

**BRUNA WADDINGTON DE FREITAS**

PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E SEMINAIS DE GARANHÕES DA RAÇA  
MANGALARGA MARCHADOR NA REGIÃO DA ZONA DA MATA MINEIRA NO  
DECORRER DAS ESTAÇÕES CLIMÁTICAS

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

**BRUNA WADDINGTON DE FREITAS**

**PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E SEMINAIS DE GARANHÕES DA RAÇA  
MANGALARGA MARCHADOR NA REGIÃO DA ZONA DA MATA MINEIRA  
NO DECORRER DAS ESTAÇÕES CLIMÁTICAS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

**APROVADA:** 18 de junho de 2010.

---

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho  
(Co-orientador)

---

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres

---

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula

---

Prof. Eduardo Paulino da Costa

---

Prof. José Domingos Guimarães  
(Orientador)

**"É melhor lançar-se em busca do triunfo, mesmo expondo-se ao insucesso,  
do que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam  
muito e nem sofrem muito, mas que também  
não conhecem vitória nem derrota."**

Roosevelt

**Este trabalho é primariamente resultado do amor e dedicação daqueles que representam a base da minha existência. À minha família dedico e devo absolutamente todas as minhas conquistas.**

Aos meus avós, Totoni e Joaninha (*in memoriam*)  
e Ary e Vera, por todo carinho e exemplo de sabedoria  
a mim explicitados em todos os momentos.

Aos meus padrinhos, Túlio e Gabriela,  
e a todos os tios (as) e primos (as)  
que não são poucos (!), pelo apoio e torcida,  
independente da distância...

E finalmente, aos meus pais, Antonio Carlos e Regina, e ao meu  
querido irmão Pedro, pela benção que é tê-los ao meu lado, guiando  
todos os meus passos...

## AGRADECIMENTOS

É muito prazeroso chegar ao final de mais uma etapa! E, definitivamente, só tenho a agradecer a todos que me ajudaram, direta ou indiretamente, a alcançar mais um dos meus (diversos) objetivos. Com certeza, as palavras que seguem ainda serão poucas para expressar toda a minha gratidão aos envolvidos...

Primeiramente, gostaria de agradecer ao destino (se é que ele existe) por me proporcionar a escolha da Medicina Veterinária como profissão. Uma área que sempre me fascinou e que desde o primeiro momento acadêmico fez brilhar a “menina dos meus olhos”.

Alguns acontecimentos no decorrer da fase pré-universitária me guiaram para seguir o caminho que hoje posso dizer que me realiza plenamente. Mas, sem dúvida, a paixão pelos animais foi fundamental para minha escolha.

E por isso não posso deixar de citar o meu cachorro Bobby. Um cão fenomenal, hoje já velhinho, mas firme e forte do meu lado. Ele é um dos acasos do destino responsável pela vontade de exercer essa profissão tão gratificante. De um amor e cumplicidade imensuráveis... Só quem conhece sabe!

Também não posso deixar de citar o primeiro cavalo com o qual tive contato, ainda na minha primeira infância, o Dançarino. Pra ser sincera, nem me lembro muito bem dele, mas me lembro muito bem do prazer que era estar ao seu lado. E acredito que ele seja o responsável pela minha fascinação “inexplicável” por esses seres tão singulares.

Fora isso, o apoio da minha família sempre foi fundamental para que eu conseguisse seguir o meu caminho de forma serena e determinada. Aos meus pais, Antonio Carlos e Regina, devo absolutamente tudo. Todas as minhas escolhas, todas as minhas vitórias... Enfim, tudo o que sou e consegui construir, é reflexo do amor e dedicação deles. A eles, palavra alguma seria suficiente para expressar o que sinto. Da mesma forma é com o meu irmão Pedro. Um homem tão especial e tão peculiar. Por todo o incentivo, por toda

alegria e arranca-rabos (!), por todo tempo dedicado em me ajudar, por toda paciência... Amor, carinho, admiração e respeito são o pouco do que sinto por eles...

Ao meu outro irmão, tão influente na minha jornada, só tenho a agradecer. Graças a ele, Márcio, tive a oportunidade de conhecer de perto o que é a realidade da Reprodução Equina. Fora a amizade, força, lealdade, ideais em comum... Amigo de todas as horas. É por essas e outras que não canso de dizer que ele é meu irmão de alma.

À Mara e Paula, minhas fiéis amigas escudeiras! Que sempre me incentivaram, mesmo sem entender muito da área. Pelas risadas, pelos choros, pelas conversas, pelas madrugadas a fio... Acho que nem preciso explicar! Elas, definitivamente, me fazem uma pessoa muito mais feliz!!!

E aos meus amigos de graduação... Como tenho a agradecer por ter conhecido uma EQUIPE tão amável e companheira! Bolão, Japonês, Julinho, Jura, Luquinha, Marquito, Mococa e Pablito. Fora as meninas, principalmente a Angélica e a Ju. Pessoas mais que especiais, que desde os tempos de calouro me apóiam e sempre que precisei estiveram ao meu lado. Pra rir, pra chorar, pra xingar, pra brindar... Impossível descrever o que vocês representam pra mim.

Falando neles, o João merece um tópico em especial, por ter me aturado durante um ano de experimento! Se tem alguém que conviveu com absolutamente todas as minhas tensões experimentais foi ele. E sempre calmo e paciente, me estimulando a seguir em frente com todos os obstáculos que surgiam no caminho. Sem ele não conseguiria ter concluído este estudo.

Ao pessoal do GERA: Bruno, Erick, Hugo, Marcelo, Maurício, Léo e Morgana por todo o estímulo, esclarecimentos e ajuda nas coletas e análises dos dados. E especialmente ao Rogério, pelo carinho, força, dedicação e companheirismo em absolutamente todos os momentos.

Aos colegas de pós graduação Juliano, Sanely, Renan e Daniel que sempre se dispuseram a ajudar no que fosse necessário.

E, obviamente, a todos os estagiários que foram fundamentais ao andamento deste estudo: Ana Carolina, Anderson, Arthur, Bárbara, Cíntia, Danilo, Débora, Denise, Erly, Eveline, Francisco, Guilherme, Igor, Isabella, Jose, Klécila, Lina, Ludmila, Manuela, Marcela, Marcelo, Matheus, Pedro, Priscilla, Renan, Rodrigo, Thiago Arcebispo, Thiago Peixoto, Thiago Suzart, Uendi, Wagner e Yamê. Muito obrigada pela dedicação, descontração e pelas madrugadas experimentais!!!

Aliás, graças a Deus, o que não me faltou foi gente disposta a ajudar. Exemplo disso são os funcionários da Equideocultura, Sebastião, José Paulo, José Antônio, Paulo Donizete, Silvio, Alcino, Bernardo, Dimas e José Roberto que sempre demonstraram boa vontade em ajudar, pela colaboração com os serviços prestados ao longo de todo o experimento e pelos cafezinhos durante o expediente! Um agradecimento especial ao Fernando, que sempre esteve ao meu lado, seja apoiando, dando dicas práticas ou coordenando diversas das atividades envolvidas no estudo. Isso sem contar nas conversas esclarecedoras e incentivadoras, e as sábias palavras proferidas em determinados momentos complicados.

Aos funcionários do DVT pelo carinho e atenção. Em especial ao Seu Didi, meu protetor dentro do Setor de Reprodução Animal, e ao Tuim e Ademir por todo o carinho e afeição ao longo de vários anos de convivência. Ao Geraldinho, que sempre se dispôs a me ajudar na melhoria da estrutura de mil e uma coisas inerentes às minhas atividades. À Margareth pelos cafezinhos e conversas naqueles intervalos providenciais e essenciais para fazer a cuca voltar a funcionar. E à Rosi, um verdadeiro anjo da guarda, sempre disposta a resolver os pepinos mais cascas grossas, dos quais muitas vezes só tive conhecimento depois de devidamente solucionados.

Ao meu orientador JD, não cabem palavras que explicitem a dedicação, paciência e sabedoria. Nossa relação, mesmo que conturbada em alguns momentos, amadureceu e tomou forma. A convivência com este, além de “guru acadêmico”, ser humano fantástico, foi essencial para meu aprendizado sobre ciência e, por que não dizer, serenidade (a pessoa mais calma que conheço!), crescimento e amadurecimento.



Ao Lincoln, meu co-orientador e amigo, por todas as palavras de incentivo, pelas risadas, desesperos e artigos compartilhados! Com ele, aprendi a ser ainda mais perfeccionista do que já era. Hoje beiro ao insuportável (o JD que o diga!)

Ao meu co-orientador Prof. Giovanni, pelos ensinamentos durante a graduação e pós-graduação, além das sugestões e confiança no trabalho realizado.

Ao Prof. Eduardo Paulino pela colaboração científica e ensinamentos ao longo da minha formação acadêmica.

Ao Prof. Ciro pelas sugestões muito bem embasadas para a formulação adequada desta dissertação.

E ao Prof. Tarcízio, por quem tenho um carinho especial por, além de meu primeiro professor de graduação, ter sido o primeiro a me estimular a seguir trilhando o caminho da Medicina Veterinária. Todo incentivo ao longo da minha trajetória na graduação e pós graduação, além do carinho e confiança em mim depositadas, são apenas uma amostra do que me faz ser tão grata a este grande mestre.

Ao Prof. Paulo Renato dos Santos Costa por ceder a placa de vídeo necessária para a captura das imagens ultrassonográficas, demonstrando pensar no coletivo e no engrandecimento de todos aqueles que trabalham no Departamento de Medicina Veterinária da UFV, independente do setor de origem.

Ao Prof. Elpídio Inácio Fernandes Filho, do Departamento de Solos da UFV, uma pessoa de uma simplicidade e desprendimento incríveis, que mesmo sem nenhum tipo de vínculo ao estudo, sugeriu formas alternativas de análise das minhas imagens ultrassonográficas.

Ao Prof. Paulo José Hamakawa por ceder dados meteorológicos relevantes à discussão desta dissertação, bem como material de pesquisa sobre o tema.

À Prof. Rita Flávia Miranda Oliveira Donzele pela colaboração no delineamento experimental e por ceder parte do material necessário à obtenção dos dados a campo, relacionados à bioclimatologia animal.

À Prof. Maria Cristina Baracat Pereira pelos ensinamentos referentes à descrição bioquímica deste experimento, bem como pela disponibilização de material e tempo para discussões detalhadas sobre uma área tão nova para mim. E à sua equipe de trabalho, Ana, Hebréia, Nayara, Marcelo, Marcos, Meire e Pedro, que nos receberam (a mim e ao João) com tanta disponibilidade e boa vontade em ensinar.

À Prof. Simone Eliza Facioni Guimarães por ceder o laboratório onde foram processadas parte das amostras, dando liberdade de atuação e noções de organização e trabalho em equipe.

E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

**MUITO OBRIGADA!**

## **BIOGRAFIA**

BRUNA WADDINGTON DE FREITAS, filha de Antonio Carlos de Freitas e Regina Maria Baptista Waddington de Freitas, nasceu em Petrópolis, Rio de Janeiro, em 15 de novembro de 1982.

Graduou-se Médica Veterinária em janeiro de 2008, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, onde ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária no mesmo ano.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Sazonalidade em eqüinos.....	4
2.2. Efeito sazonal sobre as concentrações de testosterona.....	8
2.3. Efeito sazonal sobre as biometrias testiculares.....	10
2.4. Efeito sazonal sobre os aspectos físicos e morfológicos do sêmen.....	11
2.5. Proteínas do plasma seminal.....	12
2.6. Avaliação ultrassonográfica em machos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Localização geográfica.....	16
3.2. Instalações e manejo dos animais.....	16
3.3. Coleta de sêmen.....	17
3.4. Determinação da concentração protéica do plasma seminal.....	17
3.5. Análise do sêmen fresco.....	19
3.6. Resfriamento seminal.....	21

3.7. Análise do sêmen resfriado.....	22
3.8. Avaliação testicular.....	22
3.9. Perfil sérico de testosterona e cortisol.....	23
3.10. Parâmetros fisiológicos.....	24
3.11. Variáveis climáticas.....	25
3.12. Análises estatísticas.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5. CONCLUSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
7. APÊNDICE.....	70
8. ANEXOS.....	73

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: Variáveis climáticas monitoradas dentro e fora das baias dos reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.....26
- TABELA 2: Parâmetros fisiológicos dos reprodutores da raça Mangalarga Marchador avaliados às 09:00 e 16:30 ao longo das estações climáticas.....28
- TABELA 3: Concentrações médias do cortisol sérico ( $\mu\text{g/dL}$ ) dos reprodutores utilizados no experimento.....30
- TABELA 4: Correlações entre temperatura de bulbo seco e ITGU, e características do sêmen fresco dos reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.....30
- TABELA 5: Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.....32
- TABELA 6: Características seminais avaliadas em intervalos de 12 horas durante o período de resfriamento do sêmen de reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.....36
- TABELA 7: Percentual das amostras de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador analisadas de acordo com o tempo de resfriamento.....38
- TABELA 8: Concentrações médias de testosterona sérica ( $\text{ng/mL}$ ) de reprodutores da raça Mangalarga Marchador nas quatro estações climáticas.....42

TABELA 9: Biometrias testiculares de reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.....	44
TABELA 10: Volumes testiculares (cm <sup>3</sup> ) individuais de reprodutores da raça Mangalarga Marchador nas quatro estações climáticas.....	45
TABELA 11: Ecotexturas testiculares de reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.....	46

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Principais mecanismos envolvidos na síntese de melatonina (Fonte: Sousa et al., 2008).....6
- FIGURA 2: Curva padrão ajustada para estimar a concentração de proteínas solúveis totais do plasma seminal de eqüinos pelo método de Bradford.....17
- FIGURA 3: Concentração média das proteínas solúveis totais presentes no plasma seminal (mg/mL) de garanhões da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.....38
- FIGURA 4: Padrão de secreção diário de testosterona (ng/mL) de garanhões da raça Mangalarga Marchador nas quatro estações climáticas.....40
- FIGURA 5: Ecotexturas testiculares de garanhões da raça Mangalarga Marchador em função das quatro estações climáticas.....47



## RESUMO

FREITAS, Bruna Waddington de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2010. **Aspectos fisiológicos e seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador na região da Zona da Mata Mineira no decorrer das estações climáticas.** Orientador: José Domingos Guimarães. Co-orientadores: Giovanni Ribeiro de Carvalho e Lincoln da Silva Amorim.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros reprodutivos e fisiológicos de garanhões da raça Mangalarga Marchador, nas diferentes estações climáticas criados no município de Viçosa – MG e mantidos em regime semi-estabulado. O estudo foi conduzido por um período de dez meses (abril de 2009 a março de 2010) utilizando três garanhões com idades entre 7 e 15 anos que foram submetidos a coletas de sêmen, em intervalos de 14 dias, para avaliação de parâmetros físicos e morfológicos, testes complementares e resfriabilidade do mesmo e quantificação de proteínas solúveis totais presentes no plasma seminal. Os parâmetros fisiológicos avaliados foram a frequência cardíaca, respiratória e temperatura retal em intervalos semanais pela manhã e à tarde. Foram mensuradas as biometrias e ecotexturas testiculares antes das coletas de sêmen e, para determinação da testosterona sérica, foi realizada uma sessão de coleta de sangue a cada estação climática, com coletas em intervalos de 20 minutos por um período de 24 horas. Quanto às características seminais, observou-se um aumento progressivo do volume com e sem gel entre o outono e verão ( $p < 0,05$ ), enquanto a concentração do ejaculado e motilidade espermática foram menores no período primavera/verão ( $p < 0,05$ ). A porcentagem de espermatozoides com membrana celular lesada, avaliada pela fluorescência, indicou menores valores no outono e inverno, tanto para o sêmen fresco quanto para 24 horas pós-resfriamento ( $p < 0,05$ ). A concentração de proteínas solúveis totais presentes no plasma seminal não variou ( $p > 0,05$ ) entre as estações climáticas e apresentou uma média de 14,3 mg/mL. A secreção de testosterona não apresentou um padrão circadiano, porém as maiores concentrações ocorreram de 10:00 às 14:00, sendo que as maiores concentrações foram observadas no inverno e verão ( $p < 0,05$ ). O volume testicular não foi influenciado pela sazonalidade ( $p > 0,05$ ) e a ecotextura testicular foi maior no verão ( $p < 0,05$ ). Concluiu-se que a estação

do ano exerce efeito sobre algumas características seminais, principalmente quanto aos aspectos físicos do sêmen e resistência ao processo de resfriamento do mesmo, além da ecotextura testicular e da secreção média de testosterona, de forma que a influência sobre estas últimas não apresentou correlações importantes com as demais características estudadas.

## ABSTRACT

FREITAS, Bruna Waddington de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2010. **Physiological and seminal characteristics of Mangalarga Marchador stallions in the Zona da Mata Mineira region during climatic seasons.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-advisers: Giovanni Ribeiro de Carvalho and Lincoln da Silva Amorim.

The aim of this study was to evaluate the reproductive and physiological parameters of Mangalarga Marchador stallions raised in Viçosa, Minas Gerais, Brazil during the four seasons and maintained semi-stabled. Thus, the study was conducted in a period of ten months (April 2009 to March 2010), using three stallions between 7 and 15 years of age and submitted to semen collections at intervals of 14 days for evaluation of physical and morphological semen parameters, complementary tests and cooling, and quantification of total soluble proteins present in seminal plasma. The physiological parameters measured were: respiratory and cardiac frequencies and rectal temperature at weekly intervals in the morning and afternoon. Testicular biometrics and echotexture were measured before semen collection and, to determine the serum testosterone, the blood was collected every season at 20 minute intervals during a period of 24 hours. In relation to the seminal characteristics, a progressive increase in the volume with and without gel between autumn and summer was observed ( $p < 0.05$ ), while the concentration of the ejaculate and sperm motility were lower during spring/summer ( $p < 0.05$ ). The percentage of sperm with injured cellular membrane evaluated by fluorescence presented lower values in the autumn and winter, both for the fresh semen and for 24 hours post-cooling ( $p < 0.05$ ). The concentration of total soluble proteins present in seminal plasma did not change ( $p > 0.05$ ) between seasons and showed an average of 14.3 mg/mL. Testosterone secretions did not show a circadian pattern, but the highest concentration occurred between 10 and 14 hours, so that the largest average concentrations were observed in winter and summer ( $p < 0.05$ ). Testicular volume was not influenced by seasonality ( $p > 0.05$ ) and testicular echotexture was higher during summer ( $p < 0.05$ ). It was concluded that the season has an effect on some semen characteristics, mainly on the physical aspects of semen and resistance to the cooling process, apart from

testicular echotexture and average secretion of testosterone, so that the influence on these latests showed no significant correlations with other traits.

