

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**POTENCIAIS BIOMARCADORES DE FERTILIDADE E
PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE GARANHÕES TRATADOS COM
ANÁLOGO DE GnRH (LECIRELINA)**

Thaís Mendes Sanchez Cavaleiro

BOTUCATU- SÃO PAULO

Maio/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**POTENCIAIS BIOMARCADORES DE FERTILIDADE E
PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE GARANHÕES TRATADOS COM
ANÁLOGO DE GnRH (LECIRELINA)**

THAÍS MENDES SANCHEZ CAVALERO

Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

BOTUCATU- SÃO PAULO

Maio/2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cavalero, Thais Mendes Sanches.

Potenciais biomarcadores de fertilidade e produção
espermática de garanhões tratados com o análogo de GnRH
Lecirelina / Thais Mendes Sanches Cavalero. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504037

1. Equino - Reprodução. 2. Neuroendocrinologia. 3. Sêmen.
4. Infecundidade em animais. 5. Hormônio liberador de
gonadotropina.

Palavras-chave: Equinos; Função testicular; Sêmen;
Neuroendocrinologia; Subfertilidade.

Nome do autor (a): Thaís Mendes Sanchez Cavallero

Título: POTENCIAIS BIOMARCADORES DE FERTILIDADE E PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE GARANHÕES TRATADOS COM ANÁLOGO DE GnRH (LECIRELINA)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, Brasil

Dr^a. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, Brasil

Prof^a. Dr^a. Fernanda Saules Ignácio

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, Brasil

Prof. Dr. Lorenzo Garrido Teixeira Martini Segabinazzi

Membro

Department of Clinical Science - Ross University School of Veterinary Medicine

Dr^a. Priscila do Nascimento Guasti

Membro

Botupharma Indústria e Comércio de Produtos Veterinários

Data da Defesa: 31 de Maio de 2023.

DEDICATÓRIA

Ao meu avô, Moacir Cavaleiro (*in memoriam*), que esteve comigo em todos os momentos da minha vida. Não encontro palavras que expressem o meu sentimento por você ter partido. O senhor será lembrado para sempre em meu coração!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela força e por ter me dado uma família maravilhosa.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, apoio e dedicação que sempre demonstraram ao longo da nossa jornada. Vocês são o meu porto seguro.

A minha irmã Andréa, que sempre esteve, e sei que sempre estará, ao meu lado em todos os momentos.

As minhas avós, Belmira e Lúcia, e as minhas tias, Delza e Virgínia, que sempre se fizeram presentes de uma forma tão carinhosa e acolhedora. Vocês me ajudaram a me tornar a mulher que sou hoje.

Ao meu orientador, Prof. Frederico Ozanam Papa, por todos os ensinamentos, puxões de orelha, brincadeiras, reuniões, cirurgias e experimentos compartilhados ao longo desses nove anos de convívio. Agradeço por todo o suporte durante a pandemia, se fazendo presente mesmo na adversidade do momento.

A Camila Dell'Aqua, pela convivência, pelos conselhos, pelas risadas, pelo apoio e pela compreensão durante todo o período experimental.

As residentes da Reprodução Animal (2020/2021), em especial a Larissa e Maiara, pela ajuda e pelo companheirismo. Vocês tornaram os meus dias mais fáceis e alegres.

A grande companheira, Stella Tironi, que embarcou nesse extenso projeto comigo e me ajudou em todas as etapas. Você é demais!

Aos funcionários, Felipe, Edvaldo e Edilson, por todo o companheirismo, ajuda e cuidado com os animais do Departamento.

As amigos que conheci em Davis e que guardarei por toda a minha vida: Dr. Conley, Jo Conley, Rebecca, Kassie, Tess, Thadeu, Bethania, Margo e Machteld.

A agência de fomento, processo nº 2019/01119-8 e 2022/03405-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Bolsa de Pesquisa no País e Bolsa de Pesquisa no Exterior (BEPE).

Lista de Tabelas

Capítulo 02

Tabela 1.	Média e desvio padrão da motilidade espermática total de garanhões dos grupos fértil, controle e subfértil	60
Tabela 2.	Média e desvio padrão da motilidade espermática progressiva de garanhões dos grupos fértil, controle e subfértil	60
Tabela 3.	Média e desvio padrão do número de espermatozoides rápidos de garanhões dos grupos fértil, controle e subfértil	60
Tabela 4.	Média e desvio padrão da estabilidade de membrana plasmática e acrossomal do ejaculado de garanhões dos grupos fértil e controle.....	61
Tabela 5.	Média e desvio padrão da potencial de membrana mitocondrial do ejaculado de garanhões dos grupos fértil e controle	61
Tabela 6.	Média e desvio padrão da geração de peróxido de hidrogênio do ejaculado de garanhões dos grupos fértil e controle	61
Tabela 7.	Média e desvio padrão da motilidade espermática total (%) de garanhões dos grupos fértil e controle	62
Tabela 8.	Média e desvio padrão da motilidade espermática progressiva (%) de garanhões dos grupos fértil e controle.....	62
Tabela 9.	Média e desvio padrão do número de espermatozoides rápidos (%) de garanhões dos grupos fértil e controle	62
Tabela 10.	Média e desvio padrão dos níveis séricos de FSH, LH, testosterona, sulfato de estrona, inibina-B e AMH de garanhões subfêrteis tratados com lecirelina durante 8 semanas e avaliados por mais 8 semanas	63
Tabela 11.	Média e desvio padrão dos parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva, número de espermatozoides rápidos, integridade de membrana plasmática e acrossomal, defeitos espermáticos totais e número de espermatozoides totais de garanhões subfêrteis tratados com lecirelina durante 8 semanas e avaliados por mais 8 semanais.....	63

Lista de Figuras

Capítulo 01

- Figura 01. Túbulo seminífero visto por microscopia de campo claro. As células mióides (MC) marcam os limites externos do túbulo seminífero e as células de Sertoli contendo núcleos de forma variada (SC) fornecem suporte estrutural para a espermatogênese. Cortes de retículo endoplasmático liso (SER) e do aparelho de Golgi (GA; que dá origem ao acrossoma de espermátides) são observáveis. Espermatogônia tipo A (A), espermátócito primário (P), espermátócito secundário (SS), espermátide inicial (Sa) e espermátide alongada (Sd1) caracterizam esse túbulo seminífero de estágio V..... 19
- Figura 2. Variação sazonal da concentração sérica de Inibina-B em garanhões adultos 26
- Figura 3. Concentração sérica de AMH (hormônio anti-mulleriano) em potros pré-púberes, garanhões normais e criptorquidas..... 28

Capítulo 02

- Figura 1. Níveis séricos de hormônio anti-mulleriano (AMH), testosterona, sulfato de estrona e inibina-B em garanhões tratados (Grupo Fértil) com lecirelina e garanhões que não receberam nenhum tratamento (Grupo Controle) durante 16 semanas de avaliação..... 58
- Figura 2. Nível sérico de LH durante as primeiras 24 horas (A), e ao longo das 16 semanas de avaliação (B), nos animais que receberam a aplicação de lecirelina (grupo fértil) e nos animais que não receberam nenhum tratamento (grupo controle)..... 58
- Figura 3. Número de espermatozoides totais (milhões/ml) de garanhões tratados com lecirelina (Grupo Fértil, n=4) e garanhões que não receberam nenhum tratamento (Grupo Controle, n=3)..... 59
- Figura 4. Número de espermatozoides totais do ejaculado de quatro garanhões subfêrteis tratados com lecirelina..... 59

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1.	Introdução e Justificativa	10
2.	Revisão de Literatura	12
2.1	Neuroendocrinologia da Reprodução	12
2.2	Espermatogênese	14
2.3	Aplicação de análogos de GnRH em garanhões	22
3.	Objetivos	32
4.	Referências	33

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1. Perfil hormonal e qualidade espermática de garanhões

	tratados lecirelina	48
1.	Introdução	51
2.	Material e Métodos	52
3.	Resultados	56
4.	Discussão	64
5.	Referências	70

CAVALERO, T.M.S. BIOMARCADORES DE FERTILIDADE E PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE GARANHÕES TRATADOS COM ANÁLOGO DE GnRH (LECIRELINA). Botucatu – SP. 2023. 80p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

O uso de biotecnologias aplicadas ao sêmen é pouco eficaz em processos que reduzem drasticamente a produção espermática, como a senilidade e disfunções endócrinas. Nesses processos, o uso de GnRH tem ocasionado melhora da quantidade e qualidade espermática em algumas espécies. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficácia e os efeitos adversos da aplicação de GnRH em garanhões na melhora da qualidade seminal. No experimento 01 foram utilizados garanhões com qualidade espermática normal, divididos em grupo controle (n=3), e tratado (n=4). O grupo tratado recebeu doses diárias de lecirelina (50 µg;im) durante 60 dias, ambos os grupos foram avaliados durante o tratamento e por mais 60 dias após o término do tratamento. Amostras de sêmen e soro sanguíneo foram semanalmente coletadas. No Exp. 02 foram utilizados garanhões subfêrteis (n=4), com histórico de $\leq 20\%$ de taxa de concepção, baixa qualidade ou produção espermática. Os subfêrteis foram submetidos ao mesmo tratamento do Exp.01, porém com avaliações quinzenais dos parâmetros espermáticos e hormonais. Em ambos os experimentos a resposta testicular endócrina foi mensurada por dosagem sérica de inibina-B, AMH e sulfato de estrona, determinadas por ELISA; e testosterona por radioimunoensaio. No Exp. 02 também avaliou-se os níveis séricos de FSH e LH por radioimunoensaio. Os parâmetros espermáticos avaliados foram número de espermatozoides totais (NET); cinética espermática pelo sistema CASA (IVOS Version 12 Hamilton Thorne Research, MA, USA): motilidade total e progressiva, número de espermatozoides rápidos; e análise morfofuncional por citometria de fluxo: potencial de membrana mitocondrial, integridade de membrana plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana plasmática, peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigênio. Os resultados hormonais e espermáticos foram comparados semanalmente com os valores pré-tratamento durante todo o período experimental. Os parâmetros avaliados foram analisados dentro de cada momento pelo teste t (Student) e dentro de cada grupo pela análise de medidas repetidas no tempo (One-way repeated measures). O perfil sérico de AMH, inibina-B e sulfato de estrona não alteraram com o tratamento em nenhum experimento. No Exp.02 não ocorreu redução do FSH, porém o LH diminuiu da semana

1 ($P>0.001$) até o final do experimento. A testosterona sérica apresentou diferença entre as semanas 6 e 16 (302 vs 977 pg/ml, respectivamente $P<0,033$) e um garanhão subfértil aumentou o NET em 100% na semana 4. No Exp.01 o NET do grupo tratado aumentou em 50% após 4 semanas de tratamento e se mantiveram elevados até o final da avaliação. A estabilidade de membrana e o potencial de membrana mitocondrial aumentaram uma semana após o início do tratamento ($P<0,001$) no grupo tratado, retornando aos valores pré-tratamento 60d após o fim da aplicação. Em conclusão, embora o tratamento tenha ocasionado queda da testosterona sérica em alguns animais, outros hormônios indicadores da funcionalidade testicular não foram afetados. Já o aumento da produção espermática, da estabilidade e potencial de membrana mitocondrial demonstram que a terapia com lecirelina pode ser benéfica em determinados casos de subfertilidade.

Palavras-chave: subfertilidade, sêmen, equinos, função testicular, neuroendocrinologia

CAVALERO, T.M.S. POTENCIAL FERTILITY BIOMARKERS AND SPERM PRODUCTION IN STALLIONS TREATED WITH GnRH ANALOGUE (LECIRELIN). Botucatu – SP. 2023. 80p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The use of biotechnology in semen manipulation is not effective in processes that drastically reduce sperm production, such as senility and endocrine disorders. In these cases, the use of GnRH has led to an improvement in sperm quantity and quality in some species. Thus, the aim of this research was to evaluate the effectiveness and adverse effects of GnRH application in stallions in improving seminal quality. In experiment 01, stallions with normal sperm quality were divided into a control (n=3) and treated group (n=4). The treated group received daily doses of lecorelin (50 µg;im) for 60 days and were evaluated for another 60 days after the end of treatment. Semen and blood serum samples were analyzed weekly during the evaluation period. In experiment 02, subfertile stallions (n=4) with a history of $\leq 20\%$ conception rate with fresh and cooled semen, low quality or sperm production were selected. The subfertile stallions were submitted to the same treatment as Exp.01, but with biweekly evaluations of sperm and hormonal parameters. In experiments 1 and 2, the testicular endocrine response was measured by serum levels of inhibin-B, AMH, testosterone and estrone sulfate. Exp. 02 also assesses serum levels of FSH and LH by radioimmunoassay. The sperm parameters evaluated were total sperm number, total and progressive motility, rapid sperm number, mitochondrial membrane potential, plasma and acrosomal membrane integrity and stability, lipid peroxidation and sperm production of reactive oxygen species (ROS). Hormone and sperm results were compared with pre-treatment values up to 60 days after treatment. Serum concentrations of inhibin-B, AMH and estrone sulfate were determined by ELISA and testosterone by radioimmunoassay. Sperm kinetics were analyzed by the CASA system (IVOS Version

12 Hamilton Thorne Research, MA, USA). Plasma membrane integrity and stability, mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation and ROS formation by flow cytometry, only in Exp 01. The evaluated parameters were analyzed within each moment by the t test (Student) and within each group by repeated measures over time analysis (One-way repeated measures). Serum levels of AMH, inhibin-B and estrone sulfate did not change with treatment in any experiment. In Exp.02, there was no reduction in FSH, but LH decreased from week 1 ($P>0.001$) until the end of the experiment. Serum testosterone showed a difference between weeks 6 and 16 (302 vs 977 pg/ml, respectively $P<0.033$) and one subfertile stallion (1/4) increased sperm production by 100% in week 4. In Exp.01 the total sperm number in the treated group increased by 50% after 4 weeks of treatment and remained high until the end of the evaluation. Membrane stability and mitochondrial membrane potential increased one week after the start of treatment ($P<0.001$) in the treated group, returning to pre-treatment values 60d after the end of the application. In conclusion, although the treatment decreased serum testosterone in some stallions, other hormones that indicate testicular function were not affected. Thus, the increase in sperm production, stability and mitochondrial membrane potential demonstrate that the treatment may be interesting in certain cases of subfertility.

Keywords: subfertility, semen, equine, testicular function, neuroendocrinology.

CAPÍTULO 01



1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os garanhões, diferentemente do que ocorre com os machos de outras espécies, são selecionados devido a sua performance atlética e não pelo desempenho zootécnico. Durante a vida atlética esses animais estão vulneráveis a lesões inerentes à prática de qualquer esporte e quando terminam sua campanha esportiva são colocados para a reprodução, já com uma idade relativamente avançada. Esses fatores fazem com que os garanhões apresentem menor fertilidade, de modo que em vários casos é necessário o uso de terapias e biotecnologias aplicadas ao sêmen para tentar melhorar a qualidade seminal (HINOJOSA *et al.*, 2001; ALVARENGA; PAPA, 2009).

O uso de biotecnologias na manipulação do sêmen é pouco eficaz em processos que reduzem drasticamente a produção espermática, como a senilidade, aplicação de esteroides e alterações na termorregulação testicular. Alterações endócrinas, hipofisárias, hipotalâmicas ou qualquer tipo de disfunção que cause desequilíbrio nos mecanismos neuroendócrinos de regulação da função testicular também impactam negativamente na produção espermática (BLANCHARD; VARNER, 1992; ROSER, 2008; ALVARENGA; PAPA, 2009). Nesses casos, o uso de terapias hormonais pode aumentar a quantidade e qualidade da produção espermática (HINOJOSA *et al.*, 2001).

A aplicação exógena de GnRH tem sido associada a dessensibilização de seus receptores em ratos (WARD *et al.*, 1989; GUARRACI *et al.*, 2021), suínos (KOPERA *et al.* 2009) e cães (JUNAIDI *et al.* 2009), acarretando em redução drástica da espermatogênese. Em touros os implantes subcutâneos de deslorelina levaram a *down regulation* dos receptores de GnRH. No entanto, os níveis séricos de testosterona e o processo de espermatogênese não foram suprimidos (D'OCCHIO *et al.* 2000).

Em garanhões férteis a utilização de implantes de deslorelina, um agonista de GnRH, causou supressão dos receptores de GnRH, porém os níveis de testosterona bem como a produção espermática não foram alterados (GAUTIER *et al.* 2018). Já Falomo *et al.* (2013) observaram redução do comportamento sexual e da concentração sérica de testosterona 42 dias após a inserção do implante.

Contrariamente, a aplicação diária por via intramuscular de buserelina, outro análogo de GnRH, resultou em melhora do comportamento sexual, da motilidade progressiva, da integridade de membrana plasmática e acrossomal e reduziu o período de

latência até a ejaculação em garanhões bons e maus congeladores (SIEME *et al.* 2004). Similarmente, a aplicação de buserelina diariamente em ovinos resultou em aumento da motilidade espermática e redução dos defeitos de peça intermediária e cauda (GIRIBONI *et al.* 2019).

Em garanhões subfêrteis o GnRH exógeno levou a um aumento na produção espermática diária e melhora da cinética espermática (EVANS *et al.*, 1990; BRINSKO, 1996; BRINSKO *et al.*, 1998). Os garanhões, ao contrário do observado em outras espécies, parecem ser resistentes a *down regulation* induzida pela administração exógena de GnRH (BRINSKO, 1996).

Estudos sugerem que cada espécie apresente uma resposta individual a tratamentos com GnRH. Em equinos, embora a aplicação exógena de GnRH cause dessensibilização dos receptores hipofisários, a produção de testosterona parece permanecer normal e é suficiente para manter a espermatogênese (MOTOVAN *et al.*, 1990; BLUE *et al.*, 1991; BRINSKO *et al.*, 1998; GAUTIER *et al.*, 2018).

Diferentemente de um implante de liberação lenta que mantém o GnRH constantemente elevado, a aplicação diária poderia causar um menor efeito a nível hipotalâmico-hipofisário. Assim, é provável que a aplicação diária de GnRH permita que os níveis séricos diminuam ciclicamente, reduzindo o *feed back* negativo a nível hipofisário. Desse modo, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o perfil hormonal sérico, a cinética, morfologia e viabilidade espermática nos testículos de garanhões férteis e subfêrteis antes, durante e após o tratamento diário com GnRH exógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Neuroendocrinologia da Reprodução

A manutenção de uma função testicular normal é dependente de uma comunicação funcional entre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Essa comunicação envolve um mecanismo de *feedbacks* regulados por sinalizações endócrinas, parácrinas e autócrinas. Embora os mensageiros provenientes dessas vias de comunicação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, bem como as estruturas anatômicas envolvidas nesse processo, estejam bem identificadas, a maneira como esses mensageiros se relacionam e modulam a atividade reprodutiva ainda não foi completamente esclarecida (ROSER, 2008).

O GnRH é produzido em padrões pulsáteis pelo hipotálamo, e por meio dos neurônios hipotalâmicos atinge a glândula hipófise e promove a produção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). O hormônio LH atua nas células de Leydig, induzindo a esteroidogênese (andrógenos e estrógenos). A produção do hormônio testosterona pelas células de Leydig é fundamental para o desenvolvimento das características físicas e comportamentais do macho devido as suas funções anabólicas e androgênicas. A testosterona produzida se difunde pelos túbulos seminíferos e induz a produção de diversos fatores que iniciam e mantem o desenvolvimento das células germinativas (AMANN, 1993; ROSER, 2001; ROSER, 2008).

Já o FSH apresenta receptores nas células de Sertoli, estimulando a produção de estrógenos, inibina, ativina, bem como a gametogênese (AMANN, 1993; ROSER, 2001; ROSER, 2008). As células de Sertoli também sintetizam diversos fatores de crescimento como o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), interleucinas e proteínas ligantes de andrógenos (ABP) (SHARPE, 1983). As ABP's são glicoproteínas que carregam especificamente os hormônios testosterona, di-hidrotestosterona e 17 β estradiol. A ligação desses hormônios às ABP's aumenta sua lipossolubilidade, concentrando-os no ambiente testicular, no qual são fundamentais para a espermatogênese (ROSER, 2001; ROSER, 2008).

Um *feed back* negativo promove a manutenção dos níveis hormonais em equilíbrio. Desse modo, o aumento do FSH circulante induz a produção do hormônio inibina, que causa um *feed back* negativo para a produção do hormônio FSH. De forma

oposta, quando os níveis de FSH estão baixos, as células de Sertoli produzem o hormônio ativina, que parece estimular sua produção, gerando um *feed back* positivo para o FSH (ZIRKIN *et al.*, 1994).

