and follistatin on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Tese de doutoramento*. p.4-5.
- ❖ Silva, L. O. M.; Verstegen, J. P. (1995). Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen- thawed spermatozoa. *Theriogenology*. V. 44, p. 571-579. *Bioscience Reports*. v.8, n.º6.
- ❖ Shivaji, S. (1988). Seminal plasmin: a protein with many biological properties. *Bioscience Reports*. v.8, n.º6.
- ❖ Snoeck, P. P. N. (2003). Aspectos da criopreservação de sémen de equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. *Tese de doutoramento em Ciências Animais*. Belo Horizonte.
- ❖ Storey, K. B.; Storey, J. M. (1990) Frozen and alive. *Scientific American*, v.263, p.62-67.
- ❖ Swanson, W. F.; Wildt, D. E. (1997). Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. *Int. Zoo Yearbook*. v.35, p.152-159.
- ❖ Szász, F. (1999). Cryopreservation of dog semen in relation to the acrossoma integrity of spermatozoa. PhD. Thesis, University of Veterinary Science, Budapest.
- ❖ Taberner, E.; Morató, R., Mogas, T.; Miró, J. (2009). Ability of Catalanian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. *Animal Reproduction Science*. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.08.005.

- ❖ Tatemoto, H., Horiuchi, T., Maeda, T., Terada, T., Tsutsumi, Y. (1994). Penetration by bull spermatozoa into the zona pellucida of dead bovine oocytes recovered from frozen-thawed ovaries. *Theriogenology*. V. 42, p. 465-474.
- ❖ Tereda, Y.; Nakamura, S; Morita, J.; Tachibana, M.; Morito, Y.; Ito, K.; Murakami, T.; Yaegashi, N.; Okamura, K. (2004). Use of mammalian eggs for assessment of human sperm function: molecular and cellular analyses of fertilization by intacytoplasmic sperm injection. *Am. J. Reprod. Immunol.* V .51, p. 290-293.
- ❖ Toyoda, Y., Yokoyama, M.; Hosi, T. (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn. J. Animal Reprod.*v.16, p. 147-151.
- ❖ Valente, S. S.; Pereira, R. M.; Baptista, M. C.; Marques, C. C.; Vasques, M. I.; Silva Pereira, M. V. C.; Horta, A. E. M.; Barbas, J. P. (2010). In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Animal Reproduction Science*. v. 117, p. 74-77.
- ❖ Vazquez, J. M.; Martinez, E. A.; Martinez, P.; Garcia-Artiga, C.; Roca, J. (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*. V.47, p.913-922.
- ❖ Varner, D. D., Ward, C. R., Storey, B. T., Kenney, R. M. (1987) Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* v. 48, p. 1383-1389.
- ❖ Weeler, M. B., Seidel, G. E. Jr. (1987). Zona pellucida penetration assay for capacitation of bovine sperm. *Gamete Res.*v. 18, p. 237-250.
- ❖ Wit, A. A. C.; Wurth, Y. A.; Kruip, Th. A. M. (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J. Anim. Sci.* v.78, p.1277-1283.

- ❖ Whitten, W. K. (1956). The effect of removal of the olfactory bulbs on the gonads of mice. *J. Endocrinol.* v. 14, p.160 -163.
- ❖ Whittincham, D. C. (1968). Fertilization of mouse eggs *in vitro*. *Nature.* v. 220, 592-593.
- ❖ Yanagimachi, R.(1994). Mammalian fertilization. In Knobil, E., Neill, J. D.: *The Physiology of Reproduction. Raven Press.* p. 189-317.
- ❖ Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H.; Rogers, B. J. (1976). The use of zona-free animal ova as a test-system for the assesment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* v.15, p. 471-476.