## 1. INTRODUÇÃO

O agronegócio cavalo vem ocupando uma posição de destaque tanto em países desenvolvidos quanto em muitos daqueles em desenvolvimento, principalmente por não ser mais considerado um animal somente útil para transporte e tração. De acordo com dados publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2008, cerca de 5,6 milhões de eqüinos encontram-se distribuídos em todo o território nacional, conferindo ao Brasil o quarto lugar no ranking mundial em número absoluto da espécie (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2008) onde o estado de Minas Gerais se destaca com mais de 800 mil animais (IBGE, 2008). Portanto, trata-se de uma atividade importante e lucrativa, refletindo uma movimentação econômica da ordem de R\$ 7,3 bilhões por ano e a ocupação de cerca de 3 milhões de pessoas, empregadas direta ou indiretamente (ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ, 2006). Outro dado relevante são as exportações desta atividade que, em 2009, totalizaram US\$ 27,4 milhões, receita superior a de produtos como o café torrado e a cachaça, que têm uma divulgação bem mais ampla fora do país (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA E PECUÁRIA, 2010). De fato, a atividade está em franca ascensão em função da amplitude e diversificação das atividades eqüestres, demandando cada vez mais serviços especializados.

Em função de toda esta conjuntura, muitas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de aprimorar e lapidar a indústria eqüina, visando aumentar os índices de fertilidade da espécie. Isto por que a domesticação exerceu uma forte influência no desempenho do cavalo, acrescentando pouca ou nenhuma pressão de seleção na fertilidade (COSTA, 2009). Além disso, há uma tendência de se atribuir à fêmea os problemas de infertilidade, o que compromete uma avaliação mais criteriosa do macho. E, sabe-se que dentre os fatores que podem alterar os índices reprodutivos, a qualidade seminal assume um efeito considerável (FERNANDES; PIMENTEL, 2002).

Além disso, o interesse na difusão e no desenvolvimento de biotecnologias voltadas à reprodução eqüina vem se fomentando cada vez

mais como uma importante ferramenta para acelerar o ganho genético. Dentre estas, a inseminação artificial (IA) é a mais utilizada por ser de fácil implementação, economicamente viável e base para realização de outras biotécnicas (PIMENTEL; CARNEIRO, 2008). Assim sendo, a manipulação correta, o armazenamento e a criopreservação do sêmen são aspectos fundamentais para obtenção de sucesso em programas de reprodução assistida.

Uma vez que o garanhão é um reprodutor estacional cuja atividade sexual aumenta em épocas de dias longos, as mudanças anuais no comprimento do dia também podem influenciar o funcionamento gonadal (JANETT et al., 2003a). Em regiões de clima temperado, onde as estações do ano são bem definidas, a produção espermática e a função testicular são claramente mais elevadas durante a estação reprodutiva (JOHNSON; THOMPSON, 1983), enquanto que fora desta ocorre diminuição do tamanho e da concentração de testosterona testiculares (JOHNSON; THOMPSON, 1987). Entretanto, poucos são os estudos referentes à influência da sazonalidade sobre a função reprodutiva de garanhões em regiões tropicais.

Diante disso, mais pesquisas são necessárias a fim de avaliar o potencial de fertilidade das células espermáticas e os possíveis fatores que influenciam na fertilidade do ejaculado a fim de prever o sucesso da inseminação artificial. Assim sendo, os objetivos a serem alcançados com este estudo foram:

- Avaliar a qualidade seminal de garanhões Mangalarga Marchador ao longo de dez meses e constatar possíveis diferenças quanto às épocas do ano;
- Correlacionar os aspectos físico-morfológicos do sêmen *in natura* e resfriado com a sazonalidade;
- Verificar se há variação na concentração protéica do plasma seminal de eqüinos entre as estações climáticas;
- Caracterizar o perfil de secreção de testosterona bem como suas concentrações médias nas quatro estações climáticas;
- Constatar se ocorrem variações quanto às biometrias e ecotexturas testiculares ao longo de dez meses;

- Avaliar se os parâmetros fisiológicos frequência cardíaca e respiratória e temperatura retal sofrem alterações relevantes em função das estações climáticas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Sazonalidade em eqüinos

A atividade reprodutiva de muitas espécies encontra-se delimitada em determinadas épocas do ano, a fim de garantir que o neonato nasça em uma época favorável, onde o ambiente se encontre em ótimas condições de clima e disponibilidade de alimentos (GERLACH; AURICH, 2000). Em regiões de clima temperado, estas condições são observadas durante a primavera e o verão, enquanto em áreas tropicais e áridas, a estação das chuvas é freqüentemente o fator limitante (ZUCKER et al., 1980). Porém, diferente da temperatura, da disponibilidade de alimento, da pluviosidade e de outras variáveis, o fotoperíodo fornece informações sobre a estação e se mantém constante ano a ano (GERLACH; AURICH, 2000).

A resposta ao fotoperíodo nos mamíferos não é baseada somente no comprimento do dia absoluto. Os animais sazonais respondem diferentemente ao comprimento do dia, se este aumenta ou diminui. Como cada comprimento do dia ocorre duas vezes ao ano (uma vez na primavera-verão e outra no outono-inverno), é a capacidade de integrar o histórico e a mudança do fotoperíodo que permite aos animais determinar com precisão a época do ano (MALPAUX, 2006). Apesar disso, os efeitos do fotoperíodo sobre a reprodução podem ser modificados, até certo ponto, pela temperatura, nutrição, escore corporal e idade (GERLACH; AURICH, 2000). Porém, já é bem descrito, em eqüinos, que o fotoperíodo seja o fator externo mais influente na sazonalidade reprodutiva (GINTHER, 1992).

Conforme os dias começam a ficar mais curtos, a concentração de melatonina aumenta. Por alguns mecanismos não totalmente elucidados, isto exerce um efeito estimulante na secreção de GnRH pelo hipotálamo nos “reprodutores sazonais de dias curtos”, como é o caso dos ovinos. Em “reprodutores sazonais de dias longos”, como os eqüinos, o aumento da exposição à melatonina tem efeito oposto, inibindo a secreção de GnRH pelo hipotálamo. Assim, diferenças na extensão do dia são reconhecidas e transformadas em sinais capazes de “ligar ou desligar” a atividade sexual. Fora



da estação reprodutiva, as fêmeas sazonais não apresentam ciclos ovulatórios e os machos podem apresentar diminuição da fertilidade ou até mesmo cessação da espermatogênese (GERLACH; AURICH, 2000).

A resposta às mudanças anuais no comprimento do dia requer um complexo ajuste de mecanismos para detectar três tipos de mudanças: primeiro, a detecção da presença de melatonina acima de um limiar mínimo (noite x dia); segundo, a detecção da duração da presença da melatonina acima desse limiar mínimo (dias longos x curtos); e finalmente, a detecção de mudanças na duração da presença de melatonina relativa à exposição anterior da mesma (aumento x diminuição do comprimento do dia). Ou seja, embora a principal característica do ritmo de secreção da melatonina pareça ser a sua duração (tempo com concentrações elevadas), essa interpretação depende do histórico “fotoperiódico” e “melatonínico” do animal. A direção da mudança parece ser mais importante do que a duração absoluta do fotoperíodo para determinar a resposta fisiológica (MALPAUX et al., 2001).

Embora o efeito do fotoperíodo seja bem documentado, o local de ação da melatonina ainda não está totalmente elucidado. Sabe-se que, em algumas espécies, a melatonina não influencia diretamente a secreção de GnRH, mas age por meio de uma complexa rede de interneurônios envolvendo uma série de neurotransmissores dopaminérgicos, serotoninérgicos e aminoacidérgicos excitatórios, que parecem ter como sítio de ação o hipotálamo (MALPAUX et al., 1999). Nos eqüinos, a ligação específica *in vitro* da melatonina foi verificada em maiores quantidades na *Pars Tuberalis* e na eminência mediana e, um menor número destes receptores, no núcleo supraquiasmático (NSQ) e na área pré-óptica do hipotálamo. Neste mesmo estudo, as propriedades e distribuição dos receptores mostraram-se idênticos àqueles observados em ovelhas e coelhos (STANKOV et al., 1991). Já Nonno et al. (1995), estudando a distribuição e caracterização de receptores de melatonina em eqüinos, jumentos e bovinos, concluíram que este hormônio age primariamente na *Pars Tuberalis*, mas também na *Pars Intermedia* e *Distalis*, sugerindo a hipófise como principal local de ação da melatonina .

Nos mamíferos, o fotoperíodo é percebido pelos olhos através da retina, que transmitem o sinal fótico via sináptica para a glândula pineal (CHEMINEAU

et al., 2007) a partir de uma projeção de fibras nervosas denominada trato retino-hipotalâmico - TRH (MALPAUX, 2006), demonstrado em eqüinos por Sharp et al. (1984). Por meio do TRH, a retina comunica-se com os núcleos supraquiasmáticos que por sua vez conectam-se com a coluna intermediolateral da medula espinhal. A partir desta, a informação fóptica chega à pineal por meio de nervos simpáticos (SOUSA et al., 2008) que a traduz em sinal químico com a síntese e secreção de melatonina.

A secreção da melatonina aumenta com o início de uma fase escura e diminui rapidamente ao final da mesma – como se trata de uma molécula lipofílica, ela não fica estocada nos pinealócitos, sendo liberada para o espaço intersticial imediatamente (MALPAUX, 2006). Durante as horas de escuro, a secreção de melatonina é estimulada pela norepinefrina, secretada por neurônios pós-ganglionares do gânglio cervical superior (NAGY et al., 2000). Em eqüinos, este conceito é suportado pela observação de que o isoprotenol, um agonista alfa-adrenérgico, estimula a secreção de melatonina (SHARP et al., 1980).

O precursor da melatonina é o aminoácido essencial L-triptofano, o qual é retirado da corrente sanguínea e convertido à serotonina em duas etapas: nos pinealócitos, o triptofano é primeiramente convertido a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela triptofano hidroxilase nas mitocôndrias e depois é transformado em serotonina (5-HT) no citosol por um aminoácido aromático descarboxilase. A serotonina é então convertida em N-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT). A NAS, oximetilada pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), resulta na formação de 5-metoxi-N-acetiltriptamina (melatonina) (MALPAUX, 2006) (Figura 1).

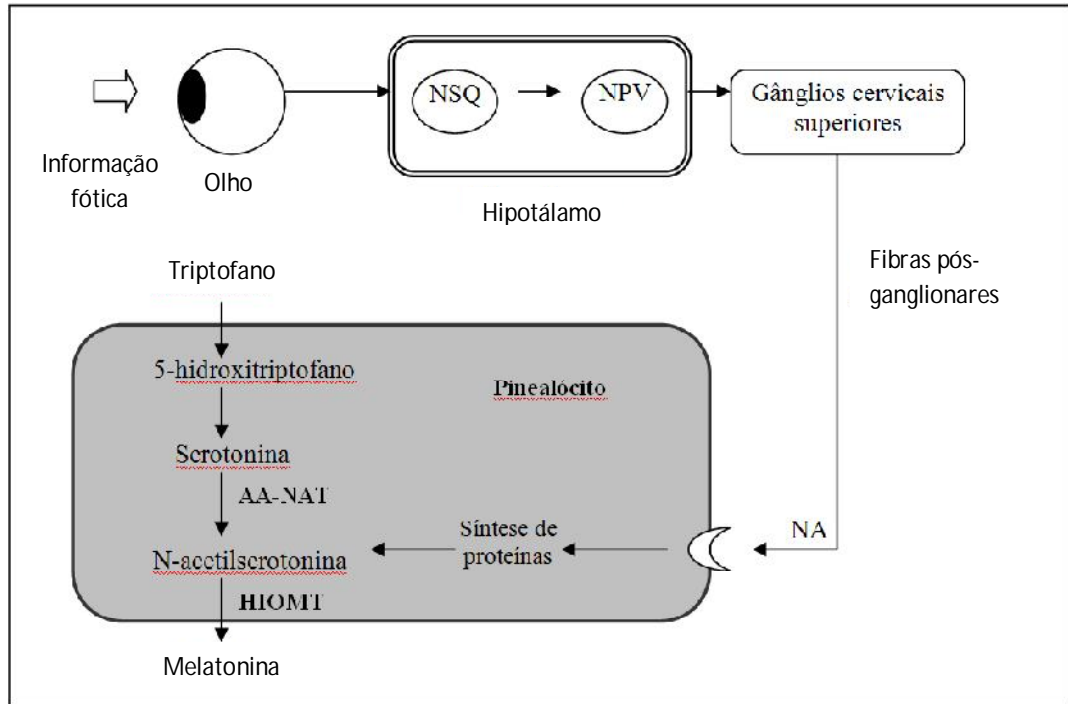


FIGURA 1: Principais mecanismos envolvidos na síntese de melatonina. A informação luminosa é percebida pela retina e é transmitida aos Núcleos supraquiasmáticos (NSQ), gerador dos ritmos. O sinal então é passado pelo núcleo paraventricular (NPV), segue para os gânglios cervicais superiores até alcançar os receptores adrenérgicos (NA) pineais. AA-NAT: arilalquilamina-N-acetiltransferase; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase. Fonte: Adaptado de Sousa et al. (2008).

A conversão do triptofano à serotonina ocorre tanto durante o dia quanto durante a noite. Porém, todas as substâncias envolvidas na síntese e degradação da melatonina apresentam uma flutuação diária na sua concentração. A atividade da enzima triptofano-hidroxilase apresenta um ritmo circadiano de atividade, com pico noturno. As concentrações de serotonina na pineal são maiores durante o dia e resulta numa transformação noturna da serotonina em NAS em função da maior atividade da AA-NAT neste período, enquanto que a atividade da HIOMT é relativamente constante ao longo de 24 horas (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008). Além disso, as concentrações plasmáticas diárias médias da enzima HIOMT são maiores durante o outono/inverno e diminuem 2 a 3 meses antes do início da estação reprodutiva de eqüinos (WESSON et al., 1979).

Outras substâncias como neurotransmissores, neuromoduladores ou hormônios também podem modular a síntese de melatonina: neuropeptídeo Y,

peptídeo intestinal vasoativo, vasopressina, angiotensina II, insulina, acetilcolina, dopamina, GABA, glutamato, prostaglandinas, entre outras (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008).

## **2.2. Efeito sazonal sobre as concentrações de testosterona**

Em garanhões, a função endócrina e conseqüentemente a testicular são influenciadas pela estação do ano (HOFFMANN; LANDECK, 1999). Ao estudarem o efeito da administração de melatonina exógena em garanhões, Argo et al. (1991) observaram que as concentrações plasmáticas de testosterona diminuíram após 11 dias do início do tratamento.

A influência do fotoperíodo na secreção de GnRH é refletida pelas mudanças circanuais na liberação de LH. Nos “reprodutores sazonais de dias longos”, a secreção de LH aumenta durante a primavera e diminui no outono (GERLACH; AURICH, 2000). Em garanhões, a liberação de LH é correlacionada positivamente com o comprimento do dia, de forma que suas concentrações plasmáticas são maiores durante a estação de monta, conforme observado por Johnson e Thompson (1983), o que é fundamental para o restabelecimento da função testicular normal de animais adultos (STANBENFELD; EDQVIST, 1993). Quanto ao FSH, sua concentração plasmática média em garanhões parece ser relativamente constante ao longo do ano, tendendo a certo aumento durante a estação de monta, segundo Johnson e Thompson (1983) e Thompson et al. (1986).

O tamanho da população de células de Leydig de garanhões também varia ao longo do ano (JOHNSON; THOMPSON, 1983; JOHNSON; TATUM, 1989). Entretanto, o volume individual das células de Leydig não difere com a estação do ano, mas sim o número deste tipo celular por testículo, o que foi correlacionado com as concentrações plasmáticas de testosterona por Johnson e Thompson (1986). Isto porque o LH ao ligar-se às membranas das células de Leydig, dá início a um processo de fosforilação de proteínas intracelulares e mobilização de precursores de esteróides, principalmente por meio da conversão do colesterol a pregnenolona (STANBENFELD; EDQVIST, 1993), culminando com a produção de testosterona, principalmente.

Em carneiros, Lincoln e Short<sup>1</sup> (1980 apud Stanbenfeld; Edqvist, 1993) observaram que embora a liberação episódica do LH fora da estação reprodutiva seja de grande amplitude, a produção de testosterona pela célula de Leydig é mínima porque a frequência de liberação do LH é baixa e a célula de Leydig se encontra pouco responsiva à gonadotrofina. Durante a estação de monta fisiológica, a secreção de LH com muito menor amplitude, porém com duração de tempo muito maior, elicia a liberação de uma quantidade maior de testosterona.

Em hamsters machos, a exposição a dias curtos inibitórios resultou num aumento na sensibilidade da secreção de LH ao feedback negativo esteroidal (TUREK; ELLIS, 1981; SISK; TUREK, 1983). Estudos comparáveis não têm sido realizados em cavalos, mas a ação de andrógenos tem sido sugerida por exercerem um feedback negativo no hipotálamo (IRVINE; ALEXANDER, 1982; MUYAN et al., 1993). As concentrações plasmáticas de testosterona em garanhões variam paralelamente com o LH (BERNDTSON et al., 1974; JOHNSON; THOMPSON, 1983), enquanto cavalos castrados não mostram variações circanuais nas concentrações plasmáticas de LH (IRVINE; ALEXANDER, 1982). Assim, as mudanças na liberação de LH em eqüinos requerem a presença das gônadas, indicando efeito esteróide-dependente do fotoperíodo (GERLACH; AURICH, 2000).

Sabe-se que no hemisfério Norte, as concentrações plasmáticas dos hormônios sexuais exibem um padrão sazonal bem definido. Diversos autores verificaram a maior concentração plasmática de testosterona durante a estação reprodutiva, quando comparado a fora da mesma (BERNDTSON et al., 1974; HARRIS et al., 1982; COX et al., 1988; ROSER; HUGHES, 1992; HOFFMANN; LANDECK, 1999).

### **2.3. Efeito sazonal sobre as biometrias testiculares**

As dimensões testiculares estão diretamente relacionadas com a produção espermática diária, uma vez que esta produção depende do número

---

<sup>1</sup> LINCOLN, G.A.; SHORT, R.V. Seasonal breeding: Nature`s contraceptive. **Recent Progress in Hormone Research**, v.36, p.1-52. 1980.

de espermatozoides produzidos por grama de tecido testicular. Testículos maiores possuem maior potencial de produção espermática e, embora o tamanho testicular seja um fator importante, é necessário que o tecido testicular seja completamente normal e funcional para que a produção espermática seja máxima, uma vez que existem razões patológicas para aumentos das dimensões testiculares (LOPATE et al., 2003).

Os eqüinos, como reprodutores estacionais, apresentam suas características testiculares variáveis ao longo do ano. Porém, diferentemente de algumas espécies sazonais, os garanhões mantêm a produção espermática entre as estações (AMANN, 1993a). As dimensões dos testículos de garanhões variam de acordo com a estação em função do número de células de Leydig, células de Sertoli e espermatozoides por grama de testículo (LOPATE et al., 2003).