Estudos sugerem que o FSH tenha uma função essencial no desenvolvimento e proliferação das células de Sertoli antes da puberdade. O FSH associado a testosterona durante esse período estariam relacionados com a ativação da diferenciação e maturação necessários para induzir a expressão gênica de fatores parácrinos essenciais às células germinativas (JOHNSON *et al.*, 1991).

Embora o hormônio FSH seja fundamental para a espermatogênese durante a puberdade, sua importância na regulação da produção espermática em mamíferos adultos ainda é questionável (ZIRKIN *et al.*, 1994). Camundongos imunizados com anticorpos anti-GnRH mantiveram a espermatogênese normal, sugerindo que apenas a testosterona seria suficiente para manter a função testicular (ROBERT; ZIRKIN, 1991). Contrariamente, garanhões vacinados com antagonistas de GnRH apresentaram queda tanto nos níveis séricos de testosterona quanto na produção espermática diária (STOUT, 2005).

De acordo com ZIRKIN *et al.* (1994) ambos os hormônios, FSH e testosterona, seriam importantes para regulação da espermatogênese. A testosterona como um fator parácrino agiria na manutenção da qualidade de formação das células germinativas, enquanto o FSH atuaria diretamente nas fases pré e pós-meióticas, contribuindo quantitativamente na produção de células germinativas durante a espermatogênese.

O estrógeno também apresenta funções importantes tanto na produção espermática quanto na modulação das funções celulares dos testículos, e em garanhões o ambiente testicular apresenta concentrações de estrógenos extremamente elevadas quando comparado as demais espécies. Acredita-se que o estrógeno estava envolvido na diferenciação das células de Sertoli e na maturação das células de Leydig (ROSER, 2008).

O funcionamento testicular normal também é regulado por outros sinalizadores como o hormônio tireoideano, hormônio do crescimento e a prolactina. A prolactina está envolvida na indução da transcrição de receptores de estrógeno e, juntamente com o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio do crescimento, controlam a síntese de receptores de LH nos testículos (HONDO *et al.* 1995; COOKE *et al.*, 2004).

O hormônio tireoideano é responsável pela regulação e transporte de colesterol para o interior mitocondrial das células de Leydig, de modo que uma redução no hormônio tireoideano acarreta em redução na produção de testosterona (COOKE *et al.*, 2004). Já o hormônio do crescimento tem sido relacionado com a inibição da liberação de LH e aumento nas concentrações testiculares de IGF-1 (ROSER, 2008). Tratamentos com o hormônio do crescimento aumentam a concentração plasmática de IGF-1 e promovem uma melhora na motilidade espermática (COLON *et al.*, 2007).

Estudos tem evidenciado uma participação ativa do IGF-1 na síntese de testosterona, na diferenciação das espermatogônias tipo A, na síntese de DNA nas espermatogônias até a fase pré-meiótica, além de efeitos anti-apoptóticos nas células de Leydig e células germinativas. O IGF-1 possui receptores nas células germinativas, células de Leydig, Sertoli e também nas células peritubulares mióides e é estimulado pelo hormônio do crescimento, FSH e, em maior proporção, pelo LH (COLON *et al.*, 2007).

Em garanhões subférteis os níveis de IGF-1 não diferiram em comparação a garanhões férteis, sugerindo-se que este fator não seja um biomarcador de fertilidade confiável (NOVAK *et al.*, 2010; HESS; ROSER, 2011). No entanto, este conceito continua controverso, já que alguns autores têm atribuído altas concentrações de IGF-1 no plasma seminal com maiores taxas de fertilidade (MACPHERSON *et al.*, 2002).

2.2. Espermatogênese

A espermatogênese é o processo em que ocorre a divisão e o desenvolvimento dos espermatozoides. Mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos de comunicação são responsáveis pela manutenção da função testicular, coordenando a proliferação, divisão e diferenciação celular. Esse processo biológico ocorre no interior dos túbulos seminíferos, que são formados por células somáticas (Células de Sertoli e Células mióides) e células germinativas (JOHNSON *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 2008).

Os túbulos seminíferos são divididos em compartimento basal e adluminal, sendo o compartimento basal circundado pelo interstício testicular que é composto por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células de Leydig. Já o compartimento adluminal é protegido pela barreira-hematotesticular, formada pelas células de Sertoli, que formam o principal componente estrutural do epitélio seminífero (JOHNSON *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 2008).

A presença da barreira-hematotesticular mantém as espermatogônias e os espermatócitos primários no compartimento basal enquanto os estágios mais avançados do desenvolvimento acontecem no compartimento adluminal. Essa organização estrutural isola os tipos de células germinativas mais avançadas (espermatócitos e espermátides) do sistema imunológico para que seus antígenos não estimulem uma resposta autoimune (AMAN, 1981; JOHNSON *et al.*, 2008).

A esteroidogênese é em grande parte realizada nas células de Leydig, que produzem grandes quantidades de testosterona. Após a puberdade as células de Leydig maduras possuem alta expressão de receptores de LH. Esses receptores quando ativados induzem a degradação do colesterol e formação de pregnolona no interior das mitocôndrias. Posteriormente o retículo endoplasmático liso transforma a pregnolona em progesterona, que é convertida em androstenediona e testosterona (HAIDER, 2004).

Grande produção de estrógeno também é observada nas células de Leydig. Esse processo é catalisado pela enzima aromatase, que converte testosterona ou androstenediona em estradiol (EISENHAUER *et al.*, 1994). As células de Sertoli também possuem a enzima aromatase, sendo assim outra fonte de estrógenos em gananhões (SIPAHUTAR *et al.*, 2003).

A espermatogênese na espécie equina requer aproximadamente 57 dias e é subdividida em três fases: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese. A espermatocitogênese é caracterizada por sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias e dura aproximadamente 19 dias (JOHNSON *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 2011). Parte dessas espermatogônias permanecem indiferenciadas para reposição das células da linhagem, enquanto outras rapidamente se diferenciam em espermatócitos primários (JOHNSON *et al.*, 1995).

Em gananhões são descritos cinco subtipos de espermatogônias: A1, A2, A3, B1 e as espermatogônias B2, que se transformam em espermatócitos primários após a divisão. A espermatocitogênese é um processo de grande produção de espermatogônias associado a altas taxas de apoptose dessas células. Acredita-se que esse mecanismo seja natural do processo, evitando assim uma sobrecarga das células de Sertoli (JOHNSON *et al.*, 1997). Adicionalmente, alguns estudos tem mostrado que as células em apoptose podem ser uma fonte de energia para as células de Sertoli (XIONG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2020).

A segunda fase da espermatogênese é denominada meiose e tem início com a primeira divisão meiótica. Nessa fase ocorre duplicação do material genético e *crossing over* entre os cromossomos homólogos, formando duas células haploides ($n=32$), os espermatócitos secundários. Porém, as cromátides irmãs de cada cromossomo ainda estão unidas nessa etapa, assim, na segunda divisão meiótica as cromátides irmãs se separam e formam as espermatídes (JOHNSON *et al.*, 1990). Esse é o período mais longo de todo o processo, demorando cerca de 20 dias (JOHNSON *et al.*, 1997; BRITO *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2011).

A espermiogênese é a fase final da produção espermática, na qual as espermatídes, de formato arredondado, passam por sucessivas alterações morfológicas para se tornarem um espermatozoide. A formação do flagelo, por meio da migração dos centríolos e formação do axonema é iniciada logo após o fim da meiose. Conforme as espermatídes se alongam as mitocôndrias também se organizam na região proximal ao longo da peça intermediária, constituindo a bainha mitocondrial (JOHNSON *et al.*, 1990; JOHNSON *et al.*, 2008; JOHNSON *et al.*, 2011; JUNQUEIRA, 2013; O'DONNELL, 2014).

Enquanto os centríolos migram para o pólo oposto, no complexo golgiense ocorre a formação e diferenciação do grânulo acrossomal em acrossoma, vesícula repleta de enzimas hidrolíticas que recobre parte do núcleo do espermatozoide. Também ocorre redução do citoplasma com eliminação do corpo residual, que é fagocitado pela célula de Sertoli (JOHNSON *et al.*, 2008; JOHNSON *et al.*, 2011; JUNQUEIRA, 2013).

Simultaneamente, as espermatídes sofrem condensação nuclear, onde as histonas são substituídas por protaminas, levando a uma compactação da cromatina. Esse mecanismo torna o material genético inacessível a nucleases ou agente mutagênicos (OLIVA, 2006). A estabilidade da cromatina espermática é importante para garantir a fertilidade do garanhão (LOVE; KENNEY, 1998; LOVE, 2021).

Por fim, acontece a espermiação, evento pelo qual as espermatídes alongadas sofrem sua remodelação final e liberam do espermatozoide no lúmen dos túbulos seminíferos (O'DONNELL, 2011). Esse processo de espermiogênese é de aproximadamente 18 dias na espécie equina (JOHNSON *et al.*, 1997; BRITO *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2011).

No entanto, os espermatozoides ao saírem do testículo precisam passar pelo processo de maturação para adquirir capacidade fecundante, o que ocorre durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo (GATTI *et al.*, 2004). Em garanhões, o trânsito epididimário completo varia entre 9 e 12 dias (JOHNSON *et al.*, 1997; BRITO *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2011).

2.2.1. Células de Sertoli

As células de Sertoli são uma das células mais complexas do corpo, com uma habilidade extraordinária de mudar continuamente de forma e modificar suas funções para coordenar a espermatogênese. As funções das células de Sertoli incluem fornecer suporte estrutural e nutrição para células germinativas em desenvolvimento, fagocitose de células germinativas em degeneração e corpos residuais, liberação de espermátides na espermição e produção de uma série de proteínas que regulam e/ou respondem à liberação de hormônios hipofisários e que influenciam a atividade mitótica das espermatogônias (RUSSEL; GRISWOLD, 1993; JOHNSON *et al.*, 2008).

Ademais, são o primeiro tipo de célula somática a se diferenciar durante o desenvolvimento embrionário e, portanto, desempenham um papel fundamental no início e manutenção do desenvolvimento testicular (RUSSEL; GRISWOLD, 1993). As células de Sertoli também são importantes na definição do sexo gonadal. No cromossomo Y existe o gene determinante do sexo (SRY), expresso pelas células precursoras das células de Sertoli. Esse gene direciona a expressão de vários genes e fatores que promovem a diferenciação das células de Sertoli e o desenvolvimento da gônada masculina (SINCLAIR *et al.*, 1990; O'DONNELL *et al.*, 2022).

Após o nascimento, um evento chave no estabelecimento da espermatogênese é a migração dos gonócitos para a base dos túbulos seminíferos, e a retomada da atividade proliferativa para estabelecer a população de espermatogônias. A população de espermatogônias é mantida em um microambiente especializado, chamado de “nicho”, que sustenta sua autorrenovação. As células de Sertoli são um dos principais contribuintes para a retomada da atividade mitótica e do equilíbrio desse microambiente. Experimentalmente, o aumento do número de células de Sertoli causou um incremento correspondente no número de nichos de espermatogônias (DE ROOIJ; DIRG, 2015).

As células de Sertoli proliferam durante os períodos fetal e neonatal, cessando a proliferação durante a puberdade, quando começam sua diferenciação terminal na forma adulta, constituindo uma população estável no túbulo seminífero (FRANÇA; GARCIA, 2005). Porém, alguma proliferação durante a idade adulta ainda pode ocorrer em certas circunstâncias, por exemplo, em algumas formas de infertilidade e em espécies com atividade reprodutiva sazonal. O garanhão é um exemplo de espécie com flutuações naturais no número de células de Sertoli em adultos (JOHNSON et al., 2008).

Depois de se tornarem maduras, as células de Sertoli passam a participar da proliferação de espermátócitos primários, do desenvolvimento das junções de oclusão que formam a barreira hematotesticular e da formação do lúmen tubular devido à secreção de fluidos em direção aos centros dos cordões seminíferos pelas células de Sertoli (RUSSEL & GRISWOLD, 1993).

A célula de Sertoli adulta é uma célula grande, com uma superfície achatada em contato com a membrana basal do túbulo seminífero. Essas células também apresentam um citoplasma extenso com numerosos prolongamentos laterais e apicais. Esses processos citoplasmáticos entram em contato com células germinativas em todos os diferentes estágios de desenvolvimento. (RUSSEL; GRISWOLD, 1993; JOHNSON et al., 2008; O'DONNELL et al., 2022).

Assim, funcionam como uma célula de suporte tanto para o tipo de célula germinativa mais imatura, a espermatogônia, quanto para espermátides alongadas altamente especializadas. Cada célula de Sertoli está em constante adaptação para manter o desenvolvimento de até cinco tipos diferentes de células germinativas simultaneamente (RUSSEL; GRISWOLD, 1993; FEI-DA et al., 2019; O'DONNELL et al., 2022).

Um corte transversal do epitélio seminífero (Fig. 1) mostra espermatogônias localizadas na base do túbulo seminífero, espermátócitos no meio e espermátides próximas ao ápice do epitélio seminífero. Demonstrando assim a progressão do desenvolvimento da célula espermática menos madura para a mais madura à medida que se movem em direção ao lúmen (AMANN, 1970), onde são liberadas como espermatozoides pelo processo de espermição (JOHNSON et al., 2008).

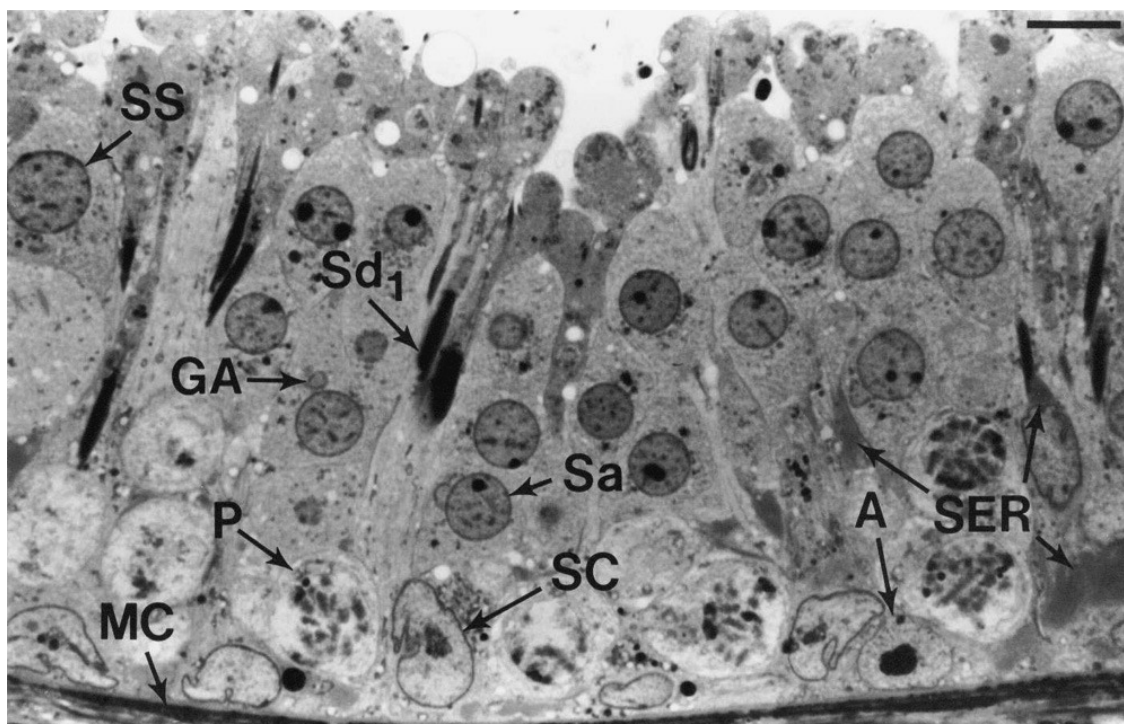


Figura. 1. Túbulo seminífero visto por microscopia de campo claro. As células mióides (MC) marcam os limites externos do túbulo seminífero e as células de Sertoli contendo núcleos de forma variada (SC) fornecem suporte estrutural para a espermatogênese. Cortes de retículo endoplasmático liso (SER) e do aparelho de Golgi (GA; que dá origem ao acrossoma de espermátides) são observáveis. Espermatogônia tipo A (A), espermátócito primário (P), espermátócito secundário (SS), espermátide inicial (Sa) e espermátide alongada (Sd1) caracterizam esse túbulo seminífero de estágio V. O comprimento da barra é igual a 12 μm . Fonte: Johnson et al. (2008).

Em garanhões, o número de células de Sertoli é correlacionado com o peso testicular ($r^2 = 0.68$) e a produção espermática ($r^2 = 0.68$) (CHAUDHARY et al., 2005). A proliferação pós-natal das células de Sertoli é regulada por fatores endócrinos e parácrinos, incluindo ativina, estrógeno, hormônio tireoidiano e FSH. Alterações nesses fatores no período pós-natal causam mudanças permanente no número de células adultas de Sertoli e no tamanho do testículo (JOHNSON et al., 2008; O'DONNELL et al., 2022).

O Hormônio folículo estimulante (FSH) é um dos principais hormônios reguladores das células de Sertoli, estimulando a produção de fatores que são requeridos pelas células espermáticas em desenvolvimento (WALKER; CHENG, 2005). Sob influência do FSH as células de Sertoli produzem diversos fatores como o GDNF (fator neurotrófico derivado da célula glial), um membro da superfamília TGF- β , que regula a proliferação das espermatogônias e a manutenção do microambiente dos túbulos seminíferos (SUN et al., 2008). Outros fatores derivados das células de Sertoli também auxiliam na manutenção desse nicho, incluindo FGF2 e o fator inibidor de leucemia (LIF) (FEI-DA et al., 2019).

Análises de microarranjos sugerem que, pelo menos 300 genes nas células de Sertoli são regulados positiva ou negativamente pelo FSH (McLEAN et al. 2002, SADATE-NGATCHOU et al. 2004). A ligação de FSH aos seus receptores nas células de Sertoli estimulam diversas vias sinalização como a proteína quinase ativada pelo cAMP (AMPK). A via de sinalização da AMPK regula o metabolismo energético, a estabilidade do complexo juncional e a proliferação de espermatogônias (PETRICA et al., 2019). Ademais, a sinalização pela AMPK também regula a expressão do fator de células-tronco, que potencializa a sobrevivência e expansão das espermatogônias, bem como a aromatase, o ativador de plasminogênio e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) (FEI-DA et al., 2019).

A via AMPK também atua na enzima lactato desidrogenase, estimulando a conversão de piruvato em lactato, a principal fonte de combustível para as células germinativas em desenvolvimento. O lactato é uma fonte energética preferencial de espermatócitos e espermátides, sendo a maior parte fornecida pelas células de Sertoli (SHORT et al., 1994).

As células de Sertoli também secretam glicoproteínas que facilitam o transporte de íons e hormônios, como as proteínas ligadoras de andrógenos (ABP's), transferrinas e ceruloplasminas. Já o fornecimento de proteases e inibidores de protease é importante nos processos de remodelação tecidual que ocorrem, por exemplo, durante a espermição ou no movimento de espermatócitos pré-leptótenos dentro do compartimento adluminal do túbulo seminífero. Além disso, as células de Sertoli secretam peptídeos vasoativos e taquiquininas que demonstraram, *in vitro*, induzir a liberação de lactato e transferrina, além de estimular a atividade da aromatase (DIMITRIADIS et al., 2015).

A espermatogênese normal é dependente de FSH, mas também de andrógenos, como a testosterona, produzidos pelas células de Leydig, sendo necessários para a espermatogênese quantitativamente normal. As células de Sertoli, diferente das células germinativas, expressam receptores de andrógenos e, portanto, são hormônios necessários para traduzir estímulos para as células germinativas. No entanto, é importante observar que há sinalização responsiva aos andrógenos em outras células somáticas, como as células peritubulares, que também auxiliam a espermatogênese (WALKER; CHENG, 2005; O'DONNELL et al., 2022).

A sinalização dos receptores de andrógenos nas células de Sertoli é necessária para a conclusão da meiose e para garantir que as células germinativas no início da prófase adquiram competência para a divisão meiótica. A progressão através da espermiogênese também depende de sinais dependentes de andrógenos das células de Sertoli. Este fato indica que andrógenos afetam indiretamente a espermatogênese através das células de Sertoli, pois interagem diretamente com o desenvolvimento células germinativas e expressam receptores funcionais de andrógenos (WALKER; CHENG, 2005; O'DONNELL et al., 2022).