Segundo Johnson (1985), o aumento na produção espermática diária de garanhões na época do verão resulta de um aumento na população de espermatogônias do tipo A. Nesta mesma época do ano, assim como as concentrações plasmáticas de LH (JOHNSON; THOMPSON, 1983; CLAY et al., 1988) e testosterona (BERNDTSON et al., 1974; JOHNSON; THOMPSON, 1983), o número de células de Sertoli (JOHNSON; THOMPSON, 1983; JOHNSON; NGUYEN, 1986) e de células de Leydig (JOHNSON; THOMPSON, 1983, 1986) são maiores que fora da estação reprodutiva. Estas relações estão de acordo com os estudos de Johnson e Tatum (1989), que verificaram que as variações sazonais de peso testicular e número de células de Sertoli, células de Leydig e células germinativas foram máximas em maio e junho (correspondente a novembro e dezembro no Hemisfério Sul).

O desenvolvimento testicular máximo ocorre entre maio e julho no Hemisfério Norte. De setembro a fevereiro, os testículos regridem alcançando menor tamanho entre novembro e janeiro. Neste momento, as células de Leydig encontram-se em menor número, e conseqüentemente menos testosterona é produzida, assim como as células de Sertoli e produção espermática (BERNDTSON et al., 1983; CLAY et al., 1987).

#### **2.4. Efeito sazonal sobre os aspectos físicos e morfológicos do sêmen**

Um dos pré-requisitos para o sucesso na criopreservação do sêmen de garanhões é a qualidade inicial do mesmo, que varia consideravelmente entre animais (DOWSETT; KNOTT, 1996; SIEME et al., 2004). Em muitos estabelecimentos, o congelamento seminal ocorre com maior frequência fora da estação reprodutiva, como forma de poupar o garanhão durante a estação, e esta realidade é uma das principais justificativas para a investigação da influência da estação sobre os aspectos seminais.

O volume seminal é aproximadamente 40% maior durante a estação reprodutiva do que durante o inverno, enquanto que a concentração média por ejaculado é 50% maior na estação de monta (LOPATE et al., 2003).

Para Robalo Silva et al. (2007), a influência sazonal sobre a produção espermática testicular está correlacionada com o volume testicular, sugerindo que a produção de espermatozoides tenha relação direta com o volume do parênquima testicular. Estes autores também notaram diferenças entre as estações com relação ao volume médio total e desprovido de gel: ambos diminuíram progressivamente entre a primavera e o inverno. Estes resultados contrastam com os observados por Janett et al. (2003a) que registraram volumes máximos no verão, podendo esta diferença ser em função da diferença do clima entre as regiões dos dois estudos, a frequência de coleta dos ejaculados e/ou raça dos animais.

Com relação à motilidade espermática e normalidade morfológica dos espermatozoides, a variação sazonal destas características é controversa. Janett et al (2003a) observaram melhor motilidade espermática durante o verão, enquanto Robalo Silva et al. (2007) e Wrench et al. (2010) não registraram diferenças significativas e Blottner et al. (2001) verificaram valores superiores desta característica durante o inverno. Com relação à morfologia espermática, Robalo Silva et al. (2007) também não observaram variações ao longo do ano. Já Janett et al. (2003a) obtiveram menores porcentagens de espermatozoides morfológicamente normais no verão, quando ocorreram as maiores concentrações de defeitos maiores, comparado à primavera e outono.

Tais resultados corroboram com o estudo de Blottner et al. (2001), que registraram maiores valores para morfologia espermática normal durante o inverno, embora, as coletas dos ejaculados tenham sido realizadas somente em um mês dentro (maio) e fora (dezembro) da estação de monta.

## **2.5. Proteínas do plasma seminal**

O plasma seminal é um componente fundamental na monta natural por servir como meio de transporte e proteção para os espermatozóides. Porém, não é essencial para a fertilidade dos mesmos, uma vez que é possível a inseminação artificial com espermatozóides provenientes do epidídimo. Trata-se de um meio de grande interesse bioquímico em função da complexidade da sua composição: carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, enzimas, constituintes antimicrobianos e diversos hormônios (GARNER; HAFEZ, 1995). Para Frazer e Bucci (1996), a presença ou ausência de muitos destes elementos parece estar relacionada à fertilidade do ejaculado.

Segundo Calvete et al. (1994) e Töpfer-Petersen et al. (2005), as proteínas secretadas ao longo do trato genital do macho, presentes no plasma seminal, exercem uma importante função no processo de maturação e capacitação espermática por meio do remodelamento da superfície celular, possibilitando à célula espermática penetrar a zona pelúcida por meio da reação acrossomal. Entretanto, a influência do plasma seminal na criopreservação de sêmen ainda não está bem definida, pois, enquanto alguns estudos evidenciam seus benefícios, outros postulam que o mesmo provoca efeitos maléficos aos espermatozóides e, por isso, deve ser excluído ou mantido em pequenas frações (BARRETO, 2007). Embora amplamente estudados, os efeitos do plasma seminal nas funções espermáticas ainda são contraditórios (PÉREZ-PÉ et al., 2001).

Parece existir uma concentração mínima destas proteínas para que elas se adsorvam na membrana plasmática espermática e possibilitem a reversão das lesões provocadas pelo estresse térmico, como a aglutinação cabeça com cabeça (MAXWELL; JOHNSON, 1999). Souza et al. (2002) relacionaram melhorias no quadro espermático de carneiros no primeiro ano de vida ao



aumento dos níveis de proteínas totais no plasma seminal, enquanto em eqüinos foi relatado por Bittmar e Kosiniak (1992) que o aumento da concentração de proteínas em sêmen pouco concentrado diminuiu a congelabilidade do mesmo.

O perfil das proteínas identificadas no plasma seminal parece variar de acordo com hormônios, enzimas, fatores de crescimento e glicoproteínas que permanecem desconhecidos em sua natureza ou função. Além disso, a proporção destas proteínas varia entre indivíduos de uma mesma espécie (FRAZER; BUCCI, 1996) e entre ejaculados de um mesmo animal (AMANN et al., 1987). A composição e seus efeitos na habilidade de fertilização do espermatozóide variam com a fertilidade individual de cada animal (BRANDON et al., 1999) e possivelmente, com a estação climática, como sugere WRENCH et al. (2008).

Segundo Töpfer-Petersen et al. (2005), a maioria das proteínas isoladas do plasma seminal de garanhões (HSP-1 a HSP-8) possuem baixo peso molecular (de 14 a 30 KDa) e podem ser divididas em três principais classes. As HSP-1 e HSP-2 (ou SP-1 e SP-2) são as mais abundantes proteínas do plasma seminal, correspondendo a 70-80 % do conteúdo protéico total deste: elas pertencem à família de proteínas do tipo Fn-2 e parecem corresponder às proteínas ligadoras de heparina de bovinos (BSPs) que estão envolvidas nas primeiras etapas da fertilização (capacitação). A segunda classe de proteínas descrita por estes autores confere a família de proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP), cuja HSP-3 pertence, e parece estar relacionada à fusão espermatozóide-ovócito, função de defesa imune inata e bloqueio de canais iônicos. Já a família das espermadesinas, com a HSP-7 como uma de suas representantes, está relacionada ao estabelecimento da reserva e capacitação espermáticas e à interação espermatozóide-zona pelúcida.

## **2.6. Avaliação ultrassonográfica em machos**

O exame ultrassonográfico é freqüentemente realizado na clínica ginecológica. No entanto, o mesmo é pouco realizado em machos (POZOR, 2005), embora ele seja uma excelente alternativa de exame complementar

para a investigação de desordens patológicas dos testículos e genitália interna (LOVE, 1992).

Por ser um método não invasivo de visualização da anatomia interna, a ultrassonografia é considerado o mais importante avanço tecnológico na pesquisa da reprodução animal (GINTHER, 1986). Em machos, ela pode ser utilizada para examinar e mensurar testículos, próstata e glândulas vesiculares (WEBER; WOODS, 1991; POZOR; MCDONNELL, 2002) e, aliada ao exame clínico, confere diagnósticos precisos de algumas desordens (PASTORE, 2008). Porém, trata-se de uma técnica que depende do conhecimento prévio da anatomia do órgão a ser avaliado para correta interpretação das imagens e reconhecimento de artefatos (GINTHER, 1986), já que a análise da imagem é subjetiva, variando com a interpretação de cada examinador. Por isso, é importante a padronização de valores quantitativos aos diferentes tons de cinza para determinação da normalidade da ecotextura para órgãos reprodutivos (PASTORE, 2008). Ao determinar o histograma da imagem, uma distribuição estatística das 256 diferentes tonalidades de cinza é descrita em termos numéricos para quaisquer segmentos obtidos.

Para a realização do exame testicular e das glândulas acessórias, é recomendável o uso do transdutor linear de 5 MHz para a visualização e mensuração dos testículos e de 7,5 MHz para escanear as glândulas sexuais acessórias e estruturas menores, como as artérias testiculares (LOPATE, 2003; JUCÁ, 2005).

O parênquima testicular normal é caracterizado como homogêneo e moderadamente ecogênico e com uma estrutura central hiperecótica de ecogenicidade variável, o mediastino (PECHMAN; EILTS, 1987; ANDRADE MOURA; MERKT, 1996; GOULETSOU et al., 2003).

Chandolia et al. (1997a) associaram a mudanças nas imagens do parênquima testicular durante o desenvolvimento sexual de ovinos, a proliferação celular e produção de fluidos. Valores numéricos dos pixels das imagens diminuíram da segunda para a oitava semana de vida dos animais, provavelmente como reflexo da produção de fluidos, em consequência do término da formação das células de Sertoli, comum ao início da espermatogênese. E entre a oitava e vigésima segunda semana, o aumento

destes valores foi correlacionado à proliferação e formação gradual dos tipos celulares espermatogênicos. Em outro estudo, com bovinos de origem taurina, Chandolia et al. (1997b) correlacionaram com o aumento da ecogenicidade testicular, a partir da vigésima semana de vida, o aumento, duas semanas após, das concentrações séricas de testosterona.

Para Gábor et al. (1998), a ecotextura testicular prediz o potencial da função gonadal de bovinos. Em estudo conduzido por Kastelic et al. (2001), a ecotextura testicular de touros apresentou uma regressão linear positiva com a produção espermática diária. Porém, Brito et al. (2003) ao promoverem estresse por calor em bovinos, notaram uma queda na qualidade e produção de sêmen, embora a ecogenicidade do parênquima testicular não tivesse sido alterada.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Localização geográfica

O experimento foi realizado no setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, situado no município de Viçosa, localizada na Mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil, a uma latitude 20° 45'20" Sul, longitude 42° 52'53" Oeste, altitude média de 752 m e clima predominante do tipo tropical mesotérmico brando úmido (COELHO; DA-SILVA, 2003). O cálculo do fotoperíodo da localidade foi realizado de acordo com Varejão-Silva (2006), de forma que os menores dias foram de 17 a 27 de junho, com média de 10,85 horas de luz/dia, e os maiores ocorreram de 18 a 27 de dezembro, com 13,37 horas de luz/dia.

#### 3.2. Instalações e manejo dos animais

Foram utilizados três garanhões da raça Mangalarga Marchador com idade entre 7 e 15 anos e pesando entre 405 e 480 Kg (animal 1 - 15 anos, 480 Kg; animal 2 - 15 anos, 410 Kg; animal 3 - 7 anos, 405 Kg). Durante o período experimental, os mesmos ficaram alojados em baias de alvenaria de 16 m<sup>2</sup> com cama de capim gordura e eram soltos diariamente, individualmente, em piquetes de capim *coast cross* e tifton (*Cynodon* spp.), de 225 m<sup>2</sup>, no período das 07:00 às 14:00. A alimentação, oferecida duas vezes ao dia, consistiu em ração concentrada adequada para a categoria (garanhões em manutenção – 14% de proteína total – 1,0% do peso vivo), formulada segundo as recomendações do National Research Council (2007) e capim elefante (*Pennisetum purpureum* cv cameroon) com cana (*Saccharum officinarum*) picada (3,5% + 1% do peso vivo, respectivamente), sal mineral e água *ad libitum*. O controle de ecto e endoparasitas foi realizado de acordo com o programa sanitário do setor. Os três garanhões que compuseram o grupo experimental foram considerados hígidos e classificados como aptos à reprodução ao exame andrológico.

### **3.3. Coleta de sêmen**

As coletas de sêmen foram realizadas utilizando vagina artificial, modelo Botucatu<sup>2</sup>, preenchida previamente com água aquecida a 50 °C. A mucosa plástica descartável que revestia internamente a mucosa de látex foi lubrificada com vaselina estéril. O sêmen era coletado em saco plástico que revestia internamente o copo coletor, sendo este protegido da luz e oscilações da temperatura.

Antes do início de cada coleta, os três animais tiveram o pênis higienizado com água a 33 °C (RAPHAEL, 2007). Todas as coletas de sêmen ocorreram com auxílio de égua em estro natural ou induzido com cipionato de estradiol<sup>3</sup> ou dinoprost trometamina<sup>4</sup>, devidamente contida fisicamente.

Ao início do experimento, cada reprodutor foi submetido a seis coletas de sêmen consecutivas, intercaladas em 24 horas, a fim de esgotar a reserva espermática extra-gonádica (STICH et al., 2002), e no sétimo dia deu-se o início do experimento (29 de abril de 2009). A partir de então, as coletas foram realizadas a cada quatorze dias. Foram realizadas 23 coletas por animal, perfazendo um total de 69 ejaculados analisados ao longo do experimento, o qual foi finalizado em 02 de março de 2010.

### **3.4. Determinação da concentração protéica do plasma seminal**

Aproximadamente 15 mL de sêmen de cada ejaculado foram submetidos à centrifugação a 700 g por 20 minutos a 4 °C, para obtenção do plasma seminal. O sobrenadante obtido de cada amostra foi aliquoteado em tubos plásticos de 1,5 mL e estocados a -80 °C em ultrafreezer.

Foi realizado um pool composto por duas amostras de dois ejaculados subseqüentes de cada animal, que posteriormente, foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C e uma segunda centrifugação foi realizada também a 4 °C, a 20.100 g por 30 minutos, para a clarificação das mesmas.

---

<sup>2</sup> Biotech Ltda, Botucatu, Brasil.

<sup>3</sup> ECP<sup>®</sup> – Pfizer Saúde Animal, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Lutalyse<sup>®</sup> – Pfizer Saúde Animal, SP, Brasil.

A dosagem de proteínas solúveis totais foi realizada conforme método descrito por Bradford (1976), utilizando o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 e a albumina sérica bovina (BSA) como solução de proteína padrão. As amostras foram analisadas em triplicata por meio de leitura por espectrofotômetro, com absorvância no comprimento de onda de 595 nm. A estimativa da concentração total das proteínas solúveis de cada amostra foi feita com base na equação ajustada (Figura 2).

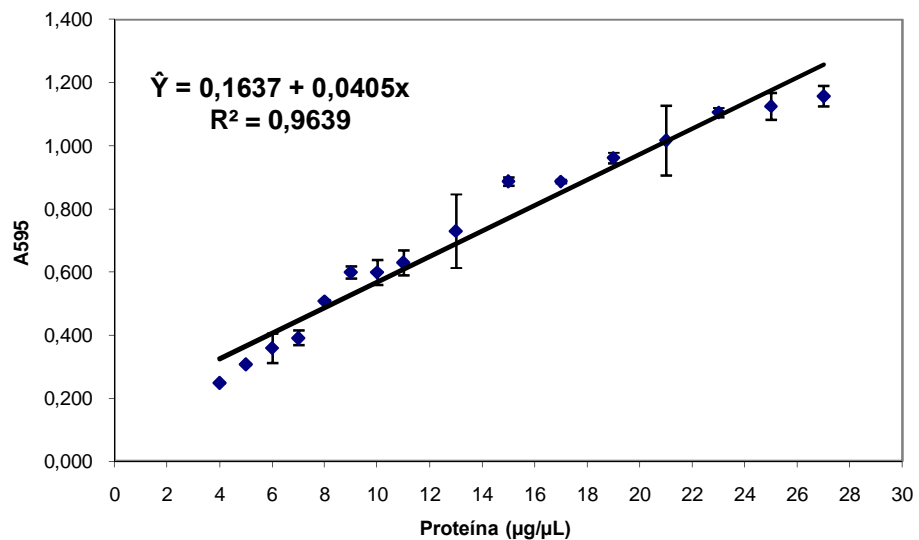


FIGURA 2: Curva padrão ajustada para estimar a concentração de proteínas solúveis totais do plasma seminal de equinos pelo método de Bradford (1976).

### 3.5. Análise do sêmen fresco

As características seminais analisadas após a obtenção do ejaculado foram: volume ejaculado total (mL), volume ejaculado livre de gel (mL), motilidade espermática total (%), vigor espermático (1 a 5), concentração espermática ( $10^6$  espermatozoides/mL) e total de espermatozoides no ejaculado ( $10^9$  espermatozoides). A integridade de membrana (%) avaliada a partir das análises com coloração eosina-negrosina e sondas fluorescentes

também foram realizadas logo após a coleta do ejaculado, enquanto que a morfologia espermática (%) e integridade de membrana espermática (%), por meio de preparação úmida e pelo teste hiposmótico respectivamente e posteriormente foram avaliadas a partir de amostras previamente fixadas em solução formol salina tamponada (HANCOK, 1957).

O volume do ejaculado foi aferido mediante a utilização de proveta graduada de 250 mL, previamente aquecida a 37 °C. Posteriormente, o sêmen foi filtrado em filtro de nylon próprio e novamente avaliado para a determinação do volume seminal sem a fração gel e então acondicionado em banho Maria a 37 °C, onde permaneceu até que as análises fossem devidamente concluídas.

Para determinação da motilidade total e vigor espermáticos, uma gota de 20 µL de sêmen foi depositada entre lâmina e lamínula, ambas pré-aquecidas em mesa térmica a 37° C. A amostra foi então observada em microscopia de contraste de fase em aumento de 200x, pelo método “duplo-cego”. Para reduzir os erros de observação, no mínimo duas lâminas por amostra foram examinadas, sendo observados no mínimo cinco campos microscópicos por lâmina.

A concentração espermática foi realizada a partir de uma alíquota de 50 µL de sêmen diluída em 950 µL de formol salina tamponado. Após a homogeneização, uma pequena gota da amostra foi depositada em cada um dos retículos de uma câmara de Neubauer e os espermatozóides presentes em cinco quadrados dispostos em diagonal de cada retículo foram contados em microscópio óptico, sob aumento de 200x. Após a operação, a média aritmética foi calculada e multiplicada por 10<sup>6</sup>, a fim de se obter o número de espermatozóides por mL de ejaculado. O número total de espermatozóides foi obtido a partir da multiplicação da concentração espermática pelo volume livre de gel da amostra (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA, 1998).