Estudos em camundongos sem receptores de andrógenos nas células de Sertoli revelaram muitos genes e proteínas que provavelmente participam da regulação dependente de andrógenos do desenvolvimento de células germinativas (WILLEMS et al., 2010). Por exemplo, as células de Sertoli fornecem sinais essenciais para a sobrevivência das células germinativas à medida que avançam na espermatogênese, e a retirada de FSH e/ou testosterona resulta na indução de apoptose em estágios específicos do desenvolvimento das células germinativas (O'DONNELL et al., 2022).

As células de Leydig são células esteroideogênicas cujo principal papel é produzir andrógenos, como a testosterona, necessários para a fertilidade e virilidade. No testículo fetal de camundongo, as células de Leydig expressam CYP17A1 para produzir altos níveis do precursor de androstenediona, que é então convertido em testosterona nas células de Sertoli pela enzima HSD17B3. Enquanto as células de Leydig e as células de Sertoli cooperam para produzir andrógenos no testículo fetal, as células de Leydig são o principal local de síntese de testosterona no adulto (SHIMA et al., 2013).

Fatores imunomoduladores reguladores da função das células imunes intersticiais também são sintetizados pelas células de Sertoli mediante estímulo de andrógenos. Uma redução na expressão de receptores de andrógeno nas células de Sertoli compromete a função das junção oclusivas, alterando o privilégio imunológico dentro da barreira hematotesticular. Assim, as células de Sertoli tem um papel chave na espermatogênese, regulando esse processo por meio de uma complexa sinalização parácrina, autócrina e endócrina (O'DONNELL et al., 2022).

2.3. Potenciais biomarcadores hormonais de fertilidade em garanhões

Testosterona

O hormônio testosterona é produzido no parênquima testicular pelas células de Leydig e tem sido muito utilizado como um marcador reprodutivo em garanhões, auxiliando no diagnóstico de criptorquidismo, subfertilidade, baixa libido e degeneração testicular. Esse esteroide é praticamente indetectável no soro sanguíneo de machos castrados devido a ausência das suas células de Leydig, enquanto machos inteiros e criptorquídicos apresentam elevada concentração sérica. Embora a espermatogênese esteja comprometida em animais com criptorquidismo, a esteroidogênese permanece normal (ARIGUI *et al.*, 1986; COX *et al.*, 1986; ROSER, 1995; PALME *et al.*, 1998; PARLEVLIET *et al.*, 2011).

A secreção de testosterona segue um ciclo circadiano, apresentando maiores níveis circulantes no início da manhã e redução progressiva no período da tarde até a noite (BYERS *et al.*, 1983). Potros com idade inferior a 2 anos possuem níveis basais significativamente menores em relação a garanhões adultos (HAMILTON *et al.*, 1984; CLAES *et al.*, 2013). Em garanhões entre 2 e 20 anos de idade, a concentração sérica desse hormônio varia entre 0.68 – 3.2 ng/ml. A sazonalidade da espécie influencia na secreção de testosterona ao longo do ano, sendo os maiores níveis basais observados nos meses de maior intensidade luminosa (BERNDTSON *et al.*, 1974; GANJAM *et al.*, 1975; SHARMA *et al.*, 1976; CLAES *et al.*, 2013; BALL *et al.*, 2019).

A dosagem de testosterona é uma ferramenta muito utilizada em insultos térmicos testiculares, evidenciando significativa queda em estudos utilizando insulação escrotal em touros (RIZZOTO *et al.*, 2020), carneiros (ALVES *et al.*, 2016) e garanhões (BLANCHARD *et al.*, 2000). A aplicação de dexametasona, anti-inflamatório esteroide, também apresenta impacto negativo na secreção de testosterona em garanhões (ING *et al.*, 2014).

Em garanhões com baixa libido e subfertilidade a dosagem de testosterona sempre foi muito utilizada para avaliar a função testicular. No entanto, diversos estudos tem evidenciado sua ineficácia no diagnóstico dessas afecções, já que em muitos casos a testosterona apresenta níveis normais em animais com disfunções reprodutivas (ROSER, 1995; STEWART; ROSER, 1998, HINOJOSA *et al.*, 2001).

De acordo com Roser (1995), a testosterona e o estrógeno conjugado não diferem entre garanhões férteis, subférteis e inférteis. No entanto, resultados de estudos prévios utilizando aplicações de antagonistas de GnRH são contraditórios. Hinojosa *et al.* (2001) observou que a administração de Antarelix não alterou a concentração de testosterona sérica. Diferentemente, outros estudos observaram uma queda significativa na concentração deste hormônio durante o tratamento (STOUT, 2005; BALL *et al.*, 2019).

Alguns pesquisadores sugerem que a dosagem de FSH e estrógeno fornecem mais informações sobre a função testicular que a dosagem de testosterona (DOUGLAS; UMPHENOUR, 1992; ROSER, 1995; BRINSKO, 1996). Redução de estrógeno sérico e elevação de FSH foram relacionados a oligospermia em animais previamente férteis (DOUGLAS; UMPHENOUR, 1992). Casos de subfertilidade foram relatados apresentando LH e testosterona normais, enquanto o FSH apresentava elevação dos níveis plasmáticos (BURNS; DOUGLAS, 1985). Desse modo, a fim de avaliar a função testicular com maior precisão e eficácia são necessários estudos com outros hormônios também envolvidos na regulação da função testicular.

Estrógeno

Os machos equinos apresentam níveis séricos e testiculares de estrógeno extremamente elevadas em relação as demais espécies de mamíferos. O estrógeno conjugado circulante é aproximadamente 100 vezes maior que a concentração de testosterona. Garanhões adultos apresentam concentração plasmática de sulfato de estrona entre 100-400 ng/ml (SEAMANS *et al.*, 1991).

O sulfato de estrona é a principal forma dos estrógenos no sangue, plasma seminal e espermatozoides, já o estrógeno não conjugado representa porcentagens inferiores a 7% do total de estrógenos (CLAUS *et al.*, 1992; RAESIDE, 1997). Esse hormônio tem sido relacionado como modulador de processos como divisão das células primordiais em espermatogônias (MIURA *et al.*, 1999), iniciação e manutenção da espermatogênese (EBLING *et al.*, 2000) e a fatores de sobrevivência das células germinativas (PENTIKAINEN *et al.*, 2000).

Ademais, a elevação de estrógeno em potros púberes sugere que este hormônio esteja envolvido na maturação testicular (PARLEVLIET *et al.*, 2006). Durante a puberdade, o estrógeno modula o desenvolvimento das células de Leydig e Sertoli,

aparentemente acelerando a maturação, de modo que potros imunizados contra estrógeno apresentaram maiores volumes testiculares e concentrações espermáticas (THOMPSON; HONEY, 1984).

O estrógeno também pode estar envolvido no comportamento sexual de garanhões. Wallach e colaboradores (1983) observaram baixos níveis séricos de sulfato de estradiol em garanhões impotentes enquanto a testosterona apresentou níveis similares aos dos garanhões normais. Os autores acreditam que essa condição pode estar ligada a três situações: baixa produção de estradiol testicular, ineficiência da enzima aromatase ou rápida metabolização do estradiol.

Similarmente, a aplicação exógena de estrógeno foi capaz de restaurar a libido de equinos (THOMPSON *et al.*, 1980) e ratos castrados (SODERSTEN *et al.*, 1973). Embora os testículos sejam a fonte majoritária de estrógeno, a aromatase também é expressa em diversos outros tecidos e já foi relatada no cérebro equino (LEMAZURIER *et al.*, 2001). Esses achados indicam uma participação direta do estradiol no sistema nervoso central, controlando o comportamento sexual masculino (NAFTOLIN *et al.*, 1971; THOMPSON *et al.*, 1980).

Estudos também sugerem uma participação fundamental do estrógeno no funcionamento dos espermatozoides. Em equinos, foram observados receptores de estrógeno (ERS1, ERS2 e GPER) majoritariamente na peça intermediária, nas mitocôndrias e em regiões da cabeça e cauda muito próximas a peça intermediária, indicando uma participação ativa no batimento flagelar e, conseqüentemente, na motilidade espermática (ARKOUN *et al.*, 2014).

Acredita-se que o estrógeno atue na motilidade, metabolismo e capacitação do espermatozoide. Homens subférteis acometidos por varicocele apresentam essas funções diminuídas, provavelmente devido a redução da função dos receptores de estrógeno (GUIDO *et al.*, 2011). Redução dos níveis séricos de estrógeno também foram observadas em diversas disfunções testiculares em homens (YAMAMOTO *et al.*, 1995).

Em equinos, baixos níveis de sulfato de estrona tem sido correlacionado com baixa produção espermática em animais subférteis (McCUE, 2021). Em garanhões com alterações sugestivas de degeneração testicular observou-se redução na concentração sérica de FSH, LH e estradiol, porém os níveis de testosterona não diferiram da

normalidade (HINOJOSA *et al.*, 2001). No mesmo sentido, garanhões com histórico de subfertilidade ou infertilidade idiopática apresentaram redução na produção de estradiol e inibina, concentrações elevadas de FSH e LH, porém com níveis de testosterona similares aos de garanhões férteis (ROSER, 1995; STEWART; ROSER, 1998).

Inibina

A Inibina é um hormônio glicoproteico secretado predominantemente pelas células de Sertoli em resposta à alta exposição ao FSH. Sua principal função em machos está relacionada a supressão da liberação de FSH pela hipófise anterior (STEINBERGER; STEINBERGER, 1976). Apresenta elevação rápida em garanhões entre 2 e 5 anos de idade, quando esses animais geralmente já atingiram a puberdade e estão próximos de sua capacidade máxima de esteroidogênese e espermatogênese (STEWART; ROSER, 1998).

Essa glicoproteína apresenta duas diferentes subunidades, a subunidade α juntamente à subunidade β_A forma a inibina-A, já a subunidade alfa associada a β_B forma a inibina-B (ROBERTSON *et al.*, 1997). Embora a inibina possua diversas formas moleculares, aparentemente apenas a inibina-A e inibina-B possuem bioatividade. A utilização do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) proporcionou o isolamento e mensuração de ambas as isoformas (CONNOR; KRETZER, 2004). Sabe-se que essas proteínas são capazes de suprimir a liberação de FSH, no entanto, em garanhões a inibina-B é a principal forma circulante (CONNOR; KRETZER, 2004; BALL *et al.*, 2019).

A elevação sérica de inibina-B em potros após a puberdade pode indicar uma atuação direta na maturação testicular e desenvolvimento das células de Sertoli. Diferentemente, a inibina-A não apresenta alterações nos níveis plasmáticos entre os períodos pré e pós-púberes (ELLERBROCK *et al.*, 2018). Assim como outros hormônios relacionados a reprodução, a inibina-B também apresenta variação sazonal (Fig. 01), de modo que durante a estação reprodutiva os níveis se elevam em relação aos demais meses do ano (DHAKAL *et al.*, 2011; BALL *et al.*, 2019).

A concentração sérica de inibina tem sido avaliada como um marcador de fertilidade em diversas espécies. Sua concentração está relacionada a uma espermatogênese ativa e bom funcionamento das células de Sertoli. Em homens, a mensuração sérica de inibina-B tem sido utilizada em diversas alterações reprodutivas

como hipogonadismo, infertilidade, azoospermia, senescência e dano testicular após tratamentos com quimioterápicos e radioterápicos (MEACHEM *et al.*, 2001).

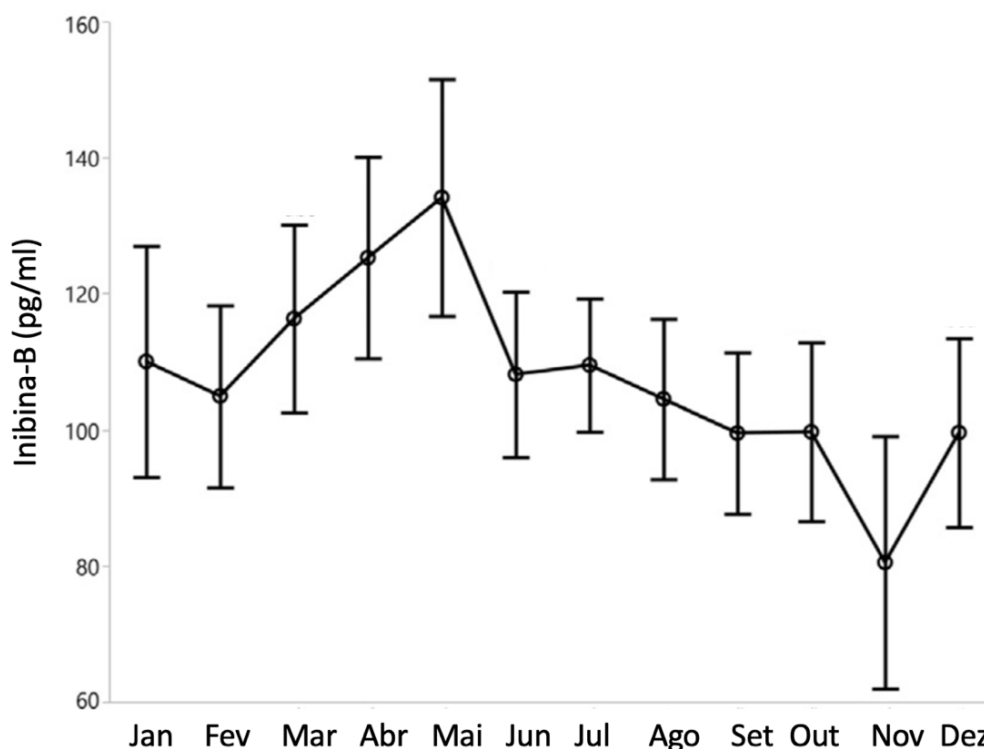


Figura 2. Variação sazonal da concentração sérica de Inibina-B em garanhões adultos. Fonte: Adaptado de Ball *et al.* (2019) *Theriogenology*.

A Inibina-B apresenta correlação positiva com concentração espermática, sendo observada redução de sua concentração em homens com subfertilidade (CORINNE *et al.*, 2020). Similarmente, um estudo inicial em garanhões evidenciou uma redução da inibina sérica em garanhões subfêrteis e infêrteis. No entanto, o método diagnóstico da época não possibilitava uma mensuração individual das suas diferentes isoformas (STEWART; ROSER, 1998).

Em equinos, a inibina-B apresenta concentração sérica cinco vezes superior a inibina-A e ambas apresentam variação sazonal com picos plasmáticos durante os meses mais quentes do ano. Em estudo utilizando acilina, um potente antagonista de GnRH para supressão da atividade reprodutiva, a inibina-B se mostrou um biomarcador eficaz para acompanhamento do quadro de *down regulation* em garanhões. A inibina-B apresentou redução da concentração sérica e correlacionou positivamente com o volume testicular. Ademais, após o final do tratamento observou-se aumento deste hormônio e altamente correlacionado com a recuperação do parênquima testicular (BALL *et al.*, 2019).

Por outro lado, a inibina-A não apresentou alterações durante o tratamento, indicando que esta isoforma é regulada de modo diferente. É provável que a inibina-A seja produzida pelas células de Leydig e não pelas células de Sertoli, no entanto, esse conceito ainda não está bem definido entre as espécies. Desse modo, acredita-se que a inibina-B possa ser um biomarcador a ser estudado na função testicular de garanhões (BALL *et al.*, 2019).

Hormônio anti-mulleriano (AMH)

O hormônio anti-mulleriano (AMH) é uma glicoproteína produzida pelas células de Sertoli nos testículos em resposta a liberação de FSH. As células de Sertoli fetais são as responsáveis pela produção do AMH, que induz a regressão do ductos de Muller e, portanto, impede o desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino nos machos (JOSSO *et al.*, 2006; NERY *et al.*, 2014). Em garanhões, as concentrações de AMH diminuem rapidamente durante as primeiras 2 semanas após o nascimento e são relativamente consistentes até 5 meses após o nascimento. Após os 5 meses de idade ocorre um aumento gradual nas concentrações de AMH até os 13 meses (SCARLET *et al.*, 2018).

Durante a puberdade as células de Sertoli se tornam maduras e diminuem sua proliferação (GRISPON; REY, 2010; CLAES; BALL, 2016). A maturação das células de Sertoli durante a puberdade no garanhão é acompanhada de redução da expressão de AMH e seus receptores (ALMEIDA *et al.*, 2012). Concomitantemente, as células de Leydig aumentam a produção de andrógenos, inibindo a produção de AMH (CHANG *et al.*, 2004; GRISPON; REY, 2010; CLAES; BALL, 2016). Assim, é observado um nível sérico de AMH significativamente superior em neonatos e potros pré-púbere em relação a garanhões sexualmente maduros (Fig. 2).

Em garanhões adultos, o AMH possui uma variação sazonal, com níveis inferiores durante o período reprodutivo. Ademais, descobriu-se que o AMH pode ser utilizado para verificar a presença de tecido testicular em casos com diagnóstico inconclusivo de criptorquidismo (CLAES *et al.*, 2013). Desse modo, esse hormônio se tornou um biomarcador biológico confiável no diagnóstico desta afecção congênita, já que apresenta elevada concentração plasmática em garanhões criptorquidas em relação a garanhões normais e castrados (CLAES *et al.*, 2013; CLAES *et al.*, 2014). Adicionalmente, em

tumores das células de Sertoli, ou Sertoliomas, esse hormônio também apresenta elevação significativa e tem sido utilizado como método de diagnóstico (CLAES; BALL, 2016).

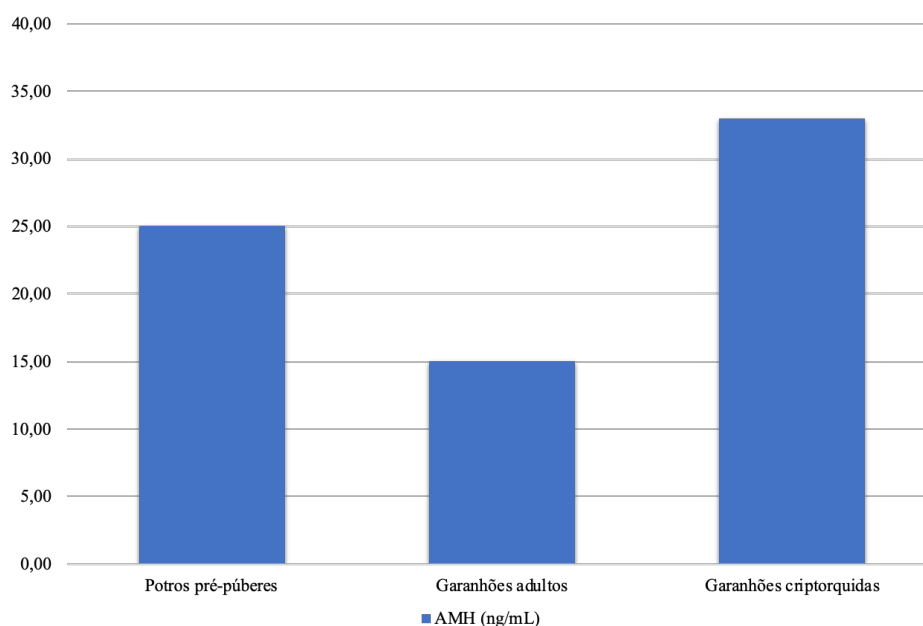


Figura 3. Concentração sérica de AMH (hormônio anti-mulleriano) em potros pré-púberes, garanhões normais e criptorquídicos bilaterais. Fonte: Adaptado de Claes et al. (2013) Theriogenology.

Recentemente, o AMH foi validado como um marcador confiável para danos testiculares causados por quimioterápicos gonadotóxicos em ratos. Os níveis séricos de AMH correlacionaram negativamente com o volume testicular, de modo que o aumento de AMH foi observado concomitantemente a redução do parênquima testicular. Após o término do tratamento, o volume testicular voltou aos parâmetros normais e os níveis de AMH retornaram à concentração basal (LEVI *et al.*, 2015). Similarmente, touros submetidos a insulação escrotal também apresentaram elevação de AMH, que retornou ao nível basal juntamente com a produção espermática (FERRER *et al.*, 2022).

Em equinos, o AMH sérico também se mostrou um biomarcador auxiliar para diagnóstico de degeneração testicular por insulto tóxico. Em pesquisa utilizando um medicamento gonadotóxico (RTI-4587-073) a concentração sérica de AMH se elevou e foi significativamente correlacionada com a redução de células germinativas e células de Sertoli. Ademais, o AMH apresentou elevação rápida após a aplicação do medicamento e redução gradual concomitante à progressiva recuperação da espermatogênese e do epitélio seminífero (POZOR *et al.*, 2018).