A avaliação das células viáveis e não viáveis pelo teste supravital foi realizada utilizando solução de eosina (1%) e negrosina (5%), conforme descrito por Swanson e Bearden (1951). Uma amostra de 20 µL de sêmen foi homogeneizada com 20 µL do corante e um esfregaço foi confeccionado sobre a lâmina. Após aproximadamente 30 segundos (BARTH; OKO, 1989), a

amostra foi analisada em microscopia óptica com aumento de 1.000x sob óleo de imersão e contabilizado o total de espermatozoides corados, dentro de um grupo de 100 células. As células viáveis permaneciam sem se corar enquanto que as não viáveis se apresentavam coradas em rosa-avermelhado.

Amostras de todos os ejaculados foram avaliadas quanto à integridade funcional da membrana espermática por meio do teste hiposmótico, seguindo metodologia descrita por Alves et al. (2005). Uma amostra de 100 µL de sêmen foi adicionada em 800 µL de água destilada pré-aquecida a 37 °C. A solução permaneceu então incubada a esta temperatura por 15 minutos, quando então foi procedida a fixação das células com 0,5 mL de formol salina tamponada. As avaliações foram realizadas posteriormente por metodologia de preparação úmida, adicionando-se uma gota de 20 µL da amostra entre lâmina e lamínula. A contagem de 200 células foi feita em microscopia óptica com contraste de fase em óleo de imersão, sob aumento de 1.000 X. Na análise, todas as células espermáticas apresentando dobra ou enrolamento de cauda foram consideradas como reativas ao teste. A reação hiposmótica foi obtida pela diferença da porcentagem das células reativas ao teste pela porcentagem das células com caudas alteradas antes do teste (MELO; HENRY, 1999).

O teste de integridade de membrana por fluorescência foi realizado homogeneizando-se 20 µL de sêmen com 80 µL da solução contendo iodeto de propídio (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), descrita por Harrison e Vickers (1990) e modificada por Zúccari (1998) (Anexo A), em um tubo plástico de 1,5 mL previamente protegido com papel alumínio para evitar contato com a luz, e incubado por 15 minutos em banho Maria a 37 °C. Uma gota de 10 µL foi então depositada entre lâmina e lamínula e analisada em microscopia de fluorescência, utilizando filtro de 480 nm, em aumento de 1.250x com objetiva de imersão. Foram avaliadas 100 células por amostra, sendo consideradas como possuindo membrana íntegra aquelas que coraram em verde; as que coraram em vermelho foram consideradas de membrana danificada e as semi-lesadas aquelas células coradas em verde na região acrossomal e em vermelho no núcleo.

Para a avaliação da morfologia espermática, foram adicionados em 1 mL de solução formol salina tamponada, 100 µL de sêmen ou quantidade



suficiente para turvar a mesma. A análise posteriormente realizada pelo método de preparação úmida foi baseada na quantificação das patologias, segundo classificação de Blom (1973), preconizadas pelo CBRA (1998), em defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais, contando 200 células em microscopia óptica em contraste de fase em aumento de 1.000x, utilizando óleo de imersão.

### **3.6. Resfriamento seminal**

Após a quantificação da concentração espermática de cada ejaculado, foi obtido um volume seminal compatível com a presença de 300 milhões de espermatozoides viáveis (VIDAMENT et al., 1997). A partir de então, o volume definido para o resfriamento foi diluído em meio comercial à base de leite desnatado<sup>5</sup>, de forma que a concentração final resultasse em 20 a 50 milhões de espermatozoides viáveis/mL (VARNER et al., 1987; SCHMITT, 2002) e a proporção sêmen:diluidor entre 1:2 e 1:9 (BERLINER,1942; JASKO et al., 1991a; EILTS, 2004; PICOCK, 2007). A amostra foi acondicionada em saco plástico (coletor de urina) e imersa em água a 37 °C num recipiente térmico de isopor, sendo então acondicionada em geladeira a 5 °C.

### **3.7. Análise do sêmen resfriado**

O sêmen resfriado foi avaliado a cada 12 horas após a coleta, até que a motilidade espermática total fosse quantificada em 20%. As análises realizadas nestes intervalos foram: motilidade espermática (%), vigor espermático (1 a 5), coloração supra-vital (%) e choque osmótico (%). Ainda, com intervalos de 24 e 48 horas após o resfriamento, uma alíquota da amostra seminal resfriada foi destinada à análise por meio das sondas fluorescentes. Todas as análises foram realizadas conforme descrito para o sêmen fresco.

---

<sup>5</sup> Equimix<sup>®</sup>, Nutricell Nutrientes Celulares, SP, Brasil.

### 3.8. Avaliação testicular

As biometrias e avaliação ultrassonográfica dos testículos de cada animal foram realizadas a cada quatorze dias, em torno de dois dias antes da coleta de sêmen.

Foi realizada a inspeção do escroto e palpação bilateral do epidídimo, funículo espermático e testículos, que foram caracterizados de acordo com a consistência, sendo classificados em tenso elástico (normal), flácido e muito flácido. A mensuração dos testículos foi feita com a utilização de um paquímetro nas dimensões comprimento, largura, espessura e largura escrotal, sempre pelo mesmo operador. A partir destes dados, foi calculado o volume testicular individual e combinado (a partir do somatório dos volumes dos dois testículos) conforme Love et al. (1991):

$$VT = 4\pi/3 \times (C/2) \times (L/2) \times (A/2)$$

onde,

VT: volume testicular (mm<sup>3</sup>);

C: comprimento testicular (mm);

L: largura testicular (mm);

A: altura testicular (mm).

As ultrassonografias testiculares foram realizadas sempre pelo mesmo operador e as configurações do aparelho de ultra-som (ganhos proximal, distal e total; área de foco; brilho e contraste) foram padronizadas em valores pré-determinados e iguais durante todo o experimento. O transdutor utilizado era linear de 5 MHz. Foram adquiridas quatro imagens de cada testículo, consistindo dos planos transversal nos sentidos ventro-dorsal e latero-medial, sagital sentido ventro-dorsal e dorsal sentido latero-medial. As imagens geradas foram então digitalizadas a partir do software Fast Capture XP<sup>®6</sup> e

---

<sup>6</sup> Espectrolab Medical Scientific<sup>®</sup>, MG, 2007.

posteriormente analisadas com o auxílio de um processador específico e aperfeiçoado para análise de imagens<sup>7</sup>.

Todas as imagens foram padronizadas em tamanho de 314 X 235 pixels em programa específico para edição de imagens<sup>8</sup>. Foi feita então a seleção de uma área homogênea de 40 x 40 pixels do tecido testicular para posteriormente, ser realizado o histograma de cada uma. A tonalidade de cinza de cada pixel que compôs a região selecionada foi calculada pelo processador e representada numericamente em uma escala de 256 tons de cinza, na qual zero (0) representa um pixel de tonalidade totalmente preta e 255 um pixel de tonalidade totalmente branca. A região selecionada para a análise consistiu somente de tecido testicular, sendo retiradas da análise possíveis regiões que possuíssem quaisquer tipos de artefatos.

Os valores numéricos expressos pelo software representaram o valor médio da tonalidade de cinza da dada área testicular, correspondendo quantitativamente à ecotextura testicular.

### **3.9. Perfil sérico de testosterona e cortisol**

Para determinação do perfil de testosterona e cortisol séricos, a veia jugular de cada animal foi canulada para obtenção do sangue, com cateter 14G. Para evitar possíveis transtornos, a cada coleta o cateter era lavado com solução de heparina (1:1000) visando diminuir a coagulação de sangue e entupimento do instrumento. Anteriormente a cada punção, foi descartado um volume de 1 mL de sangue, a fim de diminuir a contaminação da amostra com o anticoagulante.

As amostras foram centrifugadas a 330 g por 10 minutos. O soro sanguíneo de cada amostra foi acondicionado em tubos plásticos de 1,5 mL, em duplicata, e congelado a -20° C para análise posterior. A determinação das concentrações séricas da testosterona e cortisol foram realizadas por quimioluminescência, pela técnica imuno-enzimática utilizando-se de kits de

---

<sup>7</sup> ImageJ® - Algorithmic Approach using Java, NY, 2008.

<sup>8</sup> Adobe Photoshop CS5® - Adobe Systems Incorporated, CA, 2010.

reagentes comerciais<sup>9</sup>, no aparelho Access<sup>®10</sup>, conforme as especificações do fabricante.

As coletas foram realizadas após aproximadamente 60 dias do início de cada estação climática (22 de maio de 2009; 21 de agosto de 2009; 20 de novembro de 2009; e 19 de fevereiro de 2010). Desta forma, as coletas ocorreram uma vez a cada estação climática, num período de 24 horas em intervalos de 20 minutos. Assim sendo, foram obtidas 73 amostras de cada animal a cada sessão de coleta, totalizando 876 amostras analisadas.

O preparo dos animais para a rotina das coletas de sangue começava em torno das 16:00, duas horas antes da obtenção da primeira amostra. Para a comparação dos dados obtidos, optou-se por padronizar seis turnos de quatro horas, aleatoriamente, de forma que os mesmos ficaram distribuídos em: turno 1, referente às amostras obtidas das 18:00 às 21:40; turno 2, das 22:00 às 01:40; turno 3, das 02:00 às 05:40; turno 4, das 06:00 às 09:40; turno 5, das 10:00 às 13:40; e turno 6, das 14:00 às 17:40, concluindo o ciclo de 24 horas.

### **3.10. Parâmetros fisiológicos**

Foram aferidos os parâmetros cardio-respiratórios por meio de auscultação e temperatura corpórea retal com o uso de termômetro de mercúrio veterinário, uma vez por semana, em dois momentos diferentes (09:00 e 16:30) durante todo o período experimental.

---

<sup>9</sup> Beckman Coulter, Inc., CA, E.U.A.

<sup>10</sup> Beckman Coulter, Inc., CA, E.U.A.

### 3.11. Variáveis climáticas

Os ambientes no quais os animais passavam a maior parte do tempo foi monitorado por meio de termômetros de máxima e mínima, bulbo seco e bulbo úmido e globo negro. A partir de então, foi calculado o índice de globo e umidade (ITGU) proposto por Buffington et al. (1977), cuja equação segue:

$$\text{ITGU} = 0,72 (\text{GN} + \text{BU}) + 40,6$$

onde,

GN – temperatura de globo negro (° C), e

BU – temperatura de bulbo úmido (° C).

Foram instaladas duas mini-estações meteorológicas, de modo que uma ficou alocada numa baía vazia, visando simular aquelas onde os animais se encontravam alojados, e a outra no ambiente externo ao galpão das baias. Isto se fez necessário em função do manejo dos animais, que eram soltos diariamente (das 07:00 às 14:00). As temperaturas foram então averiguadas, nos dois ambientes, uma vez por semana, em cinco momentos diferentes com intervalos de duas horas e meia (07:00, 09:30, 12:00, 14:30 e 17:00), durante todo o período experimental.

### 3.12. Análises estatísticas

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas 9,1 (SAEG-UFV, 2007).

Para todas as características estudadas foram estimadas as médias, desvios-padrão, coeficiente de variação e distribuição de frequência.

Todos os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade dos dados e a homocidadade das variâncias, posteriormente submetidas a ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. Quando não atendidas as premissas da ANOVA, os dados foram avaliados por análise não paramétrica (teste de Kruskal Wallis ou Wilcoxon), também com 5% de probabilidade de erro.

Com relação às características qualitativas ou de classes, os dados foram arranjados em tabelas de contingência e analisados pelo teste de qui-quadrado, com 5% de probabilidade de erro.

Análise de regressão foi empregada para estudar o comportamento da concentração de testosterona e cortisol ao longo de 24 horas e durante as quatro estações do ano.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos sistemas de produção agropecuários, considera-se o ambiente no qual os animais encontram-se alojados um fator preponderante à eficiência da atividade econômica desenvolvida (OLIVEIRA et al., 2008), uma vez que, além dos fatores genéticos e nutricionais, aspectos relacionados ao comportamento e bem estar dos animais devem ser observados a fim de garantir a estabilidade de produção e desempenho animal (LEWIS, 2000). Assim sendo, o ambiente deve ser o mais adequado possível para que os animais expressem seu potencial máximo (OLIVEIRA et al., 2008). No presente trabalho, as condições climáticas tanto do ambiente de pastejo quanto das baias nas quais os animais permaneceram alojados foram monitoradas (Tabela 1) e os resultados obtidos evidenciam uma equivalência entre os dois ambientes, exceto para aqueles parâmetros que refletem a radiação térmica, temperatura de globo negro e ITGU.

TABELA 1: Variáveis climáticas monitoradas dentro e fora das baias dos reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.

VARIÁVEIS CLIMÁTICAS	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO
AMBIENTE EXTERNO				
Globo Negro (°C)	28,8 ± 4,3 <sup>ABa</sup>	26,1 ± 3,9 <sup>Ba</sup>	29,3 ± 4,2 <sup>ABa</sup>	31,8 ± 4,1 <sup>Aa</sup>
Bulbo Seco (°C)	21,3 ± 2,6 <sup>Ba</sup>	20,1 ± 1,8 <sup>Ba</sup>	25,5 ± 1,6 <sup>Aa</sup>	27,2 ± 2,4 <sup>Aa</sup>
Bulbo Úmido (°C)	19,9 ± 2,4 <sup>Ba</sup>	18,9 ± 1,5 <sup>Ba</sup>	24,4 ± 1,6 <sup>Aa</sup>	26,4 ± 2,1 <sup>Aa</sup>
Umidade Relativa (%) <sup>*</sup>	87,1 ± 2,2 <sup>Ca</sup>	88,0 ± 2,6 <sup>BCa</sup>	89,9 ± 3,2 <sup>ABa</sup>	90,9 ± 1,9 <sup>Aa</sup>
Mínima (°C)	17,9 ± 2,7 <sup>Ba</sup>	16,5 ± 2,4 <sup>Ba</sup>	22,0 ± 1,2 <sup>Aa</sup>	22,9 ± 1,8 <sup>Aa</sup>
Máxima (°C)	23,8 ± 2,1 <sup>Ca</sup>	22,2 ± 3,2 <sup>Ca</sup>	27,8 ± 2,1 <sup>Ba</sup>	31,1 ± 2,3 <sup>Aa</sup>
ITGU	75,7 ± 4,7 <sup>BCa</sup>	73,0 ± 3,7 <sup>Ca</sup>	79,3 ± 3,6 <sup>ABa</sup>	82,5 ± 4,2 <sup>Aa</sup>
AMBIENTE INTERNO				
Globo Negro (°C)	20,1 ± 2,2 <sup>Bb</sup>	19,0 ± 2,1 <sup>Bb</sup>	24,2 ± 1,6 <sup>Ab</sup>	25,3 ± 2,1 <sup>Ab</sup>
Bulbo Seco (°C)	20,4 ± 3,3 <sup>Ba</sup>	19,4 ± 1,6 <sup>Ba</sup>	24,2 ± 1,5 <sup>Aa</sup>	25,8 ± 2,1 <sup>Aa</sup>
Bulbo Úmido (°C)	19,8 ± 2,3 <sup>Ba</sup>	18,4 ± 1,5 <sup>Ba</sup>	23,6 ± 1,7 <sup>Aa</sup>	25,4 ± 2,0 <sup>Aa</sup>
Umidade Relativa (%) <sup>**</sup>	87,1 ± 3,5 <sup>Aa</sup>	88,2 ± 2,9 <sup>Aa</sup>	90,8 ± 1,4 <sup>Ba</sup>	91,9 ± 0,4 <sup>Ba</sup>
Mínima (°C)	16,4 ± 2,7 <sup>Ba</sup>	15,5 ± 2,3 <sup>Ba</sup>	21,9 ± 1,8 <sup>Aa</sup>	22,4 ± 1,9 <sup>Aa</sup>
Máxima (°C)	23,8 ± 2,6 <sup>BCa</sup>	22,3 ± 2,5 <sup>Ca</sup>	26,1 ± 2,7 <sup>ABa</sup>	28,0 ± 3,9 <sup>Aa</sup>
ITGU	69,3 ± 3,3 <sup>Bb</sup>	67,6 ± 2,5 <sup>Bb</sup>	75,0 ± 2,3 <sup>Ab</sup>	77,1 ± 2,9 <sup>Ab</sup>

<sup>A...C</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si (p < 0,05) pelo Teste de Tukey.

<sup>a, b</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna e de uma mesma característica diferem entre si (p < 0,05) pelo Teste de Fisher.

<sup>\*a</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna e de uma mesma característica diferem entre si (p < 0,05) pelo Teste de Wilcoxon.

<sup>\*\* A...C</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si (p < 0,05) pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Durante a primavera/verão, as temperaturas de bulbo seco e a umidade relativa foram maiores do que durante o outono/inverno ( $p < 0,05$ ), independente do ambiente monitorado, de forma a caracterizar duas “subestações” distintas durante o período experimental. Uma vez que a zona de conforto térmico de eqüinos é estimada numa faixa de  $-1^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}\text{C}$  (MALSCHITZKY, 2010), nota-se que os ambientes não ofereceram a condição térmica ideal para os reprodutores durante o período primavera/verão, uma vez que a temperatura de bulbo seco, de uma forma geral, se encontrou acima do máximo recomendado ( $24,2$  a  $27,2^{\circ}\text{C}$ ), chegando a atingir  $31,1^{\circ}\text{C}$  (média da temperatura diária máxima no ambiente externo durante o verão).

Porém, a radiação térmica é um dos mais importantes fatores ambientais, especialmente para animais a campo aberto (TOJAL, 2002). Assim sendo, o ITGU, proposto por Buffington et al. (1977), é um bom indicador do conforto térmico de animais expostos a ambientes tropicais, com temperaturas elevadas e radiação solar intensa. Segundo classificação utilizada por Ferreira et al. (2006), ao estudarem as reações fisiológicas de caprinos mantidos em diferentes ambientes, valores de ITGU abaixo de 70 conferem uma condição térmica normal; valores entre 71 e 78 indicam uma condição crítica; entre 79 e 83 existe perigo; e acima de 83 caracteriza uma condição de emergência.

No presente estudo, baseado nos valores relatados para caprinos por Ferreira et al. (2006), foram registrados valores freqüentemente dentro da zona crítica ( $73,0$  a  $77,1$  entre outono/inverno do ambiente externo e primavera/verão do ambiente interno), sendo que o ambiente de pastejo durante o período de primavera/verão se apresentou “perigoso” à saúde e bem estar dos animais (ITGU:  $79,3 - 82,5$ ). Entretanto, os animais eram soltos diariamente pela manhã, período em que os parâmetros fisiológicos freqüência cardíaca (FC) e temperatura retal (TR) dos reprodutores apresentaram-se dentro dos limites considerados fisiológicos para a espécie ( $32$  a  $44$  batimentos/minuto e  $37,2$  a  $38,2^{\circ}\text{C}$ ), de acordo com os valores de referência descritos por Cunningham (1999) (Tabela 2).



TABELA 2: Parâmetros fisiológicos dos reprodutores da raça Mangalarga Marchador avaliados às 09:00 e 16:30 ao longo das estações climáticas.

PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	HORÁRIO	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO
Frequência Cardíaca (batimentos/minuto)	09:00	41,5 ± 6,1 <sup>Aa</sup>	38,1 ± 8,8 <sup>Aac</sup>	36,7 ± 5,3 <sup>Aac</sup>	33,3 ± 4,2 <sup>Abc</sup>
	16:30	41,1 ± 5,3 <sup>Aa</sup>	39,9 ± 8,0 <sup>Aa</sup>	38,6 ± 6,8 <sup>Aa</sup>	32,7 ± 3,9 <sup>Ab</sup>
Frequência Respiratória (movimentos/minuto)	09:00	21,3 ± 5,8 <sup>Ba</sup>	19,1 ± 6,9 <sup>Aab</sup>	25,6 ± 9,1 <sup>Aac</sup>	24,9 ± 5,2 <sup>Aac</sup>
	16:30	24,9 ± 6,1 <sup>Aa</sup>	21,3 ± 6,2 <sup>Aa</sup>	25,9 ± 7,7 <sup>Aa</sup>	24,1 ± 6,2 <sup>Aa</sup>
Temperatura Retal (°C)	09:00	37,6 ± 0,9 <sup>Ba</sup>	37,5 ± 0,4 <sup>Ba</sup>	37,8 ± 0,2 <sup>Bb</sup>	38,0 ± 0,2 <sup>Ab</sup>
	16:30	37,9 ± 0,1 <sup>Aa</sup>	37,7 ± 0,3 <sup>Aab</sup>	38,0 ± 0,2 <sup>Aac</sup>	37,9 ± 0,2 <sup>Aa</sup>

<sup>A,B</sup> Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna de uma mesma característica diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo Teste de Wilcoxon.

<sup>a...c</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Segundo Silva (2000, 2005), os componentes do ambiente térmico são fatores que podem resultar em estresse ao organismo, determinando uma reação fisiológica proporcional à intensidade do estímulo aplicado e à capacidade de compensação daquele, de forma que os resultados dessa reação devem ser avaliados por meio do comportamento de variáveis fisiológicas que, em conjunto, dão uma idéia da tensão a qual o animal está submetido. Assim sendo, o estresse está relacionado com a capacidade de adaptação do indivíduo, uma vez que, diante desta nova situação, o organismo reage com uma hiperatividade da glândula adrenal e do sistema nervoso simpático (LAY Jr; WILSON, 2001). Portanto, a adaptabilidade pode ser considerada como uma habilidade do animal de ajustar-se às condições ambientais médias ou extremas (BACCARI Jr, 1986).

O aumento das freqüências respiratória e cardíaca e da temperatura retal são considerados, entre outros, sinais de estresse térmico (CURTIS, 1983). Segundo Cunningham (1999), alterações nos parâmetros fisiológicos são evidências de tentativas a que o organismo recorre para sair da condição de estresse térmico à qual está submetido. A manutenção da temperatura retal dentro dos limites normais para a espécie, quando mantida em condições adversas, tem sido utilizada como critério para caracterizar adaptabilidade (PALUDO et al., 2002). Ainda segundo Cheung e McLellan (1998), animais adaptados a climas quentes podem apresentar maior taxa de sudorese, decréscimo na freqüência cardíaca e na temperatura retal.

Levando em conta estes conceitos, pode-se considerar que os animais utilizados no estudo estavam adaptados ao ambiente em que permaneceram

durante o período experimental, mesmo com o ITGU acima do limiar recomendável (Tabela 1 – 73,0 a 82,5 para inverno e verão do ambiente externo, respectivamente), uma vez que somente a frequência respiratória dos mesmos (Tabela 2) apresentou-se acima dos padrões fisiológicos para a espécie (12 a 20 movimentos respiratórios/minuto) descritos por Thomassian (1984). Estes resultados são respaldados por Paludo et al. (2002), que justificaram ser essa característica a primeira linha de defesa fisiológica do animal, quando submetido ao estresse térmico ou por exercício, uma vez que a perda de calor latente via respiração é uma forma complementar à perda que ocorre via sudorese (YOUSELF, 1985), que nos eqüinos constitui o mais importante mecanismo de dissipação de calor (REECE, 2006) em função do elevado número de glândulas sudoríparas espalhadas por todo o corpo do animal (DYCE et al., 1996).

Além disso, a adaptação dos animais ao ambiente no qual os mesmos encontravam-se expostos também pôde ser respaldada pelos resultados obtidos com relação às concentrações séricas de cortisol (Tabela 3). Em nenhuma das coletas efetuadas ficou caracterizada condição de estresse, segundo parâmetros estabelecidos por Kaneko et al. (2008) e Stull e Rodiek (1987).

TABELA 3: Média das concentrações séricas do cortisol ( $\mu\text{g/dL}$ ) de garanhões da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.

	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO	Média/turno
1 (18-21:40)	3,04 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>	2,96 $\pm$ 0,90 <sup>ab</sup>	2,50 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	2,41 $\pm$ 1,24 <sup>ac</sup>	2,70 $\pm$ 1,02 <sup>A</sup>
2 (22-01:40)	2,26 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	2,84 $\pm$ 0,98 <sup>ac</sup>	3,73 $\pm$ 1,01 <sup>b</sup>	1,98 $\pm$ 0,97 <sup>ad</sup>	2,71 $\pm$ 1,16 <sup>A</sup>
3 (02-05:40)	2,99 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	2,81 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	3,48 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>	2,17 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup>	2,86 $\pm$ 0,96 <sup>A</sup>
4 (06-09:40)	2,77 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	2,79 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	2,01 $\pm$ 1,02 <sup>bc</sup>	2,52 $\pm$ 0,79 <sup>ac</sup>	2,52 $\pm$ 0,97 <sup>A</sup>
5 (10-13:40)	2,02 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	2,62 $\pm$ 0,86 <sup>ab</sup>	2,59 $\pm$ 1,48 <sup>ab</sup>	1,74 $\pm$ 0,55 <sup>ac</sup>	2,24 $\pm$ 1,05 <sup>B</sup>
6 (14-17:40)	1,95 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	2,21 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	2,27 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	2,18 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	2,15 $\pm$ 0,79 <sup>B</sup>
Média/estação	2,48 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	2,70 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	2,76 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>	2,17 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	2,53 $\pm$ 1,03

<sup>A..C</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

<sup>a...c</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

O conhecimento destas mudanças no perfil metabólico resultantes da reação do organismo ao ambiente é de extrema importância, uma vez que já

está comprovada a relação entre estresse e reprodução (LAY Jr; WILSON, 2001), além do fato de a temperatura ser o fator de maior importância na espermatogênese dos machos de qualquer espécie (MIES FILHO, 1975). As altas correlações observadas entre as variáveis climáticas avaliadas e algumas características do sêmen fresco (Tabela 4) constituem uma evidência da influência do clima na capacidade reprodutiva dos animais. Fica claro a maior influência do clima sobre o volume ejaculado, com ou sem a fração gel, a concentração por mL do ejaculado, a motilidade espermática e integridade de membrana, em função das correlações médias e altas; enquanto que as demais características (total de espermatozóides presentes no ejaculado, vigor, integridade de membrana avaliada pelos testes supravital e HOST, e morfologia espermática), por apresentarem correlação baixa ou nula com as variáveis climáticas consideradas, foram menos afetadas.

TABELA 4: Correlações da temperatura de bulbo seco e ITGU, e características do sêmen fresco dos reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS	BULBO SECO (E)	ITGU (E)	BULBO SECO (I)	ITGU (I)
Volume com gel	0,64	0,56	0,65	0,67
Volume sem gel	0,49	0,41	0,53	0,54
Concentração do ejaculado	-0,47	-0,43	-0,49	-0,51
Total de espermatozóides	NS	NS	NS	NS
Motilidade	-0,35	-0,33	-0,32	-0,35
Vigor	NS	NS	NS	NS
Supra Vital	-0,21	-0,24	NS	NS
Hiposmótico	NS	NS	NS	NS
Íntegros	-0,57	-0,48	-0,54	-0,54
Semi Lesados	NS	NS	NS	NS
Lesados	0,56	0,46	0,53	0,53
Defeitos Maiores	NS	-0,22	NS	NS
Defeitos Menores	NS	NS	NS	NS
Defeitos Totais	NS	-0,21	NS	NS

(E): ambiente externo; (I): ambiente interno.

NS: não significativo.  $p > 0,05$ .

É importante ressaltar que estas correlações refletem as condições de um ambiente onde animais estão adaptados. Isto por que naquelas pesquisas onde os reprodutores foram submetidos ao estresse térmico, a influência do ambiente parece ocorrer de maneira inversa para o volume do ejaculado em especial, ou com muito mais intensidade sobre as demais características

padrão do sêmen. Por exemplo, Coelho et al. (2006) observaram decréscimos do volume, concentração, turbilhonamento e vigor espermáticos de caprinos alojados em câmaras bioclimáticas por 30 dias, em condições de estresse térmico. Segundo Jainudeen e Hafez (1995), o volume seminal e o número total de espermatozoides no ejaculado de suínos são maiores durante o tempo frio, e, quando estes reprodutores são submetidos a elevadas temperaturas ambientais, ocorre uma diminuição da concentração e motilidade e aumento das anormalidades espermáticas. Parkinson (1987), em estudo sobre o efeito da sazonalidade sobre as características seminais de touros, observou maiores porcentagens de espermatozoides anormais no verão e correlação alta e positiva entre esta característica e a temperatura máxima diária.

Com relação aos parâmetros seminais quantitativos, os resultados obtidos indicam diferenças sazonais entre as estações do ano (Tabela 5). Tanto o volume médio total quanto o volume médio desprovido da fração gel aumentaram progressivamente entre o outono e o verão (35,8 a 115,4 mL e 30,2 a 73,1 mL, respectivamente). Estes padrões são variáveis entre os estudos, havendo registros de maiores volumes na primavera e menores no inverno (JANETT et al., 2003b; ROBALO SILVA et al., 2007), volumes máximos no verão e mínimos no inverno (JANETT et al., 2003a) ou máximos no verão e mínimos na primavera (PICKETT et al., 1976).

Estas diferenças podem ser explicadas em função das diferentes raças estudadas, frequência na coleta de sêmen e principalmente pela latitude e pelo clima, que, além de ter apresentado alta correlação (0,41 – 0,67) com esta característica no presente experimento (Tabela 4), parece influenciar o comportamento sexual dos reprodutores e a proporção de gel nos ejaculados (ROBALO SILVA et al., 2007). É o que demonstrou Silva (2007) num estudo realizado na região nordeste do país: foram registrados menores volumes ejaculados no verão, época em que as éguas apresentaram anestro, o que resulta em um estímulo sexual inadequado dos reprodutores com conseqüente diminuição do volume ejaculado. De fato, o maior estímulo sexual sofrido pelos reprodutores aumenta a secreção de fluidos por parte das glândulas sexuais acessórias, em especial as glândulas vesiculares (responsáveis pela secreção da fração gelatinosa). Porém, esta variável é a menos importante, uma vez que

a fração gel é pobre em espermatozoides e parece não afetar a fertilidade do ejaculado (PICKETT et al., 1974; AMANN, 1993b).

TABELA 5: Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO
Volume com gel (mL)	35,8 ± 11,1 <sup>a</sup>	40,9 ± 19,0 <sup>ac</sup>	67,2 ± 27,3 <sup>bc</sup>	115,4 ± 44,6 <sup>bd</sup>
Volume sem gel (mL)	30,2 ± 11,7 <sup>B</sup>	38,3 ± 18,4 <sup>B</sup>	54,3 ± 25,3 <sup>B</sup>	73,1 ± 24,3 <sup>A</sup>
Concentração (10 <sup>6</sup> /mL)	311,8 ± 148,3 <sup>a</sup>	358,7 ± 180,6 <sup>ac</sup>	178,9 ± 97,0 <sup>bd</sup>	191,0 ± 110,1 <sup>ad</sup>
Total de espermatozoides (10 <sup>9</sup> )	8,8 ± 4,0 <sup>a</sup>	13,7 ± 9,7 <sup>a</sup>	9,0 ± 5,5 <sup>a</sup>	12,9 ± 6,4 <sup>a</sup>
Motilidade (%)	74,6 ± 6,9 <sup>A</sup>	74,5 ± 5,9 <sup>A</sup>	66,4 ± 8,9 <sup>B</sup>	67,8 ± 7,5 <sup>AB</sup>
Vigor (1-5)	3,4 ± 0,4 <sup>A</sup>	3,2 ± 0,7 <sup>A</sup>	3,2 ± 0,4 <sup>A</sup>	3,3 ± 0,5 <sup>A</sup>
Defeitos Maiores (%)	23,3 ± 6,2 <sup>A</sup>	25,5 ± 9,1 <sup>A</sup>	22,8 ± 9,8 <sup>A</sup>	24,8 ± 9,5 <sup>A</sup>
Defeitos Menores (%)	7,9 ± 3,7 <sup>A</sup>	7,0 ± 5,4 <sup>A</sup>	6,0 ± 6,0 <sup>A</sup>	6,8 ± 4,8 <sup>A</sup>
Defeitos Totais (%)	31,2 ± 8,2 <sup>A</sup>	32,5 ± 11,6 <sup>A</sup>	28,8 ± 12,5 <sup>A</sup>	31,6 ± 11,8 <sup>A</sup>

<sup>a...d</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si (p < 0,05) pelo Teste de Kruskal-Wallis.

<sup>A, B</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si (p < 0,05) pelo Teste de Tukey.

O número de espermatozoides por ejaculado se manteve constante ao longo do ano (Tabela 5) e está de acordo com as médias estabelecidas pelo CBRA (1998), exceto na estação do outono. Já a concentração por mL dos ejaculados foi maior no outono/inverno, sendo que a primavera revelou os menores valores obtidos (178,9 ± 97,0 sptz/mL), corroborando com os valores obtidos por Janett et al (2003b). Estes valores se justificam, uma vez que o volume ejaculado foi maior durante a estação reprodutiva. De forma semelhante, Janett et al. (2003a) e Silva (2007) verificaram menores concentrações espermáticas no verão do que no inverno, enquanto Robalo Silva et al. (2007), Cazales et al. (2008) e Wrench et al. (2010) não observaram diferenças na concentração espermática por mL entre ejaculados nas diferentes estações reprodutivas.

A maior motilidade espermática observada durante o período experimental (Tabela 5) foi registrada nas estações de outono e inverno ( $p < 0,05$ ), sendo que a primavera apresentou os menores valores ( $66,4 \pm 8,9$ ;  $p < 0,05$ ), assim como Pacheco (2002) em experimento conduzido na região sudeste do Brasil. Pickett et al. (1976) e Leme (2003) não observaram diferenças estacionais na motilidade espermática. Já no estudo de Silva (2007), a motilidade espermática foi maior no verão do que no inverno, ao contrário de Janett et al (2003b) que evidenciaram valores menores no verão em relação às demais estações. Estes autores relataram que as diferenças estacionais na motilidade espermática podem ser influenciadas pelo manejo dos animais, frequência na coleta de sêmen e condições ambientais, como temperatura e umidade. Ainda, o número de animais e a idade dos mesmos devem ser considerados (DOWSETT; KNOTT, 1996). Todavia, durante todo o período experimental, a motilidade esteve inversamente relacionada com o volume de gel ejaculado, de forma a confirmar a influência deste em função da aglutinação das cabeças dos espermatozóides (PICKETT, 1993a).

Jasko et al. (1991b) relataram valores menores para motilidade espermática no inverno, utilizando o CASA (computer-aided sperm analysis), enquanto Warnke et al. (2003), utilizando do mesmo sistema de avaliação espermática, observaram o oposto (maior motilidade no inverno do que no verão). Diante dessa controvérsia de dados, torna-se importante mais investigações sobre os constituintes do plasma seminal (JANETT et al., 2003b), uma vez que já foi demonstrado a influência do mesmo sobre a motilidade espermática (PICKETT et al., 1975a).

Com relação ao vigor e à morfologia espermática, não foram observadas variações ao longo do ano ( $p > 0,05$ ) (Tabela 5), assim como em estudo publicado por Robalo Silva et al. (2007). Janett et al. (2003a) e Pacheco (2002) observaram menores porcentagens de espermatozóides normais no verão, onde os defeitos maiores foram mais presentes comparados ao outono e primavera. Janett et al. (2003b) observaram maiores quantidades de espermatozóides normais no outono do que nas demais estações, ao contrário de Blottner et al. (2001) que verificaram mais patologias durante o outono e o inverno. Estas discrepâncias nos resultados obtidos por diferentes

pesquisadores devem ser avaliadas com cuidado, uma vez que, ao contrário do que foi efetuado neste estudo, normalmente as análises seminais não são realizadas de forma contínua ao longo de todo um ano e, em muitos estudos, são referentes a garantões diferentes nas diferentes estações, o que aumenta ainda mais o erro em função da variação individual.

Todavia, os animais utilizados nesta pesquisa apresentaram valores percentuais pouco superiores de defeitos maiores do que o recomendado pelo CBRA (1998) (máximo de 25,5%), de forma que os mais presentes foram cauda fortemente dobrada e dobrada com gota. A presença destes defeitos está negativamente correlacionada com a fertilidade (LOVE, 2000), o que pode ser contornado com o uso de maiores concentrações espermáticas para inseminação artificial, a fim de compensar a alta incidência de defeitos importantes. Porém, deve-se tomar cuidado com o excesso de patologias, uma vez que defeitos nucleares não são “compensáveis”, já que estas células são incapazes de fecundar o ovócito (Janett et al., 2003a).

Embora as características espermáticas padrão (concentração, motilidade e morfologia espermáticas) sejam as variáveis mais utilizadas para prever a fertilidade de uma amostra de sêmen, elas são freqüentemente insuficientes por si só para cumprir com este objetivo, a não ser que individualmente sejam muito diferentes dos valores da normalidade para a espécie (MELO et al., 2005). Isto por que o espermatozóide é uma célula complexa que se torna infértil quando um dos seus vários aspectos bioquímicos ou morfológicos se encontra afetado e, normalmente, a avaliação de somente uma destas características não garante a funcionalidade celular (MELO, 1999). Portanto, para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que o mesmo também possua, além da morfologia, atividade metabólica e membrana plasmática normais (ZÚCCARI, 1998), uma vez que a presença de uma membrana celular íntegra e funcional é um requisito para que ocorra a fecundação (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997; MELO, 1999). Assim sendo, a associação de testes complementares à análise rotineira de sêmen permite a obtenção de resultados mais abrangentes no que diz respeito à fisiologia espermática.

A análise por fluorescência do sêmen fresco foi o único teste complementar que indicou diferença ( $p < 0,05$ ) quanto à integridade da membrana espermática ao longo das estações do ano (Tabela 6), apresentando alta correlação negativa (-0,48 - -0,57) com as condições climáticas características deste estudo (Tabela 4). A variação nas porcentagens de espermatozóides íntegros seguiu um comportamento similar à motilidade espermática, porém apresentando valores inferiores quando comparado a esta característica, indicando a presença de espermatozóides móveis, porém com membrana celular lesada, assim como observado por Valcárcel et al. (1994) ao avaliarem sêmen de carneiros.