Desse modo, a dosagem de AMH pode ser uma alternativa promissora para detecção precoce de dano testicular após insulto tóxico. Embora mais pesquisas sejam necessárias, é provável que esse hormônio também possa ser utilizado como um biomarcador para avaliar o prognóstico e reversibilidade de um quadro clínico de degeneração testicular (POZOR *et al.*, 2018).

2.3. Aplicação de análogos de GnRH em garanhões

Downregulation refere-se à diminuição paradoxal da atividade de um órgão em resposta a estímulos constantes. A exposição contínua da glândula hipófise a elevadas concentrações constantes de GnRH, ou um potente agonista de GnRH, resulta em uma diminuição da capacidade de resposta da hipófise ao GnRH devido a uma diminuição nos receptores de GnRH disponíveis (FRASER, 1982; MOTOVAN *et al.*, 1990).

Este efeito leva a uma diminuição nas concentrações plasmáticas de LH e de FSH e, conseqüentemente, uma diminuição na produção de esteroides gonadais. Assim, em algumas espécies, o GnRH e seus agonistas podem ter um efeito inibitório direto a nível hipofisário e gonadal (HSUEH & ERICKSON, 1972; WARD *et al.*, 1989; KOPERA *et al.* 2009; JUNAIDI *et al.* 2009; GUARRACI *et al.*, 2021). No entanto, a espécie equina parece ser refratária a *downregulation* induzida pela aplicação de GnRH exógeno (MOTOVAN *et al.*, 1990; BLUE *et al.*, 1991; BRINSKO, 1998).

Em três garanhões submetidos a tratamento durante 12 meses com doses altas de um análogo de GnRH (Buserelina, 120µg) houve redução de LH, FSH, testosterona e sulfato de estrona, mas não afetou a libido e a cinética espermática. Provavelmente devido a redução de FSH circulante, ocorreu redução de 50% da produção de espermatozoides após o terceiro mês do início do tratamento. No entanto, houve retorno à produção espermática normal 4 meses após a remoção do último implante (BOYLE *et al.*, 1991).

Já o tratamento com 50 µg de um potente agonista de GnRH por 30 dias não acarretou em alteração dos parâmetros espermáticos. Os hormônios LH e FSH não foram mensurados, mas o nível de testosterona apresentou redução em um garanhão (1/3), com tendência a recuperação após o tratamento. Já nos outros dois garanhões tratados não observou-se alteração da testosterona sérica. Assim, o GnRH e seus agonistas foram considerados ineficazes para o controle da atividade sexual de garanhões (MOTOVAN *et al.*, 1990).

Diferentemente, a aplicação diária de 50 µg e 250 µg de deslorelina em garanhões (n=15) elevou os níveis séricos de LH e testosterona durante os 75 dias de tratamento em ambos os grupos tratados. O FSH plasmático também aumentou nesse animais, no entanto, observou-se elevação similar no grupo controle, indicando uma variação sazonal e não uma variação induzida pela aplicação do agonista de GnRH. Ademais, a motilidade total e o número de espermatozoides totais do ejaculado aumentaram em ambos os grupos tratados durante todo o período de tratamento, voltando aos valores pré-tratamento um mês após a última aplicação. Uma semana após o final do tratamento os níveis séricos de testosterona, LH e FSH retornaram aos valores basais (BRINSKO, 1998).

Já Sieme et al. (2004) utilizando buserelina (50 µg) duas vezes ao dia durante 6 semanas observaram aumento da integridade de membrana plasmática e acrossomal e motilidade progressiva em semen descongelado durante o período de tratamento. Embora não tenha sido realizado o perfil hormonal desses animais, os garanhões tratados apresentaram redução do número de montas e tempo de latência até a ejaculação. Todos os parâmetros avaliados retornaram aos níveis pré-tratamento 15 dias após a última aplicação.

Evans & Finley (1990) demonstraram eficácia da aplicação de GnRH no tratamento de um garanhão senil apresentando degeneração testicular progressiva. Durante o tratamento os parâmetros espermáticos, que vinham reduzindo drasticamente, se estabilizaram. Assim, embora mais estudos avaliando vias de aplicação, doses e dosagens sejam necessários, muitos resultados indicam que o tratamento não é prejudicial e poderiam atuar em casos de disfunções hipotalâmico hipofisárias. (EVANS; FINLEY, 1990; ROSER, 1995; BRINSKO, 1996; BRINSKO, 1998). Similarmente, em homens com hipogonadismo central, quando os níveis de gonadotrofinas (FSH e LH) circulantes estão baixos, preconiza-se o tratamento com GnRH para restauração da espermatogênese (DWYER *et al.*, 2015; CORONA *et al.*, 2020; IDE *et al.*, 2020).

Um aumento dos parâmetros espermáticos não foi observado em tratamentos com doses baixas (10 µg) de GnRH fornecido tanto de forma contínua (implante) quanto por aplicação diária. O LH e a testosterona não diferiram estatisticamente, embora avaliando individualmente, 4 de 5 garanhões subférteis exibiram elevação de LH sérico e, consequentemente, de testosterona, porém sem afetar as características espermáticas (BLUE *et al.*, 1991). Estudos anteriores haviam demonstrado a ineficiência da aplicação

de doses inferiores a 50 ng/kg na elevação de gonadotrofinas na circulação sanguínea de éguas (SQUIRES *et al.*, 1989) e homens (OPPERMAN *et al.*, 1987).

Por outro lado, um estudo utilizando dose mais elevada descreveu redução do comportamento agressivo de garanhões após a colocação de implante de acetato de deslorelina (4.7mg; Suprelorin®; Virbac SA, Carros, França). Foram avaliados comportamentos como cavar o chão, tentar ou escoicear o condutor e outros animais, além da atitude de empinar. A redução desses comportamentos foi correlacionada à redução dos níveis plasmáticos de testosterona, que ocorreu aproximadamente 35 após a inserção do implante em 5 de 6 garanhões avaliados (FALOMO *et al.*, 2013).

O Suprelorin® também foi usado por via subcutânea em pôneis da raça Shetland. Durante o tratamento não observou-se redução de nenhum parâmetros espermático como: cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal e fragmentação de DNA. Ademais, não houve diferença significativa dos níveis séricos de AMH e testosterona. O grupo de pôneis que recebeu dois implantes simultaneamente (9.4mg) também não exibiu alteração dos parâmetros avaliados (GAUTIER *et al.*, 2018).

Os efeitos da aplicação de buserelina (Veterelin®, Laboratorios Callier) também foram associados a uma reversão mais rápida dos danos causados pela vacinação com antagonista de GnRH (Improvac®; Zoetis, Vienna, Austria). Em geral os garanhões retornam à atividade reprodutiva normal em torno de 12 meses após a vacinação. Nesse estudo entre 9 e 12 semanas após a vacinação iniciou-se a aplicação de buserelina (4mg, BID) durante 10 semanas. Ao final do tratamento a espermatogênese e os níveis plasmáticos de testosterona já haviam retornado aos níveis pré-vacinação, embora a libido de alguns garanhões ainda estivesse baixa (GAUTIER *et al.*, 2022).

Em resumo, a terapia com GnRH e seus análogos não parece ser prejudicial aos garanhões, podendo ser benéfica para alguns animais. No entanto, essa terapia não deve ser incentivada indiscriminadamente, sendo recomendadas avaliações endócrinas e seminais em todos os candidatos ao tratamento. Avaliações sequenciais também são necessárias para monitorar o resposta dos garanhões à terapia. Ademais, a criação de um banco de dados contendo esses parâmetros melhorariam nossa capacidade de diagnosticar e selecionar garanhões que tem maiores chances de responder ao tratamento (ROSER, 1995; BRINSKO, 1996).

2. HIPÓTESES

A aplicação diária de lecorelina (50 µg) não prejudica a qualidade seminal de garanhões. Em animais com baixa produção espermática, o tratamento poderia melhorar o número de espermatozoides totais do ejaculado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- 1) Avaliação do efeito da aplicação de lecorelina na produção espermática e qualidade seminal de garanhões.
- 2) Contribuir com o entendimento dos mecanismos endócrinos do controle da reprodução em garanhões.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar o tratamento com um agonista de GnRH na supressão da liberação de FSH e LH em garanhões.
- 2) Avaliar o efeito do tratamento na função testicular, avaliando o perfil endócrino de hormônios produzidos pelas células de Leydig (testosterona e estrógeno) e pelas células de Sertoli (inibina-B e AMH).
- 3) Avaliar o efeito do tratamento com lecorelina nos parâmetros espermáticos de garanhões.
- 4) Comparar os níveis hormonais séricos de garanhões com diferentes qualidades seminais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J., CONLEY, A. J., MATHEWSON, L., BALL, B. A. Expression of anti-Müllerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p. 847-857, 2012.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 6, p.204-209, 2009.
- ALVES, M. B. R.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; OLIVEIRA, B. M. M.; TORRES, M. A.; LANÇONI, R.; RAVAGNANI, G. M.; PRADO FILHO, R. R.; VELLONE, V. S.; LOSANO, J. D. A.; FRANCI, C. R.; NICHI, M.; CELEGHINI, E. C. C. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, Los Altos, v. 86, n. 3, p. 795-805. e2, 2016.
- AMANN, R. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 2, p. 37-58, 1981.
- AMANN, R. P. Functional anatomy of the adult male. *In*: MCKINNON, A. O.; VOSS J. L (eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 645-663.
- ARIGHI, M.; BOSU, W. T. K.; RAESIDE, J. I. Hormonal diagnosis of equine cryptorchidism and histology of the retained testes. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Golden, v. 31, p. 591-602, 1986.
- ARKOUN, B.; GAUTIER, C.; DELALANDE, C.; BARRIER-BATTUT, I.; GUENON, I.; GOUX, D.; BOURAÏMA-LELONG, H. Stallion spermatozoa: putative target of estrogens; presence of the estrogen receptors ESR1, ESR2 and identification of the estrogen-membrane receptor GPER. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v.200, p.35-43, 2014.
- AURICH, C.; FERRUSOLA, C. O.; VEGA, F. J. P.; SCHRAMMEL, N.; MORCUENDE, D.; AURICH, J. Seasonal changes in the sperm fatty acid composition of Shetland pony stallions. **Theriogenology**, Los Altos, v. 107, p. 149-153, 2018.
- AURICH, C.; SIEME, H.; HOPPE, H.; SCHLOTE, S. Involvement of endogenous opioids in the regulation of LH and testosterone release in the male horse. **Journal of**

- Reproduction and Fertility**, Colchester, v. 102, n. 2, p. 327-336, 1994.
- BALL, B. A.; DAVOLLI, G. M.; ESTELLER-VICO, A.; FLEMING, B. O.; WYNN, M. A.; CONLEY, A. J. Inhibin-A and Inhibin-B in stallions: seasonal changes and changes after down-regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Theriogenology**, Los Altos, v.123, p.108-115, 2019.
- BERNDTSON, W. E.; PICKETT, B. W.; NETT, T. M. Reproductive physiology of the stallion. **Reproduction**, v. 39, n. 1, p. 115-118, 1974.
- BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Stallion management. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, Philadelphia, v. 8, n. 1, p. 205-218, 1992.
- BRINSKO, S. P. GnRH therapy for subfertile stallions. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 149-160, 1996.
- BLUE, B. J., PICKETT, B. W., SQUIRES, E. L., MCKINNON, A. O., NETT, T. M., AMANN, R. P., & SHINER, K. A. Effect of pulsatile or continuous administration of GnRH on reproductive function of stallions. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 44, p. 145-154, 1991.
- BOYLE, M. S. et al. The effects of continuous treatment of stallions with high levels of a potent GnRH analogue. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 44, p. 169-182, 1991.
- BRINSKO, S. P.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; NETT, T. M. Gonadal and pituitary responsiveness of stallions is not down-regulated by prolonged pulsatile administration of GnRH. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v.19, n.1, p.100-109, 1998.
- BLANCHARD, T.; VARNER, D.; JOHNSON, L.; ROSER, J. F.; HILL, J.; MILLER, C. Testicular and hormonal changes in stallions with thermally induced testicular degeneration. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Colchester, n. 56, p.51-59, 2000.
- BRITO, L. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 249-264, 2007.
- BURNS, P. J.; DOUGLAS, R. H. Reproductive hormone concentrations in stallions with breeding problems: case studies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 5, n. 1, p. 40-42, 1985.
- BYERS, S. W.; DOWSETT, K. F.; GLOVER, T. D. Seasonal and circadian changes of testosterone levels in the peripheral blood plasma of stallions and their relation to semen quality. **Journal of endocrinology**, v. 99, n. 1, p. 141-150, 1983.
- CHANG, C., CHEN, Y. T., YEH, S. D., XU, Q., WANG, R. S., GUILLOU, F., YEH,

- S. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 18, p. 6876-6881, 2004.
- CHEMES, H. The phagocytic function of Sertoli cells: a morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. **Endocrinology**, Baltimore, v. 119, n. 4, p. 1673-1681, 1986.
- CLAES, A. N.; BALL, B. A. Biological functions and clinical applications of anti-Müllerian hormone in stallions and mares. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, Philadelphia, v. 32, n. 3, p. 451-464, 2016.
- CLAES, A.; BALL, B. A.; ALMEIDA, J.; CORBIN, C. J.; CONLEY, A. J. Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. **Theriogenology**, Los Altos, v. 79, n. 9, p. 1229-1235, 2013.
- CLAES, A.; BALL, B. A.; CORBIN, C. J.; CONLEY, A. J. Anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for equine cryptorchidism in three cases with equivocal testosterone concentrations. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 34, n. 3, p. 442-445, 2014.
- CLAUS, R.; DIMMICK, M. A.; GIMENEZ, T.; HUDSON, L. W. Estrogens and prostaglandin F2 α in the semen and blood plasma of stallions. **Theriogenology**, Los Altos, v. 38, n. 4, p. 687-693, 1992.
- COLON, E.; ZAMAN, F.; AXELSON, M.; LARSSON, O.; CARLSSON-SKWIRUT, C.; SVECHNIKOV, K. V.; SODER, O. Insulin-like growth factor-I is an important antiapoptotic factor for rat Leydig cells during postnatal development. **Endocrinology**, Baltimore, v. 148, n. 1, p. 128-139, 2007.
- COOKE, P. S.; HOLSBERGER, D. R.; WITORSCH, R. J.; SYLVESTER, P. W.; MEREDITH, J. M.; TREINEN, K. A.; CHAPIN, R. E. Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 194, n. 3, p. 309-335, 2004.
- CHAUDHARY, J., SADLER-RIGGLEMAN, I., AGUE, J. M., & SKINNER, M. K. The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce post-mitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 5, p. 1205-1217, 2005.
- CORONA, G., GOULIS, D. G., HUHTANIEMI, I., ZITZMANN, M., TOPPARI, J., FORTI, G. SIMONI, M. European Academy of Andrology (EAA) guidelines on

investigation, treatment and monitoring of functional hypogonadism in males: Endorsing organization: European Society of Endocrinology. **Andrology**, v. 8, n. 5, p. 970-987, 2020.

COX, J. E.; REDHEAD, P. H.; DAWSON, F. E. Comparison of the measurement of plasma testosterone and plasma oestrogens for the diagnosis of cryptorchidism in the horse. **Equine Veterinary Journal**, Hoboken, v. 18, n. 3, p. 179-182, 1986.

D'OCCHIO, M. J.; FORDYCE, G.; WHYTE, T. R.; ASPDEN, W. J.; TRIGG, T. E. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 433-442, 2000.

DE ROOIJ, DIRK G. The spermatogonial stem cell niche in mammals. In: **Sertoli Cell Biology**. Academic Press, 2015. p. 99-121.

DOUGLAS, R. H.; UMPHENOUR, N. Endocrine abnormalities and hormonal therapy. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 237-249, 1992.

DHAKAL, P.; TSUNODA, N.; NAKAI, R.; KITAURA, T.; HARADA, T.; ITO, M.; NAGAOKA, K.; TOISHI, Y.; TANIYAMA, H.; WATANABE, G.; TAYA, K. Annual changes in day-length, temperature, and circulating reproductive hormones in Thoroughbred stallions and geldings. **Journal of Equine Science**, Tokyo, v. 22, n. 2, p. 29-36, 2011.

DWYER, A. A.; RAIVIO, T.; PITTELOUD, N. Gonadotrophin replacement for induction of fertility in hypogonadal men. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 91-103, 2015.

EBLING, F. J.; BROOKS, A. N.; CRONIN, A. S.; FORD, H.; KERR, J. B. Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse. **Endocrinology**, New York, v. 141, n. 8, p. 2861-2869, 2000.

EISENHAUER, K. M.; MCCUE, P. M.; NAYDEN, D. K.; OSAWA, Y.; ROSER, J. F. Localization of aromatase in equine Leydig cells. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 11, n. 3, p. 291-298, 1994.

ELLERBROCK, R. E.; CANISSO, I. F.; LIMA, F. S.; SHIPLEY, C. F.; THOMPSON JR, D. L.; CONLEY, A. J.; KLINE, K. H. Endocrine and metabolic profile of peripubertal Standardbred colts. **Theriogenology**, Los Altos, v. 117, p. 78-84, 2018.

EVANS, J. W.; FINLEY, M. GnRH therapy in a stallion of low fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 10, n. 3, p. 182-186, 1990.

- FABER, N. F.; ROSER, J. F. Testicular biopsy in stallions: diagnostic potential and effects on prospective fertility. **Journal of Reproduction Fertility Supply**. v. 56, p. 31-42, 2000.
- FALOMO, M. E.; NORMANDO, S.; ZANIBELLATO, E.; ROMAGNOLI, S. Sexual behavior and serum testosterone concentration in stallions treated with slow-release implants of deslorelin acetate. **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, New York, v. 8, n. 4, p. 278-284, 2013.
- FERRER, M. S.; PALOMARES, R. A.; HURLEY, D. J.; NORTON, N.; BULLINGTON, A. C.; HOYOS-JARAMILLO, A.; BITTAR, J. H. J. Changes in serum testosterone and anti-Müllerian hormone concentration in bulls undergoing scrotal insulation. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 78, p. 106-185, 2022.
- FRANÇA, L.R.; GARCIA, H.C. Célula de Sertoli. Em: CARVALHO, H. F.; BUZATO, B. C. Células, Editora Manole, cap.24, pág.302-325, Barueri-SP, 2005.
- FRASER, H. M. Antifertility effects of GnRH. **Reproduction**, v. 64, n. 2, p. 503-515, 1982.
- FREITAS, M. L., VIANA, J. H. M., DODE, M. A. N., MAGGIOTTO, S. R., PIVATO, I., BRAGA, T. R. C., LIM, A.P.G., DE OLIVEIRA, R. A. Seasonality does not influence cortisol or testosterone production, or seminal quality of stallions located at low latitudes. **Animal Reproduction Science**, v. 250, p. 107-202, 2023.
- GANJAM, V. K.; KENNEY, R. M. Androgens and oestrogens in normal and cryptorchid stallions. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 67-73, 1975.
- GATTI, J. L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 321-339, 2004.
- GAUTIER, C.; SCHMIDT, K.; AURICH, J.; AURICH, C. Effects of implants containing the GnRH agonist deslorelin on testosterone release and semen characteristics in Shetland stallions. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 195, p. 230-241, 2018.
- GAUTIER, C., AURICH, J., KAPS, M., OKADA, C. T., WAGNER, L. H., MELCHERT, M., AURICH, C. Re-stimulation of testicular function in GnRH-vaccinated stallions by daily GnRH agonist treatment. **Theriogenology**, v. 194, p. 27-34, 2022.
- GERLACH, T.; AURICH, J. E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 58, n. 3-4, p. 197-213, 2000.

GIRIBONI, J., GÖKDAL, Ö., EREN, V., YARALI, E., SANTIAGO-MORENO, J., UNGERFELD, R. Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 200, p.43-50, 2019.

GRINSPON, R. P.; REY, R. A. Anti-mullerian hormone and Sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. **Hormone Research in Pediatrics**, Basel, v. 73, n. 2, p. 81-92, 2010.

GUASTI, P. N.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; MAZIERO, R. R. D.; HARTWIG, F. P; MONTEIRO, G. A; LISBOA, F. P; PAPA, F. O. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 4., 2012, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: ISABR, 2012. p. 17-20.

GUIDO, C.; PERROTTA, I.; PANZA, S.; MIDDEA, E.; AVENA, P.; SANTORO, M.; MARSICO, S.; IMBROGNO, P.; ANDÒ, S.; AQUILA, S. Human sperm physiology: estrogen 471 receptor alpha (ERa) and estrogen receptor beta (ERb) influence sperm 472 metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele- 473 associated male infertility. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 226, n. 12, p. 3403-3412, 2011.

HAIDER, S. G. Cell biology of Leydig cells in the testis. **International Review of Cytology**, New York, v. 233, n. 4, p. 181-241, 2004.

HAMILTON, Mary Jo; HUGHES, Iris M.; HEGREBERG, Gerald A. Serum testosterone levels in young normal horses. **Theriogenology**, v. 22, n. 4, p. 417-421, 1984.

HESS, M. F.; ROSER, J. F. The effects of age, season and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor I concentration in stallions. **Theriogenology**, Los Altos, v. 56, n. 5, p. 723-733, 2001.

HINOJOSA, A. M.; BLOESER, J. R.; THOMSON, S. R.; WATSON, E. D. The effect of a GnRH antagonist on endocrine and seminal parameters in stallions. **Theriogenology**, Los Altos, v. 56, n. 5, p. 903-912, 2001.

HSUEH, A. J. W.; ERICKSON, G. F. (1979). Extra-pituitary inhibition of testicular function by luteinising hormone releasing hormone. **Nature**, v. 281, n. 5726, p. 66-67, 1979.

IDE, V; VANDERSCHUEREN, D; A. L. Treatment of men with central hypogonadism: Alternatives for testosterone replacement therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 21, 2020.

- JOHNSON L.; NEAVES, W. B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. **Biology of Reproduction**, New York, v. 24, n. 3, p. 703-712, 1981.
- JOHNSON, L. Efficiency of spermatogenesis. **Microscopy Research and Technique**, New York, v.32, n.5, p.385-422, 1995.
- JOHNSON, L. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. **Biology of Reproduction**, New York, v. 44, n. 2, p. 284-291, 1991.
- JOHNSON, L. Spermatogenesis. *In*: CUPPS, P. (ed.). **Reproduction in domestic animals**. New York: Academic Press, 1990. p. 173-219.
- JOHNSON, L.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCRUTCHFIELD, W. L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, Los Altos, v. 48, n.7, p.1199-1216, 1997.
- JOHNSON, L.; GRIFFIN, C. E.; MARTIN, M. T. Spermatogenesis. *In*: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. (eds.). **Equine reproduction**. 2. ed. **Chichester**: Wiley-Blackwell, 2011. p. 1026-1051.
- JOHNSON, L.; NEAVES, W. B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 24, n. 3, p. 703-712, 1981.
- JOHNSON, L.; THOMPSON JR, D. L.; VARNER, D. D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n. 1-2, p. 23-51, 2008.
- JOHNSON, L.; THOMPSON JR., D. L. Seasonal variation in the total volume of Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size. **Biology of Reproduction**, New York, v. 35, n. 4, p. 971-979, 1986.
- JOHNSON, L.; THOMPSON, D. L. Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v. 81, n. 1, p. 227-232, 1987.
- JOSSO, N., PICARD, J. Y., REY, R., DI CLEMENTE, N. Testicular anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. **Pediatric endocrinology reviews: PER**, v. 3, n. 4, p. 347-358, 2006.
- JUNAIDI, A.; WILLIAMSON, P.; MARTIN, G.; BLACKBERRY, M.; CUMMINS, J.; TRIGG, T. Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. **Reproduction in Domestic Animals**,

Berlin, v. 44, n. 5, p. 725-734, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556 p.

KOPERA, I.; TUZ, R.; HEJMEJ, A.; SCHWARZ, T.; KOCZANOWSKI, J.; BILIŃSKA, B. Immunolocalization of androgen receptor in the boar epididymis: the effect of GnRH agonist deslorelin. **Reproduction of Domestic Animal**, Berlin, v. 44, p. 266-272, 2009.

LEMAZURIER, E.; SOURDAINE, P.; NATIVELLE, C.; PLAINFOSSÉ, B.; SÉRALINI, G. E. Aromatase gene expression in the stallion. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 178, n. 1-2, p. 133-139, 2001.

LEME, D. P.; PAPA, F. O.; ROSER, J. F. Reproductive characteristics of stallions during the breeding and non-breeding season in a tropical region. **Tropical animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, n. 7, p. 1703-1707, 2012.

LEVI, M.; HASKY, N.; STEMMER, S. M.; SHALGI, R.; BEN-AHARON, I. Anti-mullerian hormone is a marker for chemotherapy-induced testicular toxicity. **Endocrinology**, New York, v. 156, n. 10, p. 3818-3827, 2015.

LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**, Los Altos, v. 50, n. 6, p. 955-972, 1998.

LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**, Los Altos, v. 50, n. 6, p. 955-972, 1998.

LOVE, C. Sperm chromatin structure assay. In: DASCANIO, J.; MCCUE, P. (eds.). **Equine reproductive procedures**. 2. ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2021. p. 629-631.

MACPHERSON, M. L.; SIMMEN, R. C.; SIMMEN, F. A.; HERNANDEZ, J.; SHEERIN, B. R.; VARNER, D. D.; LOOMIS, P.; CADARIO, M. E.; MILLER, C. D.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S.; BLANCHARD, T. L. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, New York, v. 67, p. 648 - 654, 2002.

MALPAUX, B.; MIGAUD, M.; TRICOIRE, H.; CHEMINEAU, P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. **Journal of Biology Rhythms**, Thousand Oaks, v. 16, n. 4, p. 336-347, 2001.

- MCCUE, P. M. Diagnostic endocrinology: estrogen conjugate assay. *In*: DASCANIO, J.; MCCUE, P. (eds.). **Equine reproductive procedures**. 2. ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2021. p. 653-654.
- MEACHEM, S. J.; NIESCHLAG, E.; SIMONI, M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. **European Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 145, n.5, p.561-571, 2001.
- MIETHING, A. Germ-cell death during prespermatogenesis in the testis of the golden hamster. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 267, n. 3, p. 583-590, 1992.
- MIURA, T.; MIURA, C.; OHTA, T.; NADER, M. R.; TODO, T.; YAMAUCHI, K. Estradiol-17beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 264, n. 1, p. 230-234, 1999.
- MONTOVAN, S. M., DAELS, P. P., RIVIER, J., HUGHES, J. P., STABENFELDT, G. H., & LASLEY, B. L. The effect of a potent GnRH agonist on gonadal and sexual activity in the horse. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1305-1321, 1990.
- NAFTOLIN, F.; RYAN, K. J.; PETRO, Z. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 33, n.2, p.368-370, 1971.
- NERY, S. F.; VIEIRA, M. A.; DELA CRUZ, C.; LOBACH, V. N.; DEL PUERTO, H. L.; TORRES, P. B.; ROCHA, A. L.; REIS, A. B.; REIS, F. M. Seminal plasma concentrations of Anti-Müllerian hormone and inhibin B predict motile sperm recovery from cryopreserved semen in asthenozoospermic men: a prospective cohort study. **Andrology**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 918-923, 2014.
- NEVES, J. G. S. **Influência da sazonalidade sobre a composição protéica e qualidade seminal de garanhões Mangalarga Marchador**. 2011. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011.
- NEVES, M. G. **Perfil de testosterona e parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador dentro e fora da estação reprodutiva**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Animais Domésticos; Nutrição e Alimentação Animal; Pastagens e Forragicultura)-Universidade Federal de Viçosa, 2014.
- NOBLE, G. K.; SILENCE, M. N. Technical considerations when measuring IGF-1 and IGF binding proteins in the horse. *In*: INTERNATIONAL CONFERENCE OF RACING ANALYSTS AND VETERINARIANS, 13., 2000, Cambridge, UK. **Proceedings** [...]. Newmarket, UK: R and W Publications, 2000. p. 314-320.

- NOVAK, S.; SMITH, T. A.; PARADIS, F.; BURWASH, L.; DYCK, M. K.; FOXCROFT, G. R.; DIXON, W. T. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology**, Los Altos, v. 74, n. 6, p. 956-967, 2010.
- O'DONNELL, L.; NICHOLLS, P. K.; O'BRYAN, M. K.; MCLACHLAN, R. I.; STANTON, P. G. Spermiogenesis: the process of sperm release. **Spermatogenesis**, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 14-35, 2011.
- O'DONNELL, L. Mechanisms of spermiogenesis and spermiogenesis and how they are disturbed. **Spermatogenesis**, Philadelphia, v. 4, n. 2, p. e979623, 2014.
- OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 417 - 435, 2006.
- NI, FEI-DA; HAO, SHUANG-LI; YANG, WAN-XI. Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis. **Cell death & disease**, v. 10, n. 8, p. 541, 2019.
- O'DONNELL, Liza; SMITH, Lee B.; REBOURCET, Diane. Sertoli cells as key drivers of testis function. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2022. p. 2-9.
- OPPERMANN, D., HAPP, J., & MAYR, W. R. Stimulation of spermatogenesis and biological paternity by intranasal (low dose) gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in a male with Kallmann's syndrome: intraindividual comparison of GnRH and gonadotropins for stimulation of spermatogenesis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 65, n. 5, p. 1060-1066, 1987.
- PALME, R.; SCHERZER, S.; STOLLIR, K.; NAGY, P.; SZENCI, O.; MÖSTL E. **Hormonal diagnosis of equine cryptorchidism. Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, Vienna, n.85, p. 188-191, 1998.
- PARLEVLIET, J. M.; BEVERS, M. M.; VAN DE BROEK, J.; COLENBRANDER, B. Reproduction: effect of GnRH and HCG administration on plasma LH and testosterone concentrations in normal stallions, aged stallions and stallions with lack of libido. **Veterinary Quarterly**, Dordrecht, v. 23, n. 2, p. 84-87, 2001.
- PARLEVLIET, J. M.; PEARL, C. A.; HESS, M. F.; FAMULA, T. R.; ROSER, J. F. Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. **Theriogenology**, Los Altos, v. 66, n. 4, p. 755-765, 2006.
- PEARL, C. A.; MASON, H.; ROSER, J. F. Immunolocalization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri-and post-pubertal

stallion testis. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 125, n. 1-4, p. 103-111, 2011.

ORTIZ-RODRIGUEZ, J. M.; ANEL-LOPEZ, L.; MARTÍN-MUÑOZ, P.; ÁLVAREZ, M.; GAITSKELL-PHILLIPS, G.; ANEL, L.; FERRUSOLA, C. O. Pulse Doppler ultrasound as a tool for the diagnosis of chronic testicular dysfunction in stallions. **PloS One**, v. 12, n. 5, p. 175878, 2017.

PENTIKAINEN, V.; ERKKILA, K.; SUOMALAINEN, L.; PARVINEN, M.; DUNKEL, L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 5, p. 2057-2067, 2000.

POZOR, M.; CONLEY, A. J.; ROSER, J. F.; NOLIN, M.; ZAMBRANO, G. L.; RUNYON, S. P.; KELLEMAN, A. A.; MACPHERSON, M. L. Anti-Müllerian hormone as a biomarker for acute testicular degeneration caused by toxic insults to stallion testes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 116, p. 95-102, 2018.

RAESIDE, J. I. The isolation of estrone sulfate and estradiol-17 β sulfate from stallion testes. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 47, n. 8, p. 811-815, 1969.

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

RAMIRES-NETO, C.; MONTEIRO, G. A.; DELFIOL, D. J. Z.; FARRAS, M. C.; DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. The relationships between scrotal surface temperature, age and sperm quality in stallions. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 157, n. 1, p. 358-363, 2013.

RIZZOTO, G.; FERREIRA, J. C. P.; CODOGNOTO, V. M.; OLIVEIRA, K. C.; GARCÍA, H. M.; PUPULIM, A. G. R.; TEIXEIRA-NETO, F. J.; CASTILHO, A.; NUNES, S. G.; THUNDATHIL, J. C.; KASTELIC, J. P. Testicular hyperthermia reduces testosterone concentrations and alters gene expression in testes of Nelore bulls. **Theriogenology**, Los Altos, v. 152, p. 64-68, 2020.

ROBERTS, K. P.; ZIRKIN, B. R. Androgen regulation of spermatogenesis in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 637, n. 1, p. 90-106, 1991.

ROBERTSON, D. M.; CAHIR, N.; FINDLAY, J. K.; BURGER, H. G.; GROOME, N. The biological and immunological characterization of inhibin A and B forms in human follicular fluid and plasma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 82, n. 3, p. 889-896, 1997.

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

ROSER, J. F. Endocrine profiles in fertile, subfertile, and infertile stallions: testicular response to human chorionic gonadotropin in infertile stallions. *In*: SHARP, D. C.; BAZER, I. W. **Equine reproduction**. Madison: Society for the Study of Reproduction, 1995.p.661-669.

PETRICCA, S., FLATI, V., CELENZA, G., DI GREGORIO, J., LIZZI, A. R., LUZI, C., IORIO, R. Tebuconazole and econazole act synergistically in mediating mitochondrial stress, energy imbalance, and sequential activation of autophagy and apoptosis in mouse Sertoli TM4 cells: possible role of AMPK/ULK1 axis. **Toxicological Sciences**, v. 169, n. 1, p. 209-223, 2019.

ROSER, J. F. Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 179-196, 2008.

SCARLET, D., WULF, M., KUHLE, J., KÖHNE, M., ILLE, N., CONLEY, A. J., AURICH, C. Anti-Müllerian hormone profiling in prepubertal horses and its relationship with gonadal function. **Theriogenology**, v. 117, p. 72-77, 2018.

SEAMANS, M. C.; ROSER, J. F.; LINFORD, R. L.; LIU, I. K.; HUGHES, J. P. Gonadotropin and steroid concentrations in jugular and testicular venous plasma in stallions before and after GnRH injection. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, Cambridge, v. 44, p. 57-67, 1991.

SHARMA, O. P. Diurnal variations of plasma testosterone in stallions. **Biology of reproduction**, v. 15, n. 2, p. 158-162, 1976.

SHARP, D. C.; CLEAVER, B. D. Melatonin. *In*: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (eds.). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993. p. 100-108.

SHARPE, R. M.; COOGAN, D. G.; COOPER, I. Factors determining whether the direct effects of an LHRH agonist on Leydig cell function in vivo are stimulatory or inhibitory. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, n. 32, p. 57-71, 1983.

SIEME, H.; TROEDSSON, M. H. T.; WEINRICH, S.; KLUG, E. Influence of exogenous GnRH on sexual behavior and frozen/thawed semen viability in stallions during the non-breeding season. **Theriogenology**, Los Altos, v. 61, n. 1, p. 159-171, 2004.

SIPAHUTAR, H.; SOURDAINE, P.; MOSLEMI, S.; PLAINFOSSÉ, B.; SÉRALINI, G. E. Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Baltimore, v. 51, n. 3, p. 311-318, 2003.

- SÖDERSTEN, P. Estrogen-activated sexual behavior in male rats. **Hormones and Behavior**, New York, v. 4, n. 3, p. 247-256, 1973.
- STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. Secretion of an FSH inhibiting factor by cultured Sertoli cells. **Endocrinology**, Baltimore, v. 99, n. 3, p. 918-921, 1976.
- STEWART, B. L.; ROSER, J. F. Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations in stallions. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 15, n. 2, p. 129-139, 1998.
- STEWART, B. L.; ROSER, J. F. Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations in stallions. **Domestic Animals Endocrinology**, Stoneham, v. 15, n. 2, p. 129-139, 1998.
- STOUT, T. A. Modulating reproductive activity in stallions: a review. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1-4, p. 93-103, 2005.
- SQUIRES, E. L., ROWLEY, H. R.; NETT, T. M. Comparison of pulsatile versus constant release of GnRH for superovulation in mares. In **Am. Soc. Anim. Sci. Suppl** v. 1, n. 67, p.391-392,1989.
- THOMPSON JR., D. L.; HONEY, P. G. Active immunization of prepubertal colts against estrogens: hormonal and testicular responses after puberty. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 59, n. 1, p. 189-196, 1984.
- RUSSEL, L. D.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell. 1 ed. 1993. 801 pag.
- RUSSELL, L. D., REN, H. P., HIKIM, I. S., SCHULZE, W., & HIKIM, A. P. S. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. **American Journal of Anatomy**, v. 188, n. 1, p. 21-30, 1990.
- SHIMA, Y., MIYABAYASHI, K., HARAGUCHI, S., ARAKAWA, T., OTAKE, H., BABA, T., MOROHASHI, K. I. Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. **Molecular endocrinology**, v. 27, n. 1, p. 63-73, 2013.
- SHORT, M. L., HUANG, D., MILKOWSKI, D. M., SHORT, S., KUNSTMAN, K., SOONG, C. J., JUNGSMANN, R. A. Analysis of the rat lactate dehydrogenase A subunit gene promoter/regulatory region. **Biochemical Journal**, v. 304, n. 2, p. 391-398, 1994.
- SINCLAIR, ANDREW H. et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, v. 346, n. 6281, p. 240-244, 1990.

SUN, T., XIN, Z., JIN, Z., WU, Y. & GONG, Y. Effect of TGF- β /Smad signaling on sertoli cell and possible mechanism related to complete sertoli cell-only syndrome. **Mol. Cell. Biochem.** 319, 1–7 (2008).

THOMPSON JR., D. L.; PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L.; NETT, T. M. Effect of testosterone and estradiol-17 β administration to geldings: sexual behavior, seminal characteristics and accessory sex gland weights. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 51, n. 6, p. 1358-1366, 1980.

WANG, F.; HAN, D. Sertoli cell phagocytosis: an essential event for spermatogenesis. *In*: WU, W.; ZIGLIOLI, F.; MAESTRONI, U. (eds.). **Male reproductive health**. London:Intech Open; p. 69-84, 2020.

XIONG, W.; WANG, H.; WU, H.; CHEN, Y.; HAN, D. Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. **Reproduction**, Bristol, v. 137, n. 3, p. 469, 2009.

YAMAMOTO, M.; HIBI, H.; KATSUNO, S.; MIYAKE, K. Serum estradiol levels in normal men and men with idiopathic infertility. **International Journal of Urology**, Tokyo, v.2, n.1, p.44-46, 1995.

ZIRKIN, B. R.; AWONIYI, C.; GRISWOLD, M. D.; RUSSELL, L. D.; SHARPE, R. Is FSH required for adult spermatogenesis? **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 15, n. 4, p. 273-276, 1994.

WALKER, William H.; CHENG, Jing. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, v. 130, n. 1, p. 15-28, 2005.

WILLEMS, A., DE GENDT, K., ALLEMEERSCH, J., SMITH, L. B., WELSH, M., SWINNEN, J. V., & VERHOEVEN, G. Early effects of Sertoli cell-selective androgen receptor ablation on testicular gene expression. **International journal of andrology**, v. 33, n. 3, p. 507-517, 2010.

CAPÍTULO 02



ARTIGO I**PERFIL HORMONAL E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE GARANHÕES
TRATADOS COM LECIRELINA**

^aDepartamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

*Corresponding author. Tel.: +55 34 99927-2204.

E-mail address: frederico.papa@unesp.br (F.O. PAPA).

¹ Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2016

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da aplicação de lecorelina na qualidade espermática e funcionalidade testicular. Os garanhões foram divididos em grupos controle (GC, n=3), fértil (GF, n=4) e subfértil (GSF, n=4). Os GF e GSF receberam doses diárias de lecorelina (50 µg;im) durante 60 dias e foram avaliados por mais 60 dias. A resposta testicular endócrina foi mensurada pelos níveis séricos de inibina-B, AMH, sulfato de estrona, testosterona, LH e FSH. Os níveis séricos de AMH, inibina-B e sulfato de estrona não alteraram com o tratamento, mas a testosterona sérica diminuiu entre as semanas 6 e 16 ($P<0,05$) no GSF. O LH reduziu nos grupos GF e GSF após a semana 1 ($P<0,001$) enquanto o FSH não apresentou alteração significativa. O número de espermatozoides totais no GF aumentou em 50% na semana 4 e se mantiveram altos até o final da avaliação. Um garanhão subfértil aumentou em 100% o número de espermatozoides totais após a semana 4, apresentando queda após o final do tratamento. O potencial de membrana mitocondrial, a estabilidade de membrana plasmática e a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aumentaram uma semana após o início do tratamento ($P<0,001$), retornando aos valores pré-tratamento 60 dias após o fim da aplicação no GF. Já a peroxidação lipídica, produção do ânion superóxido ($\cdot O_2$) e integridade de membrana plasmática e acrossomal (MPAI) não apresentaram alterações no GF, porém o GC apresentou queda da MPAI e aumento da produção de $\cdot O_2$ e H_2O_2 . A MP reduziu nos grupos GF e GC e o RAP no GC. Em conclusão, embora o tratamento tenha ocasionado queda da testosterona sérica, outros hormônios indicadores da funcionalidade testicular não foram afetados. O aumento da produção espermática, da MMS e da MMP demonstram que o tratamento pode ser interessante em determinados casos de subfertilidade.