Quanto ao resfriamento seminal, este teste acusou uma menor quantidade de espermatozóides lesados nas primeiras 24 horas no período de outono (Tabela 6), sugerindo que durante esta época, o sêmen se encontra menos susceptível às injúrias provocadas por este processo. Resultados similares foram descritos por Janett et al (2003a) que observaram que o sêmen coletado no outono apresentou melhores motilidades quando pós-descongelado e, ao avaliarem a viabilidade de membrana pela fluorescência e HOST, os piores resultados ocorreram no verão e no inverno, respectivamente. Porém, não foi observada diferença, quanto às estações climáticas, no número de amostras que apresentaram motilidade espermática abaixo de 20% entre os tempos pós-resfriamento avaliados (Tabela 7), o que sugere que os componentes do plasma seminal influentes na fisiologia espermática se mantiveram dentro de um padrão ao longo do experimento.



TABELA 6: Características seminais avaliadas em intervalos de 12 horas durante o período de resfriamento do sêmen de reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS	TEMPO (h)	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO
Motilidade (%)	0	74,6 ± 6,9 <sup>A</sup>	74,5 ± 5,9 <sup>A</sup>	66,4 ± 8,9 <sup>B</sup>	67,8 ± 7,5 <sup>AB</sup>
	12	44,2 ± 20,5 <sup>A</sup>	48,6 ± 23,7 <sup>A</sup>	40,4 ± 25,4 <sup>A</sup>	44,6 ± 24,1 <sup>A</sup>
	24	36,4 ± 16,3 <sup>A</sup>	42,8 ± 16,7 <sup>A</sup>	46,4 ± 12,6 <sup>A</sup>	44,7 ± 11,3 <sup>A</sup>
	36	25,0 ± 10,4 <sup>A</sup>	35,4 ± 16,2 <sup>A</sup>	33,1 ± 15,1 <sup>A</sup>	27,1 ± 17,8 <sup>A</sup>
	48	25,0 ± 10,0 <sup>A</sup>	25,0 ± 8,7 <sup>A</sup>	31,7 ± 8,3 <sup>A</sup>	27,1 ± 12,5 <sup>A</sup>
	60*	15,0 ± 7,1	15,0 ± 29,0	13,8 ± 4,8	15,0 ± 0,0
	72*		15,0 ± 0,0		30,0 ± 0,0
	Supra Vital (%)	0	68,4 ± 10,6 <sup>A</sup>	71,9 ± 8,9 <sup>A</sup>	67,4 ± 10,2 <sup>A</sup>
12		51,3 ± 12,9 <sup>A</sup>	50,5 ± 16,7 <sup>A</sup>	42,3 ± 25,3 <sup>A</sup>	34,3 ± 22,1 <sup>A</sup>
24		49,4 ± 9,7 <sup>A</sup>	46,7 ± 15,4 <sup>A</sup>	47,7 ± 14,6 <sup>A</sup>	47,5 ± 19,1 <sup>A</sup>
36		44,0 ± 12,0 <sup>A</sup>	46,8 ± 48,7 <sup>A</sup>	40,4 ± 20,0 <sup>A</sup>	29,6 ± 13,5 <sup>A</sup>
48		50,4 ± 13,9 <sup>A</sup>	43,3 ± 17,0 <sup>A</sup>	39,4 ± 14,0 <sup>A</sup>	35,3 ± 14,6 <sup>A</sup>
60*		30,5 ± 12,3	36,0 ± 26,2	9,8 ± 7,5	16,0 ± 8,5
72*			29,0 ± 0,0		24,0 ± 0,0
HOST (%)		0	57,3 ± 10,6 <sup>a</sup>	51,1 ± 21,4 <sup>a</sup>	53,9 ± 10,7 <sup>a</sup>
	12	29,9 ± 9,5 <sup>A</sup>	23,3 ± 12,5 <sup>A</sup>	24,5 ± 13,9 <sup>A</sup>	39,8 ± 9,4 <sup>A</sup>
	24	25,8 ± 11,6 <sup>A</sup>	25,1 ± 11,9 <sup>A</sup>	27,5 ± 11,5 <sup>A</sup>	29,3 ± 11,2 <sup>A</sup>
	36	24,7 ± 14,0 <sup>A</sup>	22,6 ± 11,2 <sup>A</sup>	26,4 ± 10,1 <sup>A</sup>	28,0 ± 9,5 <sup>A</sup>
	48	30,8 ± 2,4 <sup>A</sup>	21,3 ± 7,1 <sup>A</sup>	20,4 ± 11,8 <sup>A</sup>	23,5 ± 11,1 <sup>A</sup>
	60*	25,0 ± 0,0	16,3 ± 7,7	14,5 ± 0,0	25,0 ± 8,5
	72*		14,0 ± 0,0		7,5 ± 0,0
	Íntegros (%)	0	69,2 ± 16,6 <sup>A</sup>	60,8 ± 19,3 <sup>AB</sup>	45,7 ± 20,4 <sup>BC</sup>
24		42,9 ± 20,5 <sup>A</sup>	37,1 ± 20,7 <sup>A</sup>	27,0 ± 19,9 <sup>A</sup>	20,8 ± 20,3 <sup>A</sup>
48		28,2 ± 18,8 <sup>A</sup>	23,5 ± 18,0 <sup>A</sup>	13,3 ± 10,6 <sup>A</sup>	27,5 ± 31,4 <sup>A</sup>
Semi Lesados (%)	0	5,3 ± 7,2 <sup>a</sup>	2,5 ± 5,2 <sup>a</sup>	2,1 ± 5,4 <sup>a</sup>	1,2 ± 1,9 <sup>a</sup>
	24	9,1 ± 8,7 <sup>a</sup>	1,8 ± 2,7 <sup>ac</sup>	3,5 ± 6,5 <sup>ac</sup>	1,0 ± 2,1 <sup>bc</sup>
	48	8,5 ± 10,2 <sup>a</sup>	1,6 ± 3,4 <sup>ac</sup>	1,8 ± 7,1 <sup>bc</sup>	0,3 ± 0,8 <sup>ac</sup>
Lesados (%)	0	25,4 ± 13,6 <sup>C</sup>	36,7 ± 20,6 <sup>BC</sup>	52,2 ± 20,5 <sup>AB</sup>	62,1 ± 17,7 <sup>A</sup>
	24	48,0 ± 22,9 <sup>B</sup>	61,1 ± 21,2 <sup>AB</sup>	70,0 ± 23,5 <sup>AB</sup>	78,3 ± 19,6 <sup>A</sup>
	48	63,8 ± 28,6 <sup>a</sup>	74,9 ± 19,1 <sup>a</sup>	85,0 ± 11,6 <sup>a</sup>	72,2 ± 31,1 <sup>a</sup>

<sup>A..C</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Tukey.

<sup>a...c</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

\* Não avaliado em função do número amostral.

Supra Vital: % de espermatozoides vivos; HOST: % de células espermáticas reativas ao Teste Hiposmótico; Íntegros: % de espermatozoides com membrana celular íntegra ao Teste de Fluorescência; Semi-Lesados: % de espermatozoides com membrana celular semi lesada ao Teste de Fluorescência; Lesados: % de espermatozoides com membrana celular lesada ao Teste de Fluorescência.

TABELA 7: Percentual das amostras de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador analisadas de acordo com o tempo de resfriamento.

TEMPO (h)	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO
0	12 (100)	21 (100)	18 (100)	18 (100)
12	12 (100)	21 (100)	14 (77,8)	15 (83,3)
24	11 (91,7)	18 (85,7)	14 (77,8)	15 (83,3)
36	8 (66,7)	14 (66,7)	13 (72,2)	14 (77,8)
48	5 (41,7)	11 (52,4)	9 (50)	7 (38,9)
60	2 (16,7)	6 (28,6)	4 (22,2)	2 (11,1)
72		1 (4,8)		1 (5,6)

n () = número e percentual de amostras analisadas em cada tempo de resfriamento.

O conhecimento das interações entre os componentes do plasma seminal e a membrana plasmática dos espermatozóides em decorrência dos processos de criopreservação é de extrema importância (PARKS; GRAHAM, 1992). Segundo Fagundes et al. (2004), a presença, ausência ou concentração de proteínas do plasma seminal devem influenciar a fertilidade e a proteção da membrana espermática contra o choque térmico. Isto por que as proteínas presentes no plasma seminal, ao se ligarem à membrana espermática, provocam alterações bioquímicas que podem resultar numa mudança na permeabilidade da membrana, promovendo uma maior susceptibilidade aos danos celulares e choque térmico inerentes aos processos de criopreservação (MOORE; HIBBIT, 1976). Pickett et al (1975a) afirmaram que a alta concentração de plasma seminal é deletério às células espermáticas submetidas ao resfriamento. Já Pérez-Pé et al (2001) observaram que a adição de proteínas de baixo peso molecular (3 kDa) preveniu o choque térmico no sêmen de caprinos, resultando numa maior viabilidade do mesmo.

Martins et al (2006) não observaram correlações entre as características físicas e morfológicas do sêmen fresco com a concentração de proteínas totais solúveis do plasma seminal de caprinos, enquanto Gundogan (2006) demonstrou que as concentrações de proteínas totais presentes no sêmen de ovinos apresentaram correlação com a motilidade espermática, de forma que as maiores concentrações encontradas ocorreram no outono. Pinheiro et al (1996) e Catunda (2007) verificaram diferenças entre as concentrações de proteínas totais do plasma seminal de caprinos entre os períodos chuvoso e seco, assim como Pickett et al (1975b) que observaram variação sazonal na concentração de proteínas totais do plasma seminal de equinos

Esta variação sazonal não foi caracterizada no presente estudo, de forma que a concentração média de proteínas solúveis do plasma seminal se manteve em torno de 14,3 mg/mL ao longo das estações (Figura 3). Este valor está muito próximo daqueles citados por Töpfer-Petersen et al. (2005) (10 mg/mL), Fonseca (2006) (14,5-17,0 mg/mL), Ribas et al. (2006) (10,6-12,7 mg/mL), Barreto (2007) (12 mg/mL) e Zhan (2006) (12,1-14,6 mg/mL). Pacheco (2002) porém, observou uma variação considerável da concentração de proteína total do plasma seminal quanto à época do ano (16,70 mg/mL no outono a 27,07 mg/mL na primavera), sugerindo possível influência do fotoperíodo. Embora na região de Viçosa - MG a variação do fotoperíodo seja pequena (Anexo B), é imprudente associar esta característica ao resultado verificado. Até por que os efeitos do fotoperíodo podem ser modificados por fatores como temperatura, nutrição, condição corporal e idade (GRUBAUGH et al., 1982).

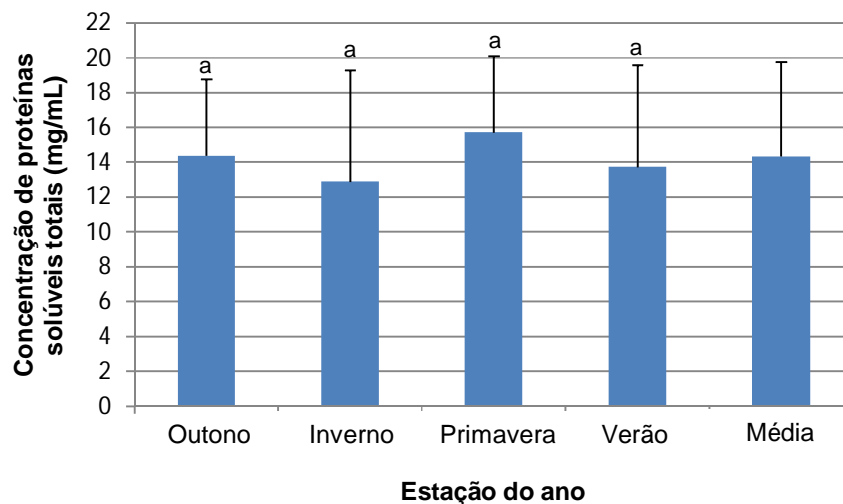


FIGURA 3: Concentração média das proteínas solúveis totais presentes no plasma seminal (mg/mL) de carneiros da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas. <sup>a</sup> Teste de Kuskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

Souza et al. (2002) observaram que a concentração de proteínas do plasma seminal de carneiros púberes se elevou na fase pós-púbere, em paralelo com o aumento das concentrações séricas de testosterona, sugerindo

que, após a puberdade, aumentos na secreção deste hormônio estimulam a síntese e secreção de proteínas andrógeno-dependentes, que podem estar relacionadas com a melhora detectada no quadro espermático dos animais. Estas associações, entretanto, não foram possíveis no presente estudo, provavelmente por se tratar de animais maduros sexualmente cujas secreções hormonais se encontram estabilizadas e com as concentrações variando dentro da normalidade fisiológica para a espécie, o que reflete num padrão de estimulação das glândulas sexuais acessórias e a atividade normal das células epiteliais das mesmas.

Davies Morel (2003) sugere que a produção de testosterona siga um ritmo circadiano e seja dependente da estação. Segundo Pickett et al. (1989), as concentrações deste hormônio estão elevadas às 06:00 e 18:00. Em estudo conduzido por Sharma (1976), as maiores concentrações deste hormônio foram observadas nas coletas realizadas às 08:00, corroborando com Kirkpatrick et al. (1976), enquanto Ganjam e Kenney (1975) observaram que as maiores concentrações ocorriam às 06:00. No presente estudo, entretanto, não foi observado um padrão regular de secreção deste andrógeno (Figura 3), assim como em pesquisa conduzida por Cox e Williams (1975).

A secreção da testosterona diferiu tanto entre animais (Apêndice B) quanto entre as estações (Figura 4 e Tabela 8). Neste estudo, as maiores concentrações foram observadas, de forma geral, entre 10:00 e 14:00, mas picos de secreção ocorreram ao longo das 24 horas de coleta em todas as estações. O mesmo foi sugerido por Nett (1993), baseado em estudo publicado por Clay et al. (1988), onde as maiores concentrações foram observadas com a proximidade da tarde.

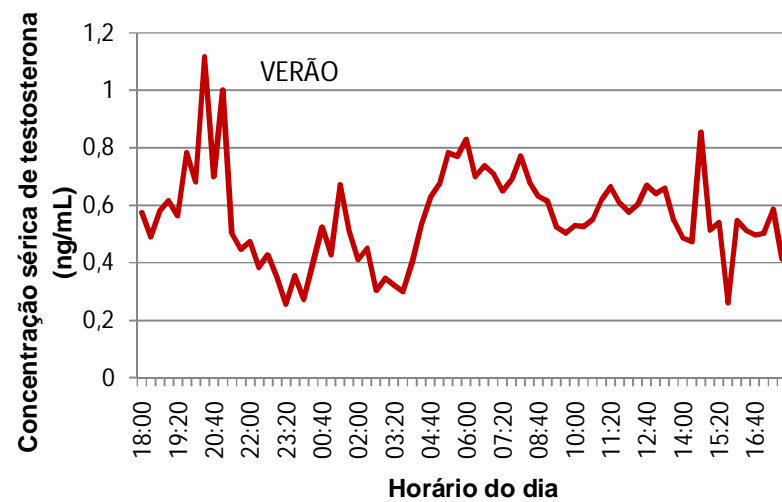
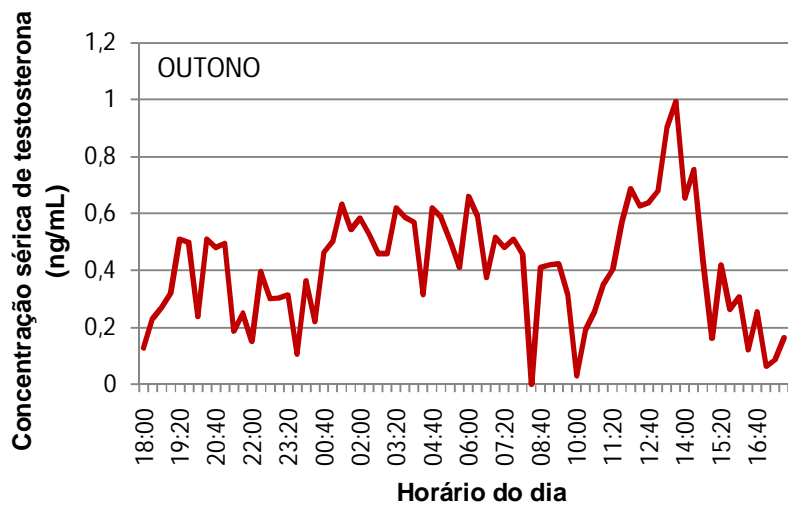


FIGURA 4: Padrão de secreção diário de testosterona (ng/mL) de garanhões da raça Mangalarga Marchador nas quatro estações climáticas.

Esta inconstância na concentração sérica da testosterona justifica as coletas em intervalos de 20 minutos. A grande maioria das pesquisas difere quanto à metodologia empregada, no sentido de que as amostras de sangue são geralmente únicas e obtidas em horários pré-determinados (normalmente no período das 08:00 às 10:00). A partir da análise da Figura 4, percebe-se a flutuação na secreção da testosterona que, além de pulsátil, não apresentou um comportamento bem definido entre as estações. Desta forma, a análise de uma única amostra, independente do horário de coleta, pode ser pouco fidedigna a real concentração deste hormônio, independente da estação, uma vez que a sua secreção não evidenciou um ritmo circadiano confiável. Nett (1993) sugere que, para a dosagem de hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular, as coletas de sangue devem ser realizadas num período mínimo de seis a oito horas e em intervalos de 30 minutos, já que a avaliação de uma única amostra pode estimar concentrações de três a quatro vezes diferentes.

Quanto à sazonalidade da secreção de testosterona, diversos são os estudos no que diz respeito à influência do fotoperíodo (BERNDTSON et al., 1974; HARRIS et al., 1982; JOHNSON; THOMPSON, 1983; COX et al., 1988; ROSER; HUGHES, 1992; HOFFMANN; LANDECK, 1999; PACHECO, 2002; LEME, 2003), de forma que, geralmente, as maiores concentrações são observadas durante a estação reprodutiva. Porém, a maioria das pesquisas é realizada em locais de clima temperado. Poucos são os dados relativos às regiões tropicais, onde, em função das baixas latitudes, além das estações climáticas serem menos definidas e os meses de inverno não serem necessariamente impróprios para a reprodução, as menores mudanças no comprimento do dia podem não ser suficientes para sinalizarem a sazonalidade (HEIDEMAN; BRONSON, 1993; JACKSON; BERNARD, 1999).