Palavras-chave: GnRH, subfertilidade, inibina-B, AMH, testosterona.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the effect of lecorelin application on sperm quality and testicular function. The stallions were divided into control (GC, n=3), fertile (GF, n=4) and subfertile (GSF, n=4) groups. The GF and GSF received daily lecorelin (50 µg;im) for 60 days and were evaluated for another 60 days. Endocrine testicular response was assessed by serum levels of inhibin-B, AMH, estrone sulfate, testosterone, LH and FSH. Serum levels of AMH, inhibin-B, and estrone sulfate did not change over time whereas serum testosterone decreased between weeks 0 and 6 ($P<0.05$) in the GSF. LH dropped in the GF and GSF groups after week 1 ($P<0.001$) while FSH showed no significant change. The total sperm number in the GF increased by 50% at week 4 and remained high until the end of the experiment. One subfertile stallion also increased the total sperm number after week 4. Mitochondrial membrane potential, plasma membrane stability and hydrogen peroxide (H_2O_2) production increased one week after the beginning of treatment ($P<0.001$), returning to pre-treatment values 60 days at week 16 in the FG. Lipid peroxidation, production of superoxide anion ($\cdot O_2$) and integrity of the plasmatic and acrosomal membrane (MPAI) did not change in the GF, but the GC showed a decrease in MPAI and an increase in the production of $\cdot O_2$ and H_2O_2 . Progressive motility decreased in the GF and GC groups and the RAP in the GC. In conclusion, although the treatment caused a decline in serum testosterone, other indicators of testicular functionality were not affected. The increase in sperm production, membrane stability and higher mitochondrial potential showed that the treatment can be interesting in certain cases of subfertility.

Keywords: GnRH, subfertility, inhibin-B, AMH, testosterone.

1. Introdução

A subfertilidade em garanhões continua sendo um problema na otimização do manejo reprodutivo e na obtenção de maiores taxas de prenhez, sendo difícil a aplicação de estratégias terapêuticas. As abordagens incluem melhorar a qualidade do sêmen usando várias biotecnologias, como centrifugação com gradientes de densidade [1-3] ou buscar aumentar a produção e a qualidade espermática com tratamentos hormonais [4-9].

As terapias endócrinas têm como alvo o eixo hipotálamo-hipófise-testicular, porém com resultados variáveis, em parte devido às diferenças nos hormônios usados, doses e dosagens. Por exemplo, o tratamento principal envolve o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) que atua na hipófise, causando a liberação de FSH e LH e, conseqüentemente, estimula a espermatogênese [4-6, 9-13].

Os resultados desse tratamento são variáveis e, embora altas doses para fins contraceptivos (120µg-50mg) tenham mostrado resultados controversos, doses terapêuticas de GnRH (10-50µg) parecem não causar regulação negativa do eixo nem perturbação da espermatogênese em garanhões normais [5, 9, 14]. No entanto, a maioria dos estudos não avaliaram a regulação negativa dos receptores de GnRH. Em outras espécies, a aplicação exógena de GnRH tem sido associada à dessensibilização de seus receptores em ratos [15, 16], suínos [17] e cães [18], causando redução drástica de FSH, LH e conseqüentemente, da espermatogênese.

No entanto, estudos em garanhões não mostraram alterações na libido, nos parâmetros espermáticos e nos níveis de testosterona durante o tratamento com GnRH [10; 5; 13]. De fato, a aplicação intramuscular diária de buserelina (50 µg) melhorou o comportamento sexual e a qualidade espermática, embora o perfil hormonal não tenha sido mensurado [9].

Alguns relatos utilizando garanhões subfêrteis mostraram um aumento na produção diária de espermatozoides e na cinética espermática após terapia exógena com GnRH [4, 7, 14]. Assim, em equinos, embora a aplicação exógena de GnRH pareça causar dessensibilização dos receptores hipofisários, a produção de testosterona parece permanecer normal e é suficiente para manter a espermatogênese [13, 14]. Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil hormonal sérico, a cinética e a viabilidade espermática de garanhões tratados diariamente com lecirelina, um análogo de GnRH.

2. Material e Métodos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Campus de Botucatu, São Paulo, sob o número de protocolo CEUA 0070/2022.

2.1. Delineamento experimental

Os animais do grupo fértil receberam uma dose diária de lecirelina (50 µg, intramuscular) durante 60 dias e foram avaliados por mais 60 dias após o término do tratamento. Amostras de sêmen e soro sanguíneo foram coletadas semanalmente durante o tratamento e, quinzenalmente, após o fim do tratamento.

Experimento 01

Foram utilizados garanhões, entre 6 e 18 anos de idade, de diferentes raças (Quarto de Milha, Mangalarga Paulista, Mangalarga Marchador e Crioulo), saudáveis, com boa condição corporal, mantidos em regime intensivo de criação, com água e suplementação mineral *ad libitum*.

O experimento foi conduzido durante os meses de primavera e verão e os garanhões alojados no Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)—UNESP—Botucatu, São Paulo (SP). Os animais foram selecionados com base no histórico de fertilidade, exame andrológico completo e exame complementar de ultrassonografia de testículos, escroto, pênis e glândulas anexas.

Os garanhões foram divididos em grupo controle (n=3) e tratado (n=4). Tinham acima de 70% de MT e 30% de MP e concentração mínima de 2 milhões.

- Tópico LH challenge

Para avaliar a resposta ao tratamento, foram coletadas amostras de soro sanguíneo às 0, 6, 12h e 24h após a primeira aplicação de lecirelina.

Experimento 02

Foram selecionados quatro garanhões subférteis da raça Quarto de Milha (8-22 anos) e o experimento conduzido durante os meses de primavera e verão em criatório particular localizado em Bauru, São Paulo. A subfertilidade foi baseada no histórico de $\leq 20\%$ de taxa de concepção com sêmen fresco e resfriado e avaliação dos parâmetros espermáticos. Os garanhões considerados subférteis apresentavam baixa qualidade espermática ou baixo número de espermatozoides totais. Os animais foram tratados com uma dose diária de lecorelina (50 μg , intramuscular) por 60 dias e as amostras de sêmen e de soro sanguíneo foram coletadas quinzenalmente até 60 dias após o término do tratamento.

2.2. Colheita e análise do sêmen

Previamente ao experimento, foram realizadas três coletas seminais a cada 48 horas com o objetivo de esgotar o reservatório espermático da cauda do epidídimo. Após esse período os garanhões foram submetidos a colheita seminal em manequim duas vezes por semana por meio de vagina artificial modelo Botucatu[®] (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) até o final do experimento.

Imediatamente após a colheita, o volume seminal foi aferido em uma proveta graduada de 100 ml após a retirada da fração gel por um filtro de nylon. Para a obtenção da concentração espermática foi realizada a diluição de 10 μL de sêmen *in natura* em 190 μL de água destilada (diluição 1:20) e feita a leitura em uma câmera de Neubauer espelhada sob um microscópio de contraste de fase (Jenamed 2 Zeiss, CarlZeiss[®], Munique, Alemanha) com ampliação de 200x. O sêmen *in natura* foi diluído (BotuSpecial[®], Botupharma LTDA) até a concentração final de 50 $\times 10^6$ milhões de espermatozoides/ml.

A cinética espermática foi avaliada pelo método de CASA (Computer Assisted Semen Analysis), utilizando o sistema HTR-IVOS-10 (Hamilton Thorne Research – Animal Version 12,0 L, EUA), previamente ajustado para o sêmen de garanhão conforme descrito (Tabela suplementar 01). As variáveis analisadas foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%) e número de espermatozoides rápidos (%).

2.3. Avaliação hormonal

As concentrações séricas de inibina B, AMH e sulfato de estrona foram determinadas pelo método de ELISA, e a testosterona determinada por Radioimunoensaio, conforme relatado anteriormente por Davolli et al. (2016) [19]. As concentrações séricas de inibina-B foram determinadas com um Kit comercial de ELISA (AL-161:Equine-canine-rodent inhibin-A ELISA e AL-163:Equine-caninerodent inhibin-B ELISA; Ansh Laboratories; Webster, TX) previamente validado para equinos (Conley et al., 2018). O AMH foi mensurado usando um imunoensaio enzimático (Active AMH-ELISA; Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e previamente validado para amostras equinas por Ball et al. (2008) [20]. As concentrações de sulfato de estrona foram quantificadas (em duplicata) usando um anticorpo E1S (522-2, UC Davis) [21]. Os coeficiente de variação intra e inter-ensaio permaneceram abaixo de 10% em todas as amostras analisadas.

No experimento 01 o LH sérico foi mensurado em kit de ELISA (Active LH-ELISA; Laboratories, Webster, State, USA) conforme as recomendações do fabricante.

No experimento 02 as concentrações séricas de LH e FSH foram determinadas por radioimunoensaio pelo anticorpo duplo heterólogo conforme descrito por Roser & Hughes (1991) [22]. FSH e LH equinos altamente purificados (e265B; H. Papkoff, Univ. Califórnia, Davis, CA) foram usados para padronização e iodação. Utilizou-se um anti-LHp bovino de camundongo (monoclonal anticorpo, 518B7) e um anti-FSH ovino de coelho (H47; H. Papkoff, Univ. Califórnia, Davis, CA). As amostras foram analisadas em um único ensaio e o coeficiente de variação intraensaio foi inferior a 5%.

2.4. Avaliação morfofuncional por citometria de fluxo

Para a avaliação espermática por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers de excitação: azul 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm (FITC, YOPRO e C11-BODYPY) e 695/40nm (Iodeto de propídio e MitoSOX Red); vermelho 640-nm, 40 mW com filtro 660/20 nm (MitoStatus Red); e o violeta 405-nm, 100 mW, com o filtro 450/50 nm (Hoechst). No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1.

As amostras foram então diluídas em TALP-PVA, segundo Parrish et al. (1988) [23] modificado: 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄, 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10,0 mM Hepes-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil-PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 5×10^6 espermatozoide/mL, suplementado com Hoescht 33342 (7µM; 145333, Sigma) para a eliminação dos debris.

Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossômica, foi utilizada a associação de iodeto de propídio (IP) e FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína), de acordo com Freitas-Dell'Aqua (2012) [24]. Assim, em uma amostra de 200 µL de sêmen diluído foram adicionados 1,5 µM de IP e 2 ng de FITC-PSA e as amostras incubadas durante 15 min a 37 °C, ao abrigo da luz.

Para avaliação da desestabilização de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e produção de superóxido (O₂•-) na matriz mitocondrial, foi utilizada a associação de YOPRO (YP; marcação para célula com membrana plasmática desestabilizada), MitoStatus Red (MST; potencial mitocondrial) e MitoSOX™ Red (MSR; geração de ânion superóxido na matriz mitocondrial), de acordo com Freitas-Dell'Aqua et al. (2018) [25]. Assim, em uma amostra de 500 µL de sêmen diluído foram adicionados 25 nM YP, 20 µM de MST e 2 µM de MSR, seguido por incubação a 37°C por 20 minutos.

Para a avaliação de geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado a associação de iodeto de propídio e CM-H₂DCFDA (C6827, Life Technologies). Assim, em uma amostra de 500 µL de sêmen diluído foram adicionados 1.5 µM PI and 1 µM CM-H₂DCFDA. As amostras foram incubadas por 20 minutos a 37°C.

Para a peroxidação lipídica, foi utilizado protocolo de acordo com Guasti et al. (2012) [26], utilizando a sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes). Assim, em 500 µL de sêmen diluído em TALP-PVA foram adicionados 5 µM de C11-BODIPY581/591, seguido por incubação por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, foram realizadas 2 lavagens consecutivas por centrifugação a 300g por 5 minutos, com TALP-PVA e o pellet resuspendido em 300 µL de TALP-PVA.

2.5. Biópsia Testicular

Os animais do Exp. 01 foram sedados com cloridrato de detomidina na dose de 0,02 mg/Kg IV (Dormiun V[®], Agener União Saúde Animal, São Paulo, SP/Brasil) e mantidos em posição quadrupedal. Foi realizada antissepsia da região escrotal com degermante polivinilpirrolidona iodo e álcool 70%, anestesia local com 1 ml de lidocaína (Lidovet[®], Laboratório Bravet Ltda, Engenho Novo, RJ/Brasil) e após 5 minutos a biópsia foi realizada utilizando uma agulha Tru-CUT de calibre 16 (UNIT Comércio, Importação e Exportação Ltda, São Paulo, Brasil), como descrito anteriormente por Faber e Roser (2000) [27]. Foram coletadas amostras teciduais de cada testículo nas semanas 0, 4, 8 e 16 dos animais dos grupos fértil e controle.

2.6. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa SigmaStat[®] 3.5. Os parâmetros avaliados foram analisados dentro de cada momento pelo teste t (Student), dentro de cada grupo foi feita a análise de medidas repetidas no tempo (One-way repeated measures) e a interação tempo – grupo. Quando houve significância ($P < 0.05$) realizou-se teste Tukey.

3. Resultados

Experimento 01

Os níveis séricos de testosterona, sulfato de estrona, inibina-B e hormônio anti-mulleriano não variaram significativamente em nenhuma semana de avaliação em ambos os grupos experimentais (Fig. 01).

O hormônio LH aumentou após a primeira aplicação de lecirelina, atingindo o pico de concentração plasmática com 6h ($P < 0,001$) e retornando aos níveis basais com 24 horas. Porém, o LH reduziu ($P < 0,001$) após a primeira semana de tratamento, retornando aos níveis basais na semana 16 no grupo tratado. Já o grupo controle manteve constante o LH sérico no primeiro dia de aplicação, mas exibiu grande oscilação nas concentrações séricas ao longo das semanas, com valores significativamente inferiores nas semanas 1, 2, 7 e 12 (Fig. 02).

Em todos os garanhões do grupo fértil ocorreu elevação numérica de aproximadamente 50% no número de espermatozoides totais após 4 semanas de

tratamento até o final do experimento, enquanto no grupo controle não foi observada variação considerável (Fig. 03).

A integridade de membrana plasmática e acrossomal (Tabela 1) assim como a peroxidação lipídica (Tabela 2) e a produção de ânion superóxido (Tabela 3) não diferiram ao longo das semanas no grupo tratado. No entanto, a estabilidade, o potencial de membrana mitocondrial e a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aumentaram no grupo tratado já na semana 01 e retornaram aos valores pré-tratamento na semana 16 ($P<0.01$) conforme ilustrado pelas tabelas 4, 5 e 6 respectivamente.

O grupo controle apresentou redução da integridade de membrana plasmática e acrossomal ($P<0.027$), da estabilidade ($P<0.023$), do potencial de membrana mitocondrial ($P<0.04$) e da produção de H_2O_2 ($P<0.01$).

A motilidade total não apresentou diferença estatística (Tabela 7), enquanto a motilidade progressiva reduziu ao longo das semanas em ambos os grupos (Tabela 8). Já o número de espermatozoides rápidos apresentou diminuição ao longo do tempo apenas no grupo controle (Tabelas 9).

Experimento 02

Não ocorreu redução do FSH sérico, porém houve redução do LH sérico da semana 01 ($P>0.001$) até o final do experimento. A testosterona sérica diferiu nas semanas 06 e 16 ($P>0.033$) enquanto as concentrações de sulfato de estrona, inibina-B e AMH não exibiram variação significativa (Tabela 10).

A motilidade total e progressiva, o número de espermatozoides rápidos e a integridade de membrana plasmática e acrossomal não apresentaram alteração significativa durante o período de avaliação (Tabela 11).

Um garanhão subfértil (1/4) aumentou em 100% o número total de espermatozoides após 30 dias de tratamento. Já após o tratamento o animal manteve 40% acima a produção espermática em relação aos valores pré-tratamento (Fig. 04).

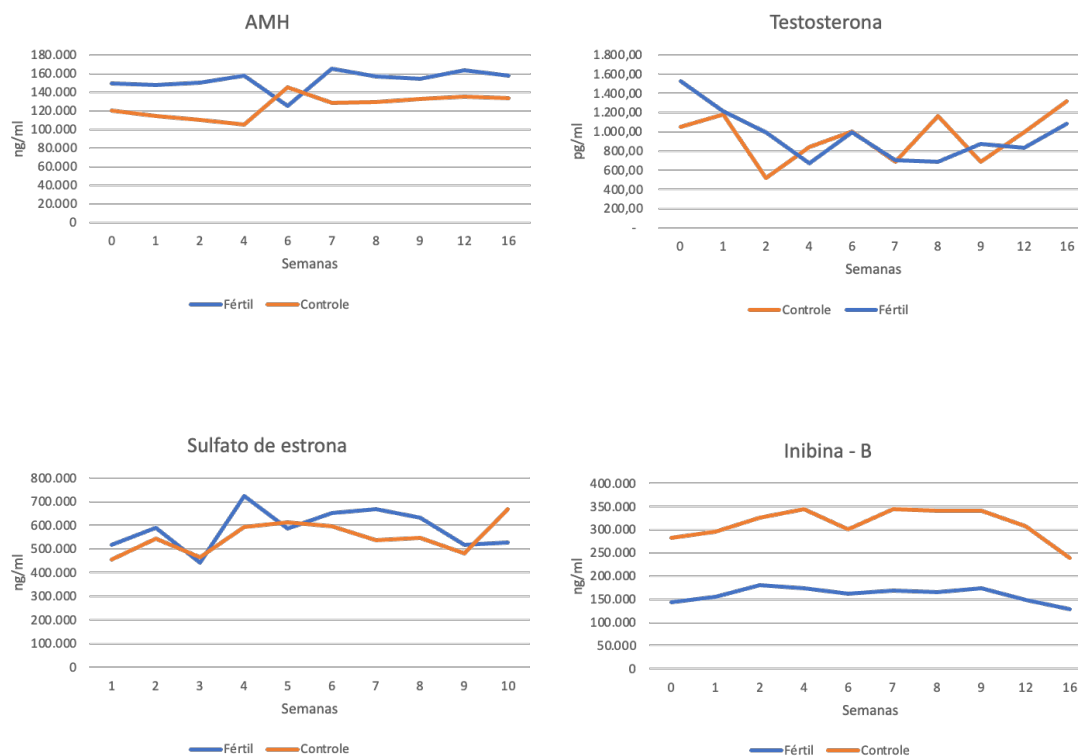


Figura 01. Níveis séricos de hormônio anti-mulleriano (AMH), testosterona, sulfato de estrona e inibina-B em garanhões tratados (Grupo tratado) com lecirelina e garanhões que não receberam nenhum tratamento (Grupo controle) durante 16 semanas de avaliação.

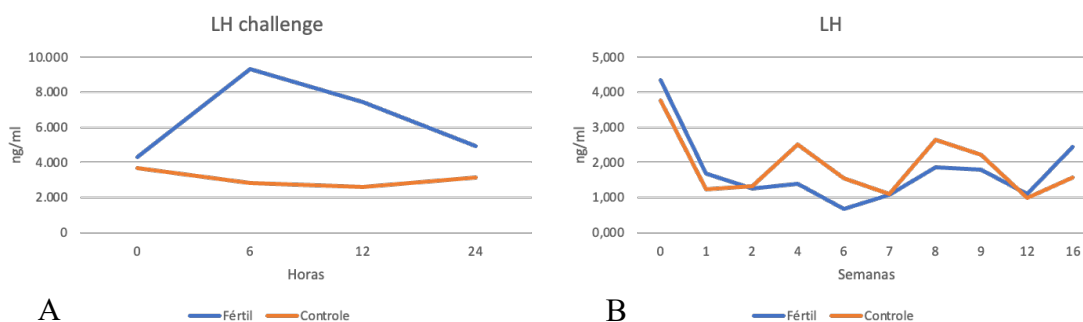


Figura 02. Nível sérico de LH durante as primeiras 24 horas (A), e ao longo das 16 semanas de avaliação (B), nos animais que receberam a aplicação de lecirelina (grupo fértil) e nos animais que não receberam nenhum tratamento (grupo controle).

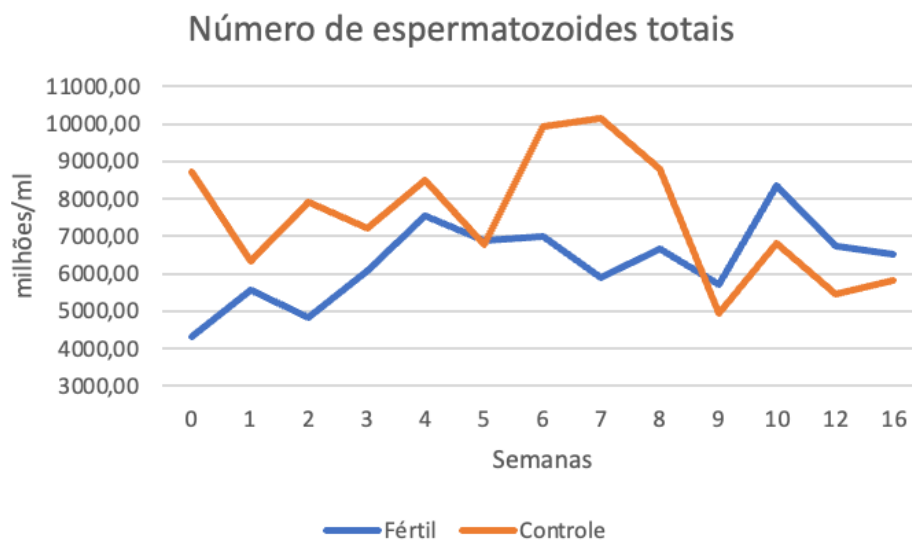


Figura 03. Número de espermatozoides totais (milhões/ml) de garanhões tratados com lecirelina (Grupo Fértil, n=4) e garanhões que não receberam nenhum tratamento (Grupo Controle, n=3).

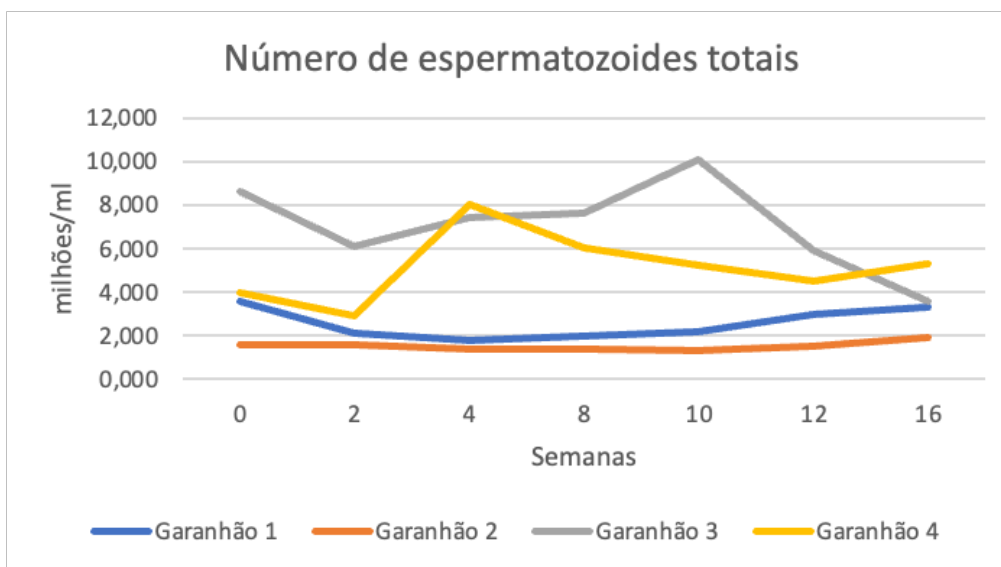


Figura 04. Número de espermatozoides totais do ejaculado de quatro garanhões subférteis tratados com lecirelina.

Tabela 1. Média e desvio padrão da integridade de membrana plasmática e acrossomal de garanhões dos grupos fértil e controle.

Grupos	Semanas										P
	0	1	2	4	6	7	8	9	12	16	
Fértil	74,6 ± 7,6	82,2 ± 2,98	79 ± 5,9	77,3 ± 7,9	79,25 ± 4,5	80 ± 6,3	80 ± 3,7	80,3 ± 6,3	76 ± 5,8	75,8 ± 3	0,699
Control	87,3 ± 6,1a	78,7 ± 10ab	78,2 ± 6,1ab	79,6 ± 13,8ab	80,7 ± 12,8ab	66 ± 15,5b	72,4 ± 22,3ab	73,43 ± 18,28ab	75,1 ± 10,35ab	84,3 ± 4,55ab	0,027
P	0,063	0,532	0,865	0,790	0,839	0,158	0,521	0,503	0,892	0,071	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (P>0,05) pelo Teste de Tukey.

Tabela 2. Média e desvio padrão da peroxidação lipídica de garanhões dos grupos fértil e controle.

Groups	Semanas										P
	0	1	2	4	6	7	8	9	12	16	
Treated	900,7 ± 216,4	744 ± 159,6	932,7 ± 248,6	845,2 ± 142	899 ± 245,7	1069 ± 131,5	1082 ± 150,6	975,7 ± 275	923,7 ± 124	883,2 ± 52,4	0,306
Control	1096 ± 244,5	866 ± 50,5	821 ± 89,5	996 ± 101,4	1104 ± 211,8	1130 ± 72,5	1186 ± 118	860 ± 9,5	988 ± 49,1	909,6 ± 183	0,050
P	0,313	0,265	0,500	0,181	0,301	0,523	0,371	0,511	0,443	0,782	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (P>0,05) pelo Teste de Tukey.

Tabela 3. Média e desvio padrão da ânion superóxido de garanhões dos grupos fértil e controle.

Groups	Semanas										P
	0	1	2	4	6	7	8	9	12	16	
Treated	31,3 ± 7,5A	28,9 ± 2,8	25,4 ± 7,8	28,5 ± 7	30,9 ± 1,4	38,8 ± 16	27,1 ± 5,7	28 ± 7,3	26 ± 1,1	45,5 ± 19	0,169
Control	13,8 ± 7B	27,2 ± 8,7	29,6 ± 5,2	22,5 ± 3,3	26,5 ± 3,6	33 ± 16,2	29,3 ± 18	29,3 ± 14,8	26,7 ± 12	19,5 ± 3,7	0,056
P	0,026	0,719	0,469	0,240	0,073	0,683	0,828	0,885	0,995	0,084	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (P>0,05) pelo Teste de Tukey.

Tabela 4. Média e desvio padrão da estabilidade de membrana plasmática e acrossomal do ejaculado de garanhões dos grupos fértil e controle.

Groups	Semanas										P
	0	1	2	4	6	7	8	9	12	16	
Treated	40,8 ± 8,6aA	61 ± 3,3ab	66,7 ± 6,6ab	71,2 ± 6,9b	66,7 ± 1,9 ab	70 ± 3,3b	70 ± 5,9 ab	69,7 ± 7,7 ab	70,7 ± 1,2 ab	50,6 ± 14,9aA	<0,001
Control	65,3 ± 15,9abB	56,9 ± 10,8a	59,4 ± 7,3ab	78,6 ± 3,9b	70,4 ± 3,8ab	66,5 ± 16,9ab	68,9 ± 18,2ab	69,2 ± 15,2 ab	69,5 ± 12ab	79 ± 4,5bB	0,023
P	0,0045	0,490	0,224	0,165	0,154	0,743	0,911	0,962	0,847	0,026	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (P>0,05) pelo Teste de Tukey.

Tabela 5. Média e desvio padrão da potencial de membrana mitocondrial do ejaculado de garanhões dos grupos fértil e controle.

Grupos	Semanas										P
	0	1	2	4	6	7	8	9	12	16	
Fértil	45,77 ± 10Aa	61,4 ± 3,7 b	68,2 ± 7,5 b	71,5 ± 7,2 b	67,6 ± 2,9 b	67,6 ± 4,3 b	70 ± 4,6 b	70,5 ± 7,8 b	71,2 ± 1,8 b	53,8 ± 13,1 Aab	<0,001
Control	75 ± 36 Bab	58,7 ± 11,5a	63,5 ± 6,1ab	79 ± 4,5b	71,7 ± 3,5ab	68,2 ± 16,8ab	69,5 ± 17,9 ab	69,46 ± 14,2ab	69,33 ± 10,98ab	77,6 ± 5,15Bb	0,014
P	0,010	0,673	0,420	0,181	0,150	0,953	0,920	0,906	0,735	0,043	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (P>0,05) pelo Teste de Tukey.

Tabela 6. Média e desvio padrão da geração de peróxido de hidrogênio do ejaculado de garanhões dos grupos fértil e controle.

Grupos	Semanas										P
	0	1	2	4	6	7	8	9	12	16	
Fértil	343 ± 64,4 de	224,2 ± 39,6 e	582,2 ± 35abc	496 ± 71,9bcd	441 ± 51,7 bcd	653,5 ± 125ab	598,5 ± 108,6abc	411 ± 85,9 e	359,2 ± 65,6 de	680,2 ± 110,7a	<0,001
Control	451,3 ± 59 c	493,6 ± 74,7 bc	747,3 ± 275,9ab	587,3 ± 77,5abc	483 ± 29,5 bc	839,3 ± 87a	603,6 ± 88,8abc	448,6 ± 63 c	435 ± 55 c	609,3 ± 76,5 abc	<0,001
P	0,026	0,719	0,469	0,240	0,073	0,683	0,828	0,885	0,995	0,084	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (P>0,05) pelo Teste de Tukey.

Tabela 7. Média e desvio padrão da motilidade espermática total (%) de garanhões dos grupos fértil e controle.

Grupos	Semanas												P
	0	1	2	3	4	5	6	8	9	10	12	16	
Fértil	86,3 ± 8,4	90,0 ± 3,5	87,2 ± 5,8	86,0 ± 6,0	87,6 ± 5,7	86,0 ± 9,8	81,9 ± 14,9	85,2 ± 5,0	83,2 ± 13,8	84,0 ± 5,9	83,2 ± 8,4	87,8 ± 4,0	0,060
Controle	88,2 ± 2,4	89,8 ± 1,0	87,3 ± 1,2	85,7 ± 5,7	84,3 ± 6,1	86,3 ± 3,0	78,3 ± 3,8	79,7 ± 9,5	77,3 ± 6,6	75,3 ± 13,2	79,7 ± 6,6	85,7 ± 5,0	0,050
P	0,625	0,940	0,982	0,944	0,495	0,958	0,710	0,435	0,530	0,287	0,571	0,751	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (P>0,05) pelo Teste de Tukey.

Tabela 8. Média e desvio padrão da motilidade espermática progressiva (%) de garanhões dos grupos fértil e controle.

Grupos	Semanas												P
	0	1	2	3	4	5	6	8	9	10	12	16	
Fértil	55,4 ± 8,2ab	56,9 ± 5,8a	56,9 ± 7a	47,5 ± 10,8abcd	49,9 ± 12,6abc	47,2 ± 5,2abcd	46,1 ± 15,6abcd	45,0 ± 7,4cd	45,2 ± 8,5abcd	41,6 ± 8,3bcd	33,2 ± 9,7d	38,2 ± 17,8cd	<0,001
Control	39,3 ± 11,8	36,7 ± 14,0	39 ± 18,4	38,3 ± 10,8	42,3 ± 12,5	33,3 ± 12,2	35,7 ± 14,0	29,3 ± 6,0 b	37,7 ± 13,6	25,3 ± 5,0	25,7 ± 5,5	33,0 ± 10,4	0,018
P	0,084	0,045	0,128	0,316	0,468	0,091	0,403	0,260	0,403	0,031	0,286	0,391	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (P>0,05) pelo Teste de Tukey.

Tabela 9. Média e desvio padrão do número de espermatozoides rápidos (%) de garanhões dos grupos fértil e controle.

Grupos	Semanas												P
	0	1	2	3	4	5	6	8	9	10	12	16	
Fértil	77,0 ± 9,5	82,5 ± 3,5	83,6 ± 2,5	82,5 ± 5,8	83,2 ± 5,6	80,5 ± 9,2	76,2 ± 15,1	77,2 ± 5,6	76,8 ± 13,2	79,1 ± 4,2	78,8 ± 7,9	82,5 ± 4,0	0,721
Controle	81,5 ± 2,8ab	86,3 ± 2,1a	82,3 ± 1,2ab	79,0 ± 5,6	79,7 ± 6,5ab	82,3 ± 4,7ab	72,7 ± 4,5ab	70,3 ± 14,6ab	70,7 ± 9,1ab	68,0 ± 14,5b	75,3 ± 6,1ab	80,0 ± 6,0ab	0,007
P	0,475	0,163	0,418	0,458	0,469	0,768	0,713	0,487	0,527	0,195	0,563	0,485	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (P>0,05) pelo Teste de Tukey.

Tabela 10. Média e desvio padrão dos níveis séricos de FSH, LH, testosterona, sulfato de estrona, inibina-B e AMH de garanhões subférteis tratados com lecirelina durante 8 semanas e avaliados por mais 8 semanas.

Hormônios	Semanas								P
	0	2	4	6	8	10	12	16	
FSH	24,95 ± 10.024	24,32 ± 16.33	23,94 ± 14.95	18,70 ± 11.57	19,78 ± 9.13	16,76 ± 8.65	19,43 ± 9.05	20,03 ± 11.1	0,556
LH	14,05 ± 4.71a	7,95 ± 4.76 b	5,61 ± 3.63 b	4,33 ± 3.33 b	3,89 ± 4.76 b	3,16 ± 2.11 b	3,90 ± 2.14 b	6,40 ± 5.69 b	0,001
Testosterona	666,88 ± 249,0 ab	539,85 ± 211,906 ab	478,6 ± 223,606 ab	302,3 ± 54.62 b	554,05 ± 365,15 ab	442,23 ± 201,6 ab	468,75 ± 362,78 ab	977,13 ± 586 a	0,033
Sulfato de estrona	231,90 ± 98,7	165,13 ± 79,99	175,88 ± 93.98	182,10 ± 95,16	211,93 ± 132,42	153,28 ± 84,25	191,6 ± 121,7	162,38 ± 67,92	0,189
Inibina-B	68,50 ± 41,85	70,85 ± 39,76	69,28 ± 50,57	85,38 ± 63,95	97,85 ± 71,71	79,35 ± 53,07	78,20 ± 56,02	66,08 ± 46,68	0,068
AMH	36,11 ± 21,99	38,18 ± 22,9	37,21 ± 22,09	36,96 ± 22,97	37,29 ± 23,59	35,14 ± 23,68	40,05 ± 27,6	42,19 ± 34,29	0,543

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Tabela 11. Média e desvio padrão dos parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva, número de espermatozoides rápidos, integridade de membrana plasmática e acrossomal, defeitos espermáticos totais e número de espermatozoides totais de garanhões subférteis tratados com lecirelina durante 8 semanas e avaliados por mais 8 semanas.

Parâmetros espermáticos	Semanas								P
	0	2	4	6	8	10	12	16	
MT (%)	51,0 ± 15,3	54,8 ± 5,7	52,8 ± 17,8	50,0 ± 11	57,2 ± 16,1	65,5 ± 8,6	59,0 ± 10,1	51,0 ± 15,3	0,455
MP (%)	29,0 ± 14,4	22,0 ± 6,4	28,2 ± 13,3	18,2 ± 3,1	25,0 ± 10,0	32,2 ± 12,5	21,8 ± 9,9	29,0 ± 14,4	0,099
RAP (%)	42,2 ± 17,8	42,8 ± 2,6	43,2 ± 17,8	39,0 ± 6,0	47,8 ± 18,9	57,2 ± 10,6	45,0 ± 13,9	42,2 ± 17,8	0,348
Nº sptz totais (x10⁶/ml)	3840,0 ± 3300,7	2701,2 ± 1115,8	4468,2 ± 3357,5	4825,0 ± 2474	4391,5 ± 3277,4	4781,2 ± 3953,7	2697,8 ± 1275,9	2978 ± 1938,8	0,275

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

4. Discussão

A administração de lecorelina no primeiro dia de tratamento resultou em um aumento inicial na concentração sérica de LH. Como esperado, o LH atingiu o pico plasmático 6 horas após a administração de lecorelina e voltou ao nível basal após 24h. Esses resultados indicam uma bioatividade do análogo de GnRH utilizado no presente estudo.

Esses resultados diferem do implante de liberação lenta de GnRH, que demonstrou diminuir gradualmente o LH para valores pré-tratamento apenas 5 dias após a inserção do implante [11]. Esses achados sugerem que a administração diária de análogo de GnRH permite que os níveis séricos de LH diminuam ciclicamente. No entanto, no presente estudo embora a aplicação diária não tenha reduzido o FSH, ocorreu supressão de LH, que permaneceu mais baixo durante todo o período do estudo no grupo subfértil e até a semana 16 no grupo fértil.

Um estudo anterior relatou diminuição significativa de LH e FSH apenas após 3 meses de tratamento e utilizando uma dose alta de GnRH (120 µg) para fins contraceptivos [11]. Já doses mais baixas de GnRH (10 µg) não apresentaram efeito sobre os níveis de FSH e LH [5]. Outro estudo com implante de deslorelina (4,7 mg) realizou um desafio de hCG e sugeriu uma *down regulation* dos receptores de GnRH, apesar de FSH e LH não terem sido mensurados [13]. Esses achados podem indicar uma resposta dose dependente para induzir a *down regulation* dos receptores de GnRH e, consequentemente, a redução da liberação de LH e FSH.

O hormônio luteinizante estimula as células de Leydig a produzir testosterona, um importante hormônio envolvido na espermatogênese e no comportamento sexual masculino. Os presentes achados não demonstraram alteração em ganhões férteis tratados e ganhões controle, apenas o grupo subfértil apresentou queda na 6ª semana em relação à última semana de avaliação. Falomo e colaboradores (2013) [12] usando implante de liberação lenta de deslorelina (4,7 mg) também observaram um declínio na testosterona sérica, porém associado a diminuição no comportamento sexual.

Apesar da redução da testosterona no grupo subfértil, nenhuma alteração na libido foi observada no presente estudo. Vários estudos também relataram não observar

mudanças na libido e nos parâmetros seminais após a terapia com GnRH em garanhões normais. De fato, Sieme (2004) [9] usando a mesma dose e frequência do presente estudo (50 µg) observou um aumento na libido, mas a testosterona não foi mensurada.

Ademais, doses elevadas de GnRH (50 mg) para fins contraceptivos não mostraram alterações nos parâmetros da libido e do sêmen [10]. Assim, é presumível que a diminuição do nível de testosterona plasmática não tenha sido suficiente para afetar o comportamento sexual dos garanhões. Também é importante ressaltar que tanto o hormônio testosterona quanto o hormônio LH sofrem interferência do ciclo circadiano [28] e podem ter oscilado de acordo com o momento do dia em que as amostras de sangue foram coletadas. Esse padrão pulsátil de liberação de LH explicaria a oscilação dos níveis plasmáticos de nos garanhões do grupo controle.

Ao contrário do LH e da testosterona, a manutenção dos níveis de FSH evidencia uma provável manutenção da funcionalidade das células de Sertoli, que tem um papel crucial na espermatogênese. As células de Sertoli são estimuladas pelo FSH e sintetizam AMH e Inibina-B, hormônios que alguns estudos têm sugerido como bons biomarcadores para a funcionalidade das células de Sertoli [29-32]. No presente estudo ambos os hormônios não foram afetados pela terapia com GnRH, indicando uma atividade normal destas células durante o tratamento.

De fato, as células de Sertoli parecem ser estimuladas pela administração de GnRH, pois no presente estudo o número de espermatozoides totais aumentou em porcentagem no grupo fértil após 30 dias de tratamento. Estudos demonstraram que a testosterona e o FSH inibem a apoptose das células germinativas [33, 34] assim, o aumento de FSH e testosterona decorrentes da aplicação de lecorelina, resultaria em maior estímulo nas células de Sertoli e Leydig, com consequente redução do processo de apoptose. Desse modo, apesar do ciclo da espermatogênese em equinos ser de aproximadamente 8 semanas [35, 36], uma redução na apoptose das células germinativas durante a espermiogênese poderia ter elevado o número total de espermatozoides do ejaculado.

Conforme esperado, no presente estudo os garanhões subférteis apresentaram resultados variáveis no número de espermatozoides totais. No garanhão subfértil 4 observou-se elevação da produção espermática, mesmo apresentando LH baixo. Estudos

anteriores indicam que embora o GnRH cause supressão dos receptores a nível cerebral, a testosterona é suficiente para manter a espermatogênese em equinos [9, 13, 14].

Os garanhões subférteis 1, 2 e 4 já tinham mais de 18 anos de idade e a senilidade é uma causa conhecida de degeneração testicular idiopática, especialmente em garanhões acima de 15 anos [37]. A senilidade interfere no funcionamento das espermatogônias e no ambiente testicular, reduzindo as reservas funcionais das células germinativas [38, 39]. Mudanças na expressão de alguns genes em espermatogônias senis afetam vias essenciais ligadas a respostas a danos no DNA, estresse oxidativo e atividade mitótica [40]. Desse modo, a terapia hormonal pode não ter sido eficaz no garanhão subfértil 1 por este já apresentar alterações do microambiente testicular.

Similarmente, o garanhão subfértil 3, embora com apenas 8 anos de idade, não apresentou melhora dos parâmetros espermáticos após o tratamento com lecirelina. Esse animal possuía um aumento de volume da cabeça do epidídimo esquerdo e hipercogenicidade ao exame de ultrassonografia, achados similares foram observados em animais acometidos por granuloma espermático [5, 41-45]. Infelizmente não foi possível realizar uma biópsia para confirmar a suspeita clínica.

Casos de granuloma espermático geralmente apresentam baixa qualidade espermática e presença de grande quantidade de cabeças isoladas no ejaculado, evidenciando um impacto negativo na espermatogênese [41, 43]. Quadro semelhante foi observado nesse garanhão, evidenciando um comprometimento da função testicular. Resultado similar foi observado em bovinos, no qual o uso de análogo de GnRH não melhorou a qualidade seminal de touros subférteis [46], demonstrando que o tratamento com GnRH não é eficiente em todos os processos que reduzem a qualidade seminal.

No entanto, Evans & Finley (1990) [4] notaram estabilização da qualidade seminal, após o tratamento com análogo de GnRH, em um garanhão de 18 anos diagnosticado com degeneração testicular. É interessante que mesmo com discreta melhoria da qualidade seminal, o garanhão que vinha progressivamente reduzindo sua fertilidade, estabilizou os parâmetros espermáticos com o tratamento. Contrariamente, Blue et al. (1991) [5] utilizando um agonista de GnRH em baixa dose diária (10 µg) não observaram mudanças na biometria testicular, número total de espermatozoides e motilidade progressiva em garanhões férteis e subférteis.

Já Sieme et al. (2004) [9] utilizando a dose de 50 µg observaram um aumento na motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática. Apesar de nossos achados não terem mostrado diferença estatística na integridade da membrana, observou-se aumento numérico de espermatozoides com membrana íntegra ao longo das semanas no grupo fértil. Ademais, a estabilidade da membrana e o potencial mitocondrial melhoraram ao longo do tempo ($P < 0,05$). Esses resultados indicam uma melhora na atividade metabólica dos espermatozoides de garanhões tratados com GnRH.

Está bem estabelecido que uma alta atividade mitocondrial no espermatozoide equino correlaciona positivamente com a motilidade e fertilidade [47, 48]. Além disso, o estresse oxidativo tem sido associado à fertilidade [49], pois os espermatozoides equinos dependem principalmente da fosforilação oxidativa para a síntese de ATP e, como resultado, liberam um grande número de ROS [48, 50, 51]. Assim, o aumento na produção de H_2O_2 evidenciados no presente estudo sugerem uma melhora no metabolismo espermático mitocondrial, semelhante a achados anteriores que demonstraram níveis elevados de ROS em espermatozoides de garanhões férteis [48, 52].

Além disso, a membrana plasmática do espermatozoide equino possui altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados que os predispõem ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica [53, 54]. Assim, uma alta peroxidação lipídica afeta diretamente a função mitocondrial e o movimento flagelar, culminando na perda da integridade de membrana e da motilidade espermática [55, 56]. No presente estudo não foram observadas alterações na peroxidação lipídica no grupo fértil tratado ($P > 0,05$), sugerindo que os fatores antioxidantes protetores presentes nesses ejaculados foram capazes de neutralizar as quantidades extras de ROS produzidas durante o tratamento.

Por outro lado, o grupo controle apresentou piora da qualidade espermática durante o período experimental. É provável que a realização de repetidas biópsias pode ter afetado negativamente esses parâmetros de forma transitória. O garanhão 1 do grupo controle apresentou queda notória da qualidade seminal já após a primeira biópsia, com tendência a recuperação, porém com nova queda após a semana 9. Já do grupo fértil um garanhão após a biópsia testicular apresentou um pequeno hematoma no local e redução da qualidade seminal nas semanas subsequentes.

Resultado semelhante foi encontrado por DelVento et al. (1992) [57], em que 8 de 9 garanhões apresentaram hemorragia da túnica albugínea e inflamação moderada. Assim, a biópsia testicular não é um exame de rotina devido ao seu potencial risco ao testículo embora alguns autores têm relatado a biópsia testicular como uma técnica segura e sem prejuízos a qualidade seminal [27, 58].

Os garanhões do grupo subfértil não foram submetidos à biópsia testicular devido ao seu risco em potencial ao testículo. Mesmo assim, o tratamento com o análogo de GnRH não resultou em melhora da qualidade espermática.

Em homens, acredita-se que a subfertilidade e infertilidade idiopática é causada em sua maioria por alterações testiculares e não hipotalâmicas ou hipofisárias. A alta produção de FSH e LH em homens oligospermicos indica uma incompetência das células de Leydig e dos túbulos seminíferos na inibição desses hormônios e, consequente, hipersecreção de gonadotrofinas na tentativa de manter o funcionamento normal da reprodução [59]. Assim, em homens com hipogonadismo central, quando os níveis de gonadotrofinas (FSH e LH) circulantes estão baixos, preconiza-se o tratamento com GnRH para restauração da espermatogênese [60,61].

Os garanhões subférteis do presente estudo apresentavam níveis de FSH e LH elevados (24 e 14 ng/ml, respectivamente), porém sem redução do nível de sulfato de estrona sérico (231 ng/ml). Os níveis de FSH e LH observados em garanhões férteis são em média 5.5 e 3.5 ng/ml, respectivamente [10, 11, 62, 63]. Embora alguns estudos mostrem níveis séricos entre 18-33 e 43-52 ng/ml em garanhões férteis [14, 64]. Desse modo, a reposição hormonal não seria o tratamento indicado os animais deste estudo, já que em garanhões, recomenda-se que terapias com GnRH sejam realizadas em animais com baixos níveis de LH e FSH séricos [62]. Ademais, garanhões com grau de degeneração testicular muito avançado dificilmente respondem a qualquer terapia [7].

Concluimos que a aplicação de lecirelina não causou redução da qualidade seminal em garanhões normais e subférteis. Essa terapia hormonal apresenta uma resposta individual, a depender da etiologia da subfertilidade que acomete o animal. Dessa forma, o aumento da produção espermática, da estabilidade e potencial de membrana mitocondrial demonstram que o tratamento pode ser aconselhável em determinados casos de subfertilidade.

Agradecimentos

Agradecemos aos funcionários, Felipe e Edvaldo, e aos residentes do programa de Reprodução Animal de 2020/2021, especialmente Larissa, Maiara e Juliana, pela ajuda nas colheitas de sêmen e nos cuidados com os animais. Processo nº 2019/01119-8 e 2022/03405-0, Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Supplementary Table 1. CASA settings for analysis of stallion semen. [on-line version only]

Features	Setting
Image capture (frames/s)	60 Hz
Image capture (no. frames)	45
Cell detection (minimum contrast)	80
Cell detection (minimum cell size)	5 pixels
Defaults (cell size)	5 pixels
Defaults (cell intensity)	70
Progressive cells (VAP)	70 $\mu\text{m/s}$
Progressive cells (STR)	80%
Slow cells (static: VAP cutoff)	30 $\mu\text{m/s}$
Slow cells (static: VSL cutoff)	20 $\mu\text{m/s}$
Illumination: intensity	2,100
Illumination: photometer	50
Video source (dark field)	60 Hz
Static intensity gates (min and max)	0.48 and 1.45
Static elongation gates (min and max)	0 and 97
Chamber-type	Makler ¹
Temperature	38° C
Field selection	Automatic

VAP average path velocity $\mu\text{m/s}$, VSL velocity straight line $\mu\text{m/s}$; STR straight %

¹Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA (chamber depth 10.0 μm , stage position 14.3 mm)

REFERÊNCIAS

- [1] Varner DD., Love CC, Blanchard TL, Bliss SB, Carrol BS, Macpherson ML. (2010). Breeding-management strategies and semen-handling techniques for stallions—case scenarios. *Proc 56th Ann Conv Amer Assoc Equine Pract*, 56, 215-26.
- [2] Alvarenga MA, Papa FO, Neto CR. (2016). Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 32(3), 521-530.
- [3] Morrell JM, Dalin, AM, & Rodriguez-Martinez H. (2018). Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Animal Reproduction (AR)*, 5(3), 121-126.
- [4] Evans W, Finley M. GnRH therapy in a stallion of low fertility. *Journal of Equine Veterinary Science* 1990;10:182-186.
- [5] Blue, BJ., Pickett, BW., Squires, EL., McKinnon, AO., Nett, TM., Amann, RP, Shiner KA. (1991). Effect of pulsatile or continuous administration of GnRH on reproductive function of stallions. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 44, 145-154.
- [6] Shiner KA, Pickett BW, Juergens TD, Nett TM. Clinical approach to diagnosis and treatment of subfertile stallions: opinions. 39th Annual Convention Proceedings.
- [7] Brinsko SP. GnRH therapy for subfertile stallions. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1996;12:149-160.
- [8] Hinojosa AM, Bloeser JR, Thomson SR, Watson ED. The effect of a GnRH antagonist on endocrine and seminal parameters in stallions. *Theriogenology* 2001;56:903–912.
- [9] Sieme H, Troedsson MHT, Weinrich S, Klug E. Influence of exogenous GnRH on sexual behavior and frozen/thawed semen viability in stallions during the non-breeding season. *Theriogenology* 2004;61:159-171.
- [10] Montovan SM, Daels PP, Rivier J, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Lasley BL. The effect of a potent GnRH agonist on gonadal and sexual activity in the horse. *Theriogenology* 1990;33:1305-1321.
- [11] Boyle MS, Skidmore J, Zhang J, Cox JE. The effects of continuous treatment of stallions with high levels of a potent GnRH analogue. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 1991;44:169-182.
- [12] Falomo ME, Normando S, Zanibellato E, Romagnoli S. Sexual behavior and serum testosterone concentration in stallions treated with slow-release implants of deslorelin

acetate. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, New York 2013;8:278-284.

[13] Gautier C, Schmidt K, Aurich J, Aurich C. Effects of implants containing the GnRH agonist deslorelin on testosterone release and semen characteristics in Shetland stallions. *Animal reproduction science*, 2018.

[14] Brinsko SP, Squires EL, Pickett BW, Nett TM. Gonadal and pituitary responsiveness of stallions is not down-regulated by prolonged pulsatile administration of GnRH. *Journal of andrology* 1998;19:100-109.

[15] Ward JA, Furr BJ, Valcaccia B, Curry B, Bardin CW, Gunsalus GL, Morris ID. Prolonged suppression of rat testis function by a depot formulation of Zoladex,[®] a GnRH agonist. *Journal of andrology* 1989;10:478-486.

[16] Guarraci FA., Davis LK, Henneman EL, Toro E, Odell SE, Le N, Gore AC. Daily GnRH agonist treatment delays the development of reproductive physiology and behavior in male rats. *Hormones and behavior* 2021;132:104-182.

[17] Kopera I, Tuz R, Hejmej A, Schwarz T, Koczanowski J, Bilińska B. Immunolocalization of androgen receptor in the boar epididymis: the effect of GnRH agonist deslorelin. *Reproduction of Domestic Animal* 2009;44:266–272.

[18] Junaidi A, Williamson P, Martin G, Blackberry M, Cummins J, Trigg T. Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. *Reprod. Domest. Anim* 2009;44:725–734.

[19] Davolli GM, Ball BA, Esteller-Vico A, Claes AN, Canisso IF, Fedorka CE, et al. Reversible downregulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in stallions with a novel GnRH antagonist. *Theriogenology* 2016;86:2272e80.

[20] Ball BA, Conley AJ, Grundy SA, Sabeur K, & Liu IKM. Expression of anti-Müllerian hormone (AMH) in the equine testis. *Theriogenology* 2008;69(5), 624-631.

[21] Stabenfeldt GH, Daels PF, Munro CJ, Kindahl H, Hughes JP, Lasley B. An oestrogen conjugate enzyme immunoassay for monitoring pregnancy in the mare: limitations of the assay between days 40 and 70 of gestation. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement* 1991;44, 37-44.

[22] Roser JF, Hughes JP. (1991). Prolonged pulsatile administration of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to fertile stallions. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 44, 155-168.

[23] Parrish J. Susko-Parrish MA, Winer NL. First, Capacitation of Bovine Sperm by Heparin1, *Biol. Reprod.* 38 (1988) 1171–1180.

- [24] Freitas-Dell'aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'Aqua Jr JA, Papa FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Anim Reprod* 2012;9:941.
- [25] Freitas-Dell'Aqua CP, Guasti PN, Papa FO, Canisso IF, Dell'Aqua Jr JA. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen despite high mitochondrial potential. *J Equine Vet Scie* 2018;66.
- [26] Guasti PN, Freitas-Dell'aqua CP, Maziero RRD, Monteiro GA, Hartwig FP, Lisboa FP, Papa FO. (2012). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide from subfertile stallion spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Reproduction, Fertility and Development* 2012; 25:157-157.
- [27] Faber NF, Roser JF. Testicular biopsy in stallions: diagnostic potential and effects on prospective fertility. *Journal of reproduction and fertility* 2000;56:31-42.
- [28] Byers SW, Dowsett KF, Glover TD. Seasonal and circadian changes of testosterone levels in the peripheral blood plasma of stallions and their relation to semen quality. *Journal of endocrinology* 1983; 99:141-150.
- [29] Claes A, Ball BA, Almeida J, Corbin CJ, Conley AJ. Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. *Theriogenology* 2013; 79:1229-1235.
- [30] Claes A, Ball BA, Corbin CJ, Conley AJ. Anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for equine cryptorchidism in three cases with equivocal testosterone concentrations. *Journal of Equine Veterinary Science* 2014; 34(3):442-445.
- [31] Pozor M, Conley, A. J.; Roser, J. F.; Nolin, M.; Zambrano GL, Runyon SP, Kelleman AA, Macpherson ML. Anti-Müllerian hormone as a biomarker for acute testicular degeneration caused by toxic insults to stallion testes. *Theriogenolog* 2018;116:95-102.
- [32] Ball BA, Davolli GM, Esteller-Vico A, Fleming, BO, Wynn MA.; Conley AJ. Inhibin-A and Inhibin-B in stallions: seasonal changes and changes after down-regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Theriogenology* 2019;123:108-115.
- [33] Russell LD, Clermont Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *The Anatomical Record* 1977;187:347-365.
- [34] Dunkel L, Hirvonen V, Erkkilä K. Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death & Differentiation* 1997;4:171-179.

- [35] Johnson L, Blanchard TL, Varner DD, Scrutchfield WL. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*, Los Altos 1997;48:1199-1216.
- [36] Johnson L, Griffin CE, Martin MT. Spermatogenesis. In: McKinnon AO, Squires, EL, Vaala WE, Varner DD. editors. *Equine reproduction*. 2. ed. **Chichester**: Wiley-Blackwell; 2011, p. 1026-1051.
- [37] Turner M. Declining testicular function in the aging stallion: management options and future therapies. *Animal reproduction science* 2019;207:171-179.
- [38] Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW, Brinster RL. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development* 2009;136:1191–1199.
- [39] Schmidt JA, Abramowitz, LK, Kubota H, Wu X, Niu Z, Avarbock MR. In vivo and in vitro aging is detrimental to mouse spermatogonial stem cell function. *Biol. Reprod* 2011;84:698–706.
- [40] Paul C, Nagano M, Robaire B. Aging results in molecular changes in an enriched population of undifferentiated rat spermatogonia. *Biology of Reprod* 2013;89: 147, 1-10.
- [41] Held JP, Prater P, Toal RL, Blackford JT, McCracken M. Sperm granuloma in a stallion. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1989;194:267-268.
- [42] Karaca F, Aksoy M, Kaya A, Ataman MB, Tekeli T. Spermatic granuloma in the ram: diagnosis by ultrasonography and semen characteristics. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 1999;40:402-406.
- [43] Pozor MA, Garncarz M. Bilateral epididymal nodules in a stallion. *Equine Veterinary Education* 2006;18:63-66.
- [44] Muranaka M, Katayama Y, Niwa H. Sperm granuloma in a racehorse. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 2009;62:785-787.
- [45] Podico G, Lago-Alvarez Y, Carossino M, Ferrer MS, Arnold CE, Canisso IF. Epididymal Sperm Granuloma and Antisperm Antibodies in Donkeys. *Journal of Equine Vet Sci* 2021;101:103450.
- [46] Romanello, N, Botta D, Giro A, Moura ABB, Pantoja MHA, Barreto AN, Garcia AR. Effect of GnRH on scrotal surface temperature, testicular volume and sperm parameters of bulls with poor semen quality. *Anim. Reprod* 2018;15:459.
- [47] Ferrusola CO, Fernandez LG, Sandoval CS, Garcia BM, Martinez HR, Tapia JA, Pena FJ. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2010; 74:458–465.

- [48] Gibb, Z., Lambourne, S. R., & Aitken, R. J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biology of reproduction* 2014;91(3), 77-1.
- [49] Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand* 2008; 50.
- [50] Davila, M. P., Muñoz, P. M., Bolaños, J. G., Stout, T. A. E., Gadella, B. M., Tapia, J. A., ... & Peña, F. J. Mitochondrial ATP is required for the maintenance of membrane integrity in stallion spermatozoa, whereas motility requires both glycolysis and oxidative phosphorylation. *Reproduction* 2016;152(6), 683-694.
- [51] Gaitskell-Phillips, G., Martín-Cano, F. E., Ortiz-Rodríguez, J. M., Silva-Rodríguez, A., da Silva-Álvarez, E., Rojo-Domínguez, P., ... & Peña, F. J. Proteins involved in mitochondrial metabolic functions and fertilization predominate in stallions with better motility. *Journal of Proteomics* 2021;247, 104335.
- [52] Yeste, M., Estrada, E., Rocha, L. G., Marín, H., Rodríguez-Gil, J. E., & Miró, J. (2015). Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, 3(2), 395-407.
- [53] Koppers, A. J., Garg, M. L., & Aitken, R. J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free radical biology and medicine* 2010;48(1), 112-119.
- [54] Balao da Silva, C. M., Macías-García, B., Miró-Morán, A., González-Fernández, L., Morillo-Rodriguez, A., Ortega-Ferrusola, C., ... & Peña, F. J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *Journal of pineal research* 2011;51(2), 172-179.
- [55] Aitken, R. J., Whiting, S., De Iuliis, G. N., McClymont, S., Mitchell, L. A., & Baker, M. A. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287(39), 33048-33060.
- [56] Moazamian, R., Polhemus, A., Connaughton, H., Fraser, B., Whiting, S., Gharagozloo, P., & Aitken, R. J. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *MHR: Basic science of reproductive medicine* 2015;21(6), 502-515.

- [57] DelVento VR, Amann RP, Trotter GW, Veeramachaneni DN, Squires EL. Ultrasonographic and quantitative histologic assessment of sequelae to testicular biopsy in stallions. *American journal of veterinary research* 1992;53:2094-2101.
- [58] Rode, K., Sieme, H., Otzen, H., Schwennen, C., Lüpke, M., Richterich, P., ... & Brehm, R. Effects of repeated testicular biopsies in adult warmblood stallions and their diagnostic potential. *Journal of Equine Veterinary Science* 2016; 38, 33-47.
- [59] Bain J, Moskowitz JP, Clapp JJ. LH and FSH response to gonadotropin releasing hormone (GnRH) in normospermic, oligospermic and azospermic men. *Archives of Andrology* 1978;1:147-152.
- [60] Corona G, Goulis DG, Huhtaniemi I, Zitzmann M, Toppari J, Forti G, Simoni M. European Academy of Andrology (EAA) guidelines on investigation, treatment and monitoring of functional hypogonadism in males: Endorsing organization: European Society of Endocrinology. *Andrology* 2020; 8(5), 970-987.
- [61] Ide V, Vanderschueren D, Antonio L. Treatment of men with central hypogonadism: Alternatives for testosterone replacement therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;22(1), 21.
- [62] Roser JF. Endocrine profiles in fertile, subfertile, and infertile stallions: testicular response to human chorionic gonadotropin in infertile stallions. *Biology of Reproduction* 1995; 52:661-669.
- [63] Roser JF, Hughes, JP. Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations, and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions. *Journal of andrology* 1992;13(3), 214-223.
- [64] Johnson L, Thompson Jr DL. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biology of reproduction* 1983; 29(3), 777-789.