Segundo Bronson e Heideman (1994), o fotoperíodo não parece ser muito confiável para a regulação sazonal naqueles animais que vivem em latitudes inferiores a 30°. É o que demonstrou Pacheco (2002) em pesquisa realizada na região sudeste do país (~ 22° S) onde as concentrações médias de testosterona ao longo das estações do ano não apresentaram um comportamento sazonal, assim como Thompson et al. (1985) em pesquisa

realizada na Louisiana (~ 30° N), EUA. Além disso, existem evidências de que os ciclos reprodutivos circanuais possam ser gerados de maneira endógena em condições ambientais constantes (TUREK; VAN CAUTER, 1994).

Em função destas evidências, era de se esperar que os animais utilizados neste estudo também não apresentassem um comportamento sazonal quanto às concentrações séricas de testosterona. Porém, não foi o ocorrido: as maiores concentrações médias foram observadas nas estações de inverno e verão ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8). Cabe ressaltar que as médias das concentrações obtidas estão dentro dos valores de referência para garanhões, segundo Nachreiner e Hyland (1993).

TABELA 8: Média das concentrações séricas de testosterona (ng/mL) de reprodutores da raça Mangalarga Marchador nas quatro estações climáticas.

TURNO	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO	Média/turno
1 (18-21:40)	0,34 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,37 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,29 <sup>A</sup>
2 (22-01:40)	0,37 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,41 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,34 <sup>A</sup>
3 (02-05:40)	0,52 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,24 <sup>ac</sup>	0,31 ± 0,29 <sup>bc</sup>	0,49 ± 0,36 <sup>ac</sup>	0,43 ± 0,29 <sup>A</sup>
4 (06-09:40)	0,43 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,22 <sup>ab</sup>	0,36 ± 0,40 <sup>ac</sup>	0,67 ± 0,40 <sup>ab</sup>	0,52 ± 0,35 <sup>AC</sup>
5 (10-13:40)	0,51 ± 0,38 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,34 <sup>bc</sup>	0,46 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,19 <sup>ac</sup>	0,60 ± 0,34 <sup>BC</sup>
6 (14-17:40)	0,29 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,41 <sup>b</sup>	0,58 ± 0,39 <sup>b</sup>	0,51 ± 0,21 <sup>b</sup>	0,52 ± 0,36 <sup>AC</sup>
Média/estação	0,41 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,35 <sup>b</sup>	0,42 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,33 <sup>b</sup>	0,49 ± 0,33

<sup>A,C</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

<sup>a,c</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

As interrelações existentes entre o meio ambiente, a nutrição e a reprodução são sem dúvida importantes, advindo daí uma constante carência de novos estudos e a abordagem de conceitos recentes, que levem a um entendimento mais preciso de como os fatores ambientais e nutricionais interferem sobre os mecanismos reprodutivos (GRUNERT et al., 2005), considerando muitos outros elementos além daqueles já estudados (LEME, 2003). Assim sendo, um fator que deve ser considerado é que, uma vez que o fotoperíodo da região de Viçosa apresenta pouca variação no comprimento do dia (diferença de cerca de duas horas e meia entre o maior e o menor dia do ano), os animais podem responder a variações ambientais mais marcantes a despeito desta variável, como a temperatura ambiental, pluviosidade e disponibilidade de alimento. É o que parece ocorrer ao se comparar a época de início da estação de monta para éguas alojadas em algumas cidades próximas

à Viçosa (local onde o experimento foi conduzido), onde a variação do fotoperíodo é praticamente a mesma. Ainda, devem-se considerar as diferenças entre as características reprodutivas dos machos e fêmeas sazonais de uma mesma espécie, o que pode estar relacionado a diferentes formas de regulação ambiental. Por mais que tenham sido observadas diferenças nas concentrações médias deste hormônio entre as estações, não foi observada nenhuma correlação importante com quaisquer outras características estudadas, o que sugere que este aumento, por mais que significativo, não implicou numa variação marcante quanto à fisiologia reprodutiva dos animais.

A maior correlação observada ( $p < 0,05$ ) se deu entre as concentrações médias de testosterona com o número de espermatozóides presentes no ejaculado (0,30), característica esta que não sofreu variação sazonal, o que permite supor que a função germinativa dos testículos foi ainda menos afetada pela estação do que a função endócrina. Este fato vai de acordo com os achados referentes às biometrias testiculares (Tabela 9) dos animais utilizados no estudo, uma vez que o número de espermatozóides presentes no ejaculado, após a estabilização das reservas espermáticas extra-gonádicas, é frequentemente relacionado ao tamanho e volume gonadais (LOVE et al., 1991; SILVA et al., 1996; BLANCHARD, 2001; ROBALO SILVA, 2007).

Segundo Pickett (1993b), garanhões com largura testicular total menor que 80 mm não devem ser aprovados como reprodutores, por que além de serem potencialmente mau produtores de espermatozóides, eles podem sofrer problemas reprodutivos futuros ou até mesmo passar características genéticas de hipoplasia para a progênie (LOPATE et al., 2003). Baseado nestas constatações, verifica-se que os animais utilizados são considerados reprodutores normais, embora a ocorrência de uma variação na média do volume testicular direito tenha sido reflexo direto de uma hidrocele mais pronunciada neste testículo observada em um dos animais durante o período experimental. Isto pode ser comprovado pela análise dos dados da Tabela 10, que demonstra que o animal 3 apresentou o comportamento mais heterogêneo frente as diferentes estações.



TABELA 9: Biometrias testiculares de reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.

CARACTERÍSTICA	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO	
Altura (cm)	6,6 ± 0,1 <sup>A</sup>	6,5 ± 0,6 <sup>A</sup>	6,5 ± 0,8 <sup>A</sup>	6,5 ± 0,4 <sup>A</sup>	
Testículo Direito	Comprimento (cm)	10,2 ± 0,8 <sup>A</sup>	9,2 ± 0,9 <sup>A</sup>	8,9 ± 0,9 <sup>A</sup>	9,2 ± 0,5 <sup>A</sup>
	Largura (cm)	5,8 ± 0,3 <sup>A</sup>	5,5 ± 0,5 <sup>A</sup>	5,9 ± 0,5 <sup>A</sup>	5,7 ± 0,4 <sup>A</sup>
	Volume (cm <sup>3</sup> )	230,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	169,6 ± 30,8 <sup>bc</sup>	172,6 ± 28,9 <sup>b</sup>	180,2 ± 17,0 <sup>bd</sup>
Testículo Esquerdo	Altura (cm)	6,8 ± 0,3 <sup>A</sup>	6,8 ± 0,6 <sup>A</sup>	6,7 ± 0,9 <sup>A</sup>	6,8 ± 0,5 <sup>A</sup>
	Comprimento (cm)	9,9 ± 1,3 <sup>A</sup>	9,5 ± 0,9 <sup>A</sup>	9,5 ± 0,7 <sup>A</sup>	9,1 ± 0,8 <sup>A</sup>
	Largura (cm)	5,9 ± 0,4 <sup>A</sup>	6,1 ± 0,6 <sup>A</sup>	6,1 ± 0,6 <sup>A</sup>	5,8 ± 0,4 <sup>A</sup>
Volume (cm <sup>3</sup> )	211,1 ± 30,0 <sup>a</sup>	205,0 ± 50,2 <sup>a</sup>	202,4 ± 46,1 <sup>a</sup>	189,2 ± 30,8 <sup>a</sup>	
Largura Testicular Total (cm)	14,4 ± 5,5 <sup>a</sup>	10,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	10,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	10,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	
Volume Testicular Combinado (cm <sup>3</sup> )	416,1 ± 51,4 <sup>a</sup>	374,6 ± 72,8 <sup>a</sup>	375,0 ± 64,4 <sup>a</sup>	369,4 ± 43,0 <sup>a</sup>	

<sup>A..C</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Tukey.

<sup>a...c</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

TABELA 10: Volumes testiculares (cm<sup>3</sup>) individuais de reprodutores da raça Mangalarga Marchador nas quatro estações climáticas.

CARACTERÍSTICA	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO
ANIMAL 1				
VTD	205,0 ± 21,6 a	165,6 ± 30,9 ab	192,9 ± 26,2 ac	172,0 ± 22,6 a
VTE	174,8 ± 0,0 a	188,6 ± 15,1 a	195,8 ± 33,4 a	186,3 ± 16,2 a
VTC	357,1 ± 0,0 a	354,2 ± 44,9 a	388,6 ± 58,1 a	358,4 ± 35,9 a
ANIMAL 2				
VTD	182,4 ± 0,0 a	167,5 ± 28,7 bc	171,4 ± 17,4 ac	178,5 ± 14,7 a
VTE	206,3 ± 0,0 a	177,6 ± 29,7 b	174,2 ± 7,7 b	175,8 ± 14,9 b
VTC	402,1 ± 0,0 a	345,1 ± 55,4 b	345,6 ± 21,5 b	354,3 ± 29,0 a
ANIMAL 3				
VTD	195,9 ± 0,0 a	174,4 ± 33,1 bc	162,8 ± 34,9 b	187,9 ± 11,5 ac
VTE	244,1 ± 0,0 a	244,5 ± 57,1 a	175,8 ± 14,9 ab	207,1 ± 42,2 ac
VTC	474,5 ± 0,0 a	418,9 ± 82,6 a	399,0 ± 84,5 a	395,0 ± 50,3 a

<sup>a...c</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

VTD: volume do testículo direito; VTE: volume do testículo esquerdo; VTC: volume testicular combinado.

Porém, a hidrocele não foi suficiente para afetar a qualidade seminal deste animal – a consistência, formato, tamanho e ecotextura testiculares não diferiram dos padrões apresentados tanto entre os dois testículos quanto pelos demais animais ( $p > 0,05$ ). Além disso, as avaliações seminais dos animais

foram homogêneas, de forma semelhante às observações feitas por Amaral (1997) ao estudarem animais com e sem hidrocele. Segundo esta autora, a hidrocele nos eqüinos pode ter causas variadas e as conseqüências sobre o potencial reprodutivo estão na dependência do tipo de fator desencadeante e da presença de outras patologias. Neste caso, a hidrocele foi caracterizada como idiopática, uma vez que o acúmulo de líquido escrotal não foi associado a processos patológicos.

Como todos os animais utilizados neste estudo apresentaram consistência testicular normal e biometrias constantes ao longo das estações (Tabela 10), a estreita correlação entre o volume testicular e a produção de espermatozóides permite concluir que é possível prever a produção aproximada de espermatozóides a partir do volume testicular. Isto significa que a determinação da dimensão e da consistência testicular deveria ser sistematicamente associada à avaliação das características seminais nos exames de avaliação do potencial reprodutivo de cada garanhão (ROBALO SILVA, 2007). Isto por que o tamanho e volume testiculares são medidas diretas da quantidade de parênquima presente no tecido (THOMPSON et al., 1979).

Segundo Gábor et al. (1998), a utilização de imagens ultrassonográficas também podem ser utilizadas para prever a capacidade espermatogênica. Coulter e Bailey (1988) verificaram correlação de 0,50 ( $p < 0,05$ ) entre ecotextura testicular e área de túbulos seminíferos, ao avaliarem a função testicular de touros. No presente estudo, o número de pixels se manteve praticamente constante ao longo do período experimental (Tabela 11), provavelmente em reflexo da estabilidade do número de células espermáticas em estágio final de maturação presentes no lúmen dos túbulos seminíferos. O aumento ocorrido no verão parece ser decorrente das maiores temperaturas ambientais características desta época, uma vez que esta característica apresentou alta correlação (0,54;  $p < 0,05$ ) com a temperatura de bulbo seco. Esta constatação corrobora com Ferreira e Silva (2009), que observaram que a ecodensidade testicular varia em função do horário do dia, de forma que as maiores ecogenicidades ocorrem nos horários mais quentes.

TABELA 11: Ecotexturas testiculares de reprodutores da raça Mangalarga Marchador ao longo das estações climáticas.

ECOTEXTURA	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO
TD	127,9 ± 2,8 <sup>Ba</sup>	128,4 ± 1,4 <sup>Ba</sup>	128,3 ± 5,1 <sup>Ba</sup>	133,5 ± 1,8 <sup>Aa</sup>
TE	129,8 ± 1,7 <sup>Ba</sup>	128,2 ± 1,9 <sup>Ba</sup>	128,7 ± 2,2 <sup>Ba</sup>	133,1 ± 1,5 <sup>Aa</sup>
TDE	128,8 ± 1,8 <sup>B</sup>	128,3 ± 1,4 <sup>B</sup>	128,5 ± 3,1 <sup>B</sup>	133,3 ± 1,2 <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Tukey.

<sup>a</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Wilcoxon.

TD: testículo direito; TE: testículo esquerdo; TDE: testículo direito e esquerdo.

As análises computacionais das imagens geradas demonstraram que o parênquima testicular dos animais apresentou ecogenicidade homogênea independente do eixo ou superfície examinada, permitindo a avaliação de uma média de todos os pontos aferidos (TDE) por animal a cada coleta de dados.

No presente estudo, os dados referentes à ultrassonografia testicular apresentaram um comportamento quadrático (Figura 5), de forma que não foi observada diferença na queda dos valores obtidos nas três primeiras estações, sendo diferente somente no verão ( $\hat{Y} = 134,814 - 6,4973x + 1,5187x^2$ , onde  $x$ =estação e  $y$ =ecotextura estimada;  $R^2=0,42$ ;  $p=0,00001$ ). Contudo, esta diferença não refletiu em alterações nos valores médios obtidos para a maioria das características estudadas.

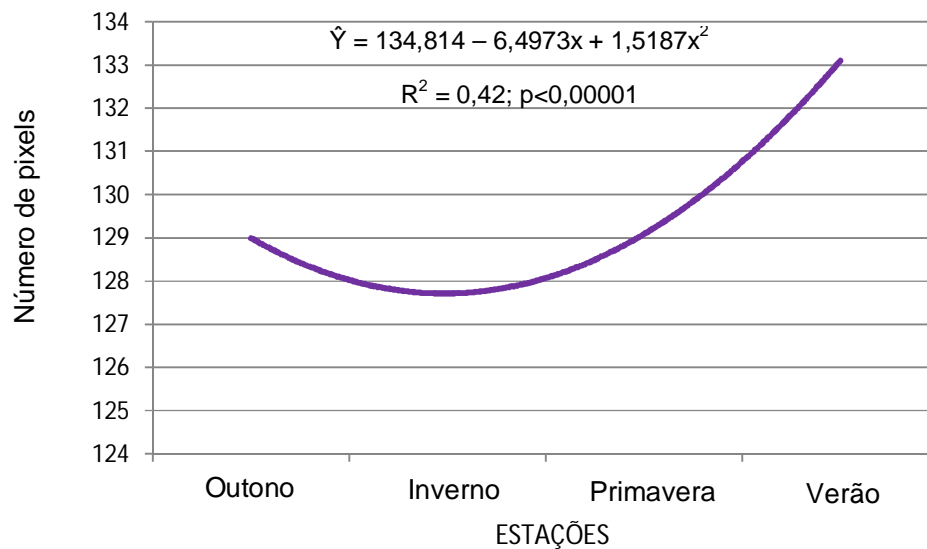


FIGURA 5: Ecotexturas testiculares de garanhões da raça Mangalarga Marchador em função das quatro estações climáticas.

## 5. CONCLUSÃO

- O volume do ejaculado com ou sem a fração gel e a motilidade espermática mostraram-se influenciados pela estação do ano, enquanto as demais características seminais estudadas não foram alteradas pelos efeitos sazonais.
- A melhor época para resfriamento do sêmen foi no outono e a pior foi o verão.
- O plasma seminal não sofreu alteração quanto à concentração de proteínas solúveis ao longo das estações climáticas.
- O padrão de secreção da testosterona não apresentou um ritmo circadiano bem definido e as médias de secreção variaram com a estação climática, porém sem apresentar nenhuma correlação importante com as características estudadas.
- As biometrias testiculares não sofreram influência sazonal e as ecotexturas testiculares foram influenciadas pelo clima.
- De acordo com os valores dos parâmetros fisiológicos obtidos no período experimental, os animais apresentaram-se adaptados ao ambiente em que permaneceram alojados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. G. G.; RIBEIRO FILHO, A. L.; SNOECK, P. P. N.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, R. F.; PORTELA, A. P. M.; ALMEIDA, A. K.; MELO, M. I. V.; HENRY, M. Efeito da solução, da fixação em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para sêmen eqüino congelado. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 219-225. 2005.

AMANN, R. P.; CRISTANELLI, M. J.; SQUIRES, E. L. Proteins in stallion seminal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v. 35, p. 113-120. 1987.

AMANN, R. P. Functional anatomy of the adult male. In: *McKINNON*, A. O.; VOSS, J. L. (Eds). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993a. p. 645-657.

AMANN, R. P. Physiology and Endocrinology. In: *McKINNON*, A. O.; VOSS, J. L. (Eds). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993b. p. 658-685.

AMARAL, D. **Hidrocele idiopática da cavidade vaginal em garanhões e sua influência sobre o comportamento sexual e características seminais**. 1997. 75 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

ANDRADE MOURA, J. C.; MERKT, H. **A Ultra-sonografia na Reprodução Eqüina**. 2ª ed. Salvador: Ed. Universitária Americana, 1996. 162 p.

ARGO, C. M.; COX, J. E.; GRAY, J. L. Effect of oral melatonin treatment on the seasonal physiology of pony stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v. 44, p. 115-125. 1991.

BACCARI Jr., F. Métodos e técnicas de avaliação de adaptabilidade às condições tropicais In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOCLIMATOLOGIA ANIMAL NOS TRÓPICOS - PEQUENOS E GRANDES RUMINANTES, 1., 1986, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: EMBRAPA/CNPc, 1986. p. 9-17.

BARRETO, M. A. P. **Efeito das proteínas do plasma seminal eqüino com massa superior a 10 KDa sobre a congelabilidade do sêmen, reação inflamatória uterina e fertilidade**. 2007. 67 p. Tese (Doutorado em Produção

Animal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacases, 2007.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1<sup>st</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BERLINER, V. R. Dilutors for stallion and jack semen. **Journal of Animal Science**, v. 1, p. 314-319. 1942.

BERNDTSON, W. E.; SQUIRES, E. L.; THOMPSON, D. L. Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. **Theriogenology**, v. 20, p. 449-457. 1983.

BERNDTSON, W. E.; PICKETT, B. W.; NETT, T. M. Reproductive physiology of the stallion IV. Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, p. 115-118. 1974.

BITTMAR, A.; KOSINIAK, K. The role of selected biochemical components of equine seminal plasma in determining suitability for deep-freezing. **Archivum Veterinarium Polonicum**, v. 32, p. 17-28. 1992.

BLANCHARD, T. L.; JOHNSON, L.; BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; RIGBY, S. L.; HURTGEN, J.P. Evaluation of testicular size and function in 1-3-year-old stallions. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 47., 2001, San Diego. **Proceedings...** San Diego: AAEP, 2001. p. 232-235.

BLOM, E. Pathological conditions in the genital organs and in semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark, **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 35, p. 105-130. 1973.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p. 75-88. 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254. 1976.

BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, p. 863-873. 1999.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; UNANIAN, M. M.; KASTELIC, J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos Taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 1-15. 2003.

BRONSON, F.H.; HEIDEMAN, P.D. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: KNOBILL, E.; NEILL, J.D. (Eds) **The Physiology of Reproduction**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press, 1994. p. 541-84.

BUFFINGTON, C. S.; COLLAZO-AROCHO, A., CANTON, G. H.; PITY, D.; TATCHER, E.E.; COLLIDER, R.T. **Black globe humidity confort index for dairy cows**. St. Joseph: American Society Agricultural Engineers, 1977, 19 p. (Paper, n. 77-4517).

CALVETE, J. J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H.; KLUG, E.; TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 29, p. 411-426. 1994.

CATUNDA, A. G. V. **Composição bioquímica do plasma seminal de caprinos sem padrão racial definido (SPRD) em clima tropical úmido**. 2007. 39 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CAZALES, N.; ELHORDOY, D.; COSTA, G.; ESTÉVEZ, J.; HERNÁNDEZ, S.; CARLUCCIO, J. Seasonal variations in equine seminal parameters in Uruguay – Preliminary results. **Animal Reproduction Science**, Abstract, v. 107, p. 315. 2008.

CHANDOLIA, R. K.; BARTLEWSKI, P. M.; OMEKE, B. C.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C.; PIERSON, R. A. Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs effects of a GnRH agonist. **Theriogenology**, v. 48, p. 99-117. 1997a.

CHANDOLIA, R. K.; HONARAMOOZ, A.; OMEKE, B. C.; PIERSON, R.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Assessment of development of the testes

and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**, v. 48, p. 119-132. 1997b.

CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.; BRILLARD, J. P.; FOSTIER, A. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. **Animal**, v. 1, p. 419-432. 2007.

CHEUNG, S. S.; McLELLAN, T. M. Heat acclimation, aerobic fitness and hydration effects on tolerance during uncompensable heat stress. **Journal of Applied Physiological**, v. 84, p. 1731-1739. 1998.

CIPOLLA-NETO J.; AFECHE, S. C. Glândula Pineal. In: AIRES, M. M. (Org.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2008. p. 980-990.

CLAY, C. M.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Influences of seasonal and artificial photoperiod on stallions: testicular size, seminal characteristics and sexual behavior. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 517-525. 1987.

CLAY, C. M.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P.; NETT, T. M. Influences of season and artificial photoperiod on stallions: luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 1246-1255. 1988.

COELHO, L. B. N.; DA-SILVA, E. R. Flutuação populacional de *Agallia incongrua* Oman, 1938 (hemíptera: cicadellidae) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Biota neotropica**, v. 3, n. 2. 2003.

COELHO, L. A.; SASA, A.; NADER, C. E.; CELEGUINI, E. C. C. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 544-549. 2006.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 2ª ed. Belo Horizonte. 1998. 49 p.

COULTER, G. H; BAILEY, D. R. C. Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. **Theriogenology**, v. 30, p. 743-749. 1988.



CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA E PECUÁRIA – CNA. **CNA defende crescimento do agronegócio cavalo.** Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/noticias/cna-defende-crescimento-do-agronegocio-cavalo>>. Acesso em: 15 de março de 2010.

COSTA, M. D. Melhoramento genético de eqüídeos. SIMPÓSIO DE EQUIDECULTURA, 2., 2009, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2009. p. 133-155.

COX, J. E.; WILLIAMS, J. H. Some Aspects of the Reproductive Endocrinology of the Stallion and Cryptorchid. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v. 23, p. 75-79. 1975.

COX, J. E.; REDHEAT, P. H.; JAWARD, N. M. A. The effect of artificial photoperiod at the end of the breeding season on plasma testosterone concentrations in stallions. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, p. 239-241. 1988.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999. 528 p.

CURTIS, S. E. **Environmental management in animal agriculture.** Iowa: Iowa State University Press, 1983. 410 p.

DAVIES MOREL, M. C. G. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management.** 2<sup>sd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 357 p.

DOWSETT, K. F.; KNOTT, L. M. The influence of age and breed on stallion semen. **Theriogenology**, v. 46, p. 397-412. 1996.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 663 p.

EILTS, B. E. **Stallion breeding soundness examination.** Disponível em: <<http://www.vetmed.lsu.edu/eiltslotus/theriogenology-5361/stallion.htm>>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2010.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ – ESALQ. **Estudo do Complexo Agronegócio Cavalo no Brasil.** Brasília: CEPEA, 2006. 68p. (Coletânea de Estudos Gleba; n. 40).

FAGUNDES, B.; SILVA, J. F. S.; SOUZA, G. V.; RETAMAL, C.; DETMANN, E.; TILBURG, M. F. Analysis of equine frozen/thawing semen using seminal plasma proteins in different concentrations. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Porto Seguro: CBRA, 2004. p. 494.

FERNANDES, C. E.; PIMENTEL, C. A. Características seminais e fertilidade em garanhões. **Ciência Rural**, v. 32, p. 829-834. 2002.

FERREIRA, M. C. M.; MEDEIROS, L. F. D.; VIEIRA, D. H.; QUINTANILHA, J. R. M.; SCHERER, R. J.; BORGES, R. J. C. L. Reações fisiológicas de caprinos de diferentes raças mantidos à sombra, ao sol e em ambiente parcialmente sombreado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 16., 2006, Pernambuco. **Anais eletrônicos...** Pernambuco: ZOOTEC, 2006. Disponível em:

<[http://www.abz.org.br/files.php?file=documentos/R0056\\_3\\_171725998.pdf](http://www.abz.org.br/files.php?file=documentos/R0056_3_171725998.pdf)>.

Acesso em: 13 de março de 2010.

FERREIRA, B. X.; SILVA, E. V. C. Efeito de variáveis metodológicas sobre a leitura da econdensidade ultra-sonográfica testicular de touros jovens Nelore. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍCA DA UFMS, 10., 2009, Campo Grande. **Anais eletrônicos...** Campo Grande: UFMS, 2009. Disponível em:

<<http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=437>>.

Acesso em: 15 de maio de 2010.

FONSECA, C. W. **Efeito de uma nova técnica de coleta fracionada sobre a composição do plasma seminal e qualidade do sêmen eqüino pós-descongelamento.** 2006. 89 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>>

Acesso em: 13 de junho de 2010.

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M. SDS-Page characterization of the protein in equine seminal plasma. **Theriogenology**, v. 46, p. 579-591. 1996.

GÁBOR, G.; SASSER, R. G.; KASTELIC, J. P.; MÉZES, M.; FALKAY, Gy; BOZÓ, S.; VOLGYI CSIK, J.; BÁRANY, I.; HIDAS, A.; SZÁSZ JR., F.; BOROS, G. Computer analysis of vídeo and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. **Theriogenology**, v. 50, p. 223-228. 1998.

GANJAM, V. K.; KENNEY, R. M. Androgens and Estrogens in Normal and Cryptorchid Stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v. 23, p. 67-73. 1975.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reprodução Animal**. 6ª ed. São Paulo: Ed. Manole, 1995. p. 167-190.

GERLACH, T.; AURICH, J. E. Regulation of seasonal reproductive activity in stallion, ram and hamster. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 197-213. 2000.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare**. Wisconsin: Cross Plains. 1986. 378p.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. Wisconsin: Cross Plains. 1992. 642p.

GOULETSOU, P. G.; AMIRIDIS, G. S.; CRIPPS, P. J.; LAINAS, T.; DELIGIANNIS, K.; SARATIS, P.; FTHENAKIS, G. C. Ultrasonographic appearance of clinically healthy testicles and epididymes of rams. **Theriogenology**, v. 59, p. 1959-1972. 2003.

GRUBAUGH, W.; SHARP, D. C.; BERGLUND, L. A.; McDOWELL, K. J.; KILMER, D. M.; SEAMANS, K. W. Effects of pinealectomy in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v. 32, p. 292-295. 1982.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G.; BIRGEL Jr, E. H. (Col.). Efeitos do meio ambiente e da nutrição sobre a reprodução. In: \_\_\_\_\_. **Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos: Ginecologia** São Paulo: Ed. Varela. 2005. p. 127-180.

GUNDOGAN, M. Some Reproductive Parameters and Seminal Plasma Constituents in Relation to Season in Akkaraman and Awassi Ram. **Turk Journal Vet. Animal Science**, v. 30, p. 95-100. 2006.

HANCOCH, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Royal Microscopic Society**, v. 76, p. 84-97. 1957.

HARRIS, J. M.; IRVINE, G. H. G.; EVANS, M. J. Seasonal changes in serum levels of FSH, LH and testosterone and in semen parameters in stallions. **Theriogenology**, v. 19, p. 311-321. 1982.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352. 1990.

HEIDEMAN, P. D.; BRONSON, F. H. Sensitivity of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) to amplitudes and rates of photoperiodic change typical of the tropics. **Journal of Biological Rhythms**, v. 8, p. 325-337. 1993.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. v. 36. Rio de Janeiro, 2008. 55p.

IRVINE, C. H. G.; ALEXANDER, S. Importance of testicular hormones in maintaining the annual pattern of LH secretion in the male horse. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v. 32, p. 97-102. 1982.

JACKSON, C.; BERNARD, R. T. F. Short day length alone does not inhibit spermatogenesis in the seasonally breeding four-striped field mouse (*Rhabdomys pumilio*). **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1320-1323. 1999.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Distúrbios reprodutivos nos machos. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reprodução Animal**. 6ª ed. São Paulo: Editora Manole. 1995. p. 291-301.

JANETT, F.; THUN, R.; NIEDERER, K.; BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. **Theriogenology**, v. 60, p. 453-461. 2003a.

JANETT, F.; THUN, R.; BETTSCHEN, S.; BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 213-221. 2003b.

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

JASKO, D. J. LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion. **Theriogenology**, v. 35, p. 317-327. 1991b.

JOHNSON, L.; THOMPSON, D. L. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of FSH, LH and testosterone in stallions. **Biology of Reproduction**, v.29, p.777-789. 1983.

JOHNSON, L. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 1181-1190. 1985.

JOHNSON, L.; NGUYEN, H. B. Annual cycle of the Sertoli cell population in adult stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, p. 311-316. 1986.

JOHNSON, L.; THOMPSON, 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**, v. 35, p. 971-979. 1986.

JOHNSON, L.; TATUM, M. E. Temporal appearance of seasonal changes in numbers of Sertoli cells, Leydig cells and germ cells in stallions. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 994-999. 1989.

JUCÁ, A. F. **Avaliação ultra-sonográfica dos testículos e das glândulas sexuais acessórias de ovinos da raça Santa Inês**. 2005. 94 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) – Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2008. 916 p.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; PIERSON, R. A.; COULTER, G. H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 65, p. 111-115. 2001.

KIRKPATRICK, J. F.; VAIL, R.; DEVOUS, S.; SCHWEND, S.; BAKER, C. B.; WIESNER, L. Diurnal variation of plasma testosterone in wild stallions. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 98-101. 1976.

LAY Jr, D. C.; WILSON, M. E. Physiological indicators of stress in domestic livestock. In: INTERNATIONAL ANIMAL AGRICULTURE AND FOOD SCIENCE CONFERENCE, 2001, Indianapolis. **Anais eletrônicos...** Indianapolis: American Dairy Science Association, American Society of Animal Science, Poultry Science Association, 2001. Disponível em: <<http://www.fass.org/fass01/pdfs/lay.pdf>>. Acesso em: 15 de abril de 2010.

LEME, D. P. **Características reprodutivas de garanhões mantidos sob luz natural contínua, em ambiente tropical**. 2003. 85 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

LEWIS, L. D. **Nutrição Clínica Equina: Alimentação e Cuidados**. 1ª ed. São Paulo: Ed. Roca, 2000. 710p.

LOPATE, C.; LEBLANC, M.; KNOTTENBELT, D. The Stallion. In: KNOTTENBELT, D. C.; LEBLANC, M.; LOPATE, C.; PASCOE, R. R. **Equine stud farm medicine and surgery**. London: Ed. Elsevier Science, 2003. p. 43-112.

LOVE, C. C.; GARCIA, M. C.; RIERA, F. R.; KENNEY, R. M. Evaluation of measures taken by ultrasonography and calipers to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v. 44, p.99-105. 1991.

LOVE, C. C. Ultrasonographic evaluation of the testis, epididymis and spermatic cord of the stallion. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, p. 167-182. 1992.

LOVE, C. C. Evaluation of Stallion Sperm Morphologic Features. In: WORKSHOP ADVANCED CURRENT TOPICS IN STALLION VETERINARY PRACTICE, 2000, Krakow. **Contents...** Krakow: Dorothy Russell Havemeyer Foundation. Disponível em: <<http://research.vet.upenn.edu/HavemeyerEquineBehaviorLabHomePage/ReferenceLibraryHavemeyerEquineBehaviorLab/HavemeyerWorkshops/AdvanceCurrentTopicsinStallionVeterinaryPrac/AdvancedCurrentTopicsinStallionVeterinaryPra/EvaluationofStallionSpermMorphologicFeatures/tabid/3092/Default.aspx>>. Acesso em: 11 de março de 2010.

MALPAUX, B.; THIÉRY, J. C.; CHEMINEAU, P. Melatonin and the seasonal control of reproduction. **Reproduction Nutrition Development**, v. 39, p. 355-366. 1999.

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

MALPAUX, B. Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. In: NEILL, J.D. (Ed.), **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3<sup>a</sup> Ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press Publications. 2006. p. 2231-2281.

**MALSCHITZKY, E. Estresse e bem estar em eqüinos.** Disponível em: <<http://www.cabanhaamarante.com.br>> . Acesso em: 20 de março de 2010.

MARTINS, L. F.; PEREIRA, M. C. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; SILVEIRA, T. S.; TORRES, C. A. A.; RODRIGUES, M. T.; BRAZ, V. B. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis do plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, Suplemento n. 4, p. 1653-1659. 2006.

MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353-1362. 1999.

MELO, M. I. V. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino.** 1999. 104 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 71-78. 1999.

MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 757-763. 2005.

MIES FILHO, A. Fisiologia do aparelho genital masculino: função espermátogênica e função endócrina do testículo. In: \_\_\_\_\_. **Reprodução**

**dos animais e inseminação artificial.** Porto Alegre: Ed. Sulina, 1975. p. 99-133.

MOORE, H. D. M.; HIBBIT, K. C. S. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 46, p. 71-76. 1976.

MUYAN, M.; ROSER, J. F.; DYBDAL, N.; BALDWIN, D. M. Modulation of gonadotropin-releasing hormone stimulated luteinizing hormone release in cultured male equine anterior pituitary cells by gonadal steroids. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 340-345. 1993.

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

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 245-262. 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of horse.** 6<sup>th</sup> ed. Washington, DC: National Academy Press, 2007. 360 p.

NETT, T. M. Reproductive endocrine functions testing in stallions. In: *McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds). Equine reproduction.* Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. p. 821-824.

NONNO, R.; CAPSONI, S.; LUCINI, V.; MOLLER, M.; FRASCHINI, F.; STANKOV, B. Distribution and characterization of the melatonin receptors in the hypothalamus and pituitary gland of three domestic ungulates. **Journal of Pineal Research**, v. 18, p. 207-216. 1995.

OLIVEIRA, L. A.; CAMPEL, J. E. G.; AZEVEDO, D. M. M. R.; COSTA, A. P. R.; TURCO, S. H. N.; MOURA, J. W. S. Estudo de respostas fisiológicas de eqüinos sem raça definida e da raça Quarto de Milha às condições climáticas de Teresina, PI. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 827-838. 2008.

PACHECO, J. C. G. **Efeito da sazonalidade sobre os níveis séricos da testosterona e o perfil protéico do plasma seminal eqüino.** 2002. 68 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.



PALUDO, G. R.; Mc MANUS, C.; MELO, R. Q.; CARDOSO, A. G; MELLO, F. P.; MOREIRA M.; FUCK, B. H. Efeito do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do exercito brasileiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1130-1142. 2002.

PARKINSON, T. J. Seasonal variations in semen quality of bulls: correlations with environmental temperature. **The Veterinary Record**, v. 120, p. 479-482. 1987.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222. 1992.

PASTORE, A. A. Contribuição da ultra-sonografia na avaliação andrológica de bovinos da raça Nelore. 2008. 63 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

PECHMAN, R. D.; EILTS, B. E. B-mode ultrasonography of the bull testicle. **Theriogenology**, v. 27, p. 431-441. 1987.

PÉREZ-PÉ, R., CEBRIÁN-PÉREZ, J. A., MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p. 425-434. 2001.

PICKETT, B. W.; GEBAUER, M. R.; SEIDEL, G. E. Jr; VOSS, J. L. Reproductive physiology of the stallion: spermatozoal losses in the collection equipment and gel. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 165, p. 708-710. 1974.

PICKETT, B. W.; SULLIVAN, J. J. BYERS, W. W.; PACE, M. M.; REMMENGA, E. E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 26, p. 167-174. 1975a.

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

PICKETT, B. W.; FAULKNER, L. C.; SEIDEL Jr, G. E.; BERNDTSON, W. E.; VOSS, J. L. Reproductive physiology of the stallion. VI. Seminal and behavioral characteristics. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 627-625. 1976.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P.; MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VOSS, J. L. Management of the stallion for maximum reproductive efficiency. II. In: **Bulletin of the Colorado State University Agriculture Experimental Station Animal Reproduction Laboratory General Series**, n. 05., p. 121-125. 1989.

PICKETT, B. W. Collection and evaluation of stallion semen for artificial insemination. In: *McKINNON, A. O. & VOSS, J. L. (Eds). Equine reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993a. p. 705-714.

PICKETT, B. W. Reproductive evaluation of the stallion. In: *McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds). Equine reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993b. p. 755-768.

PICOCK, J. F. **Artificial insemination using chilled semen**. Disponível em: <<http://www.pycock.co.uk/articles.htm>>. Acesso em: 21 de março de 2010.

PIMENTEL, C. A.; CARNEIRO, G. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução de eqüinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p.145-159.

PINHEIRO, R. R.; MALHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros bioquímicos do PS de 3 tipos raciais de caprinos do Nordeste do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza, Anais... Fortaleza: SBZ, 1996. p. 416-418.

POZOR, M. Diagnostic applications of ultrasonography to stallion`s reproductive tract. **Theriogenology**, v. 64, p. 505-509. 2005.

POZOR, M. A.; McDONNELL, S. M. Ultrasonographic measurements of accessory sex glands, ampullae, and urethra of normal stallions of various size types. **Theriogenology**, v. 58, p. 1425-1433. 2002.

RAPHAEL, C. F. Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado. 2007. 111 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

REECE, W. O. **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 926 p.

RIBAS, J. A. S.; SILVA, J. F. S.; CUNHA, I. C. N.; RETAMAL, C.; QUIRINO, C. R. Variação sazonal das proteínas do plasma seminal de cavalos pantaneiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 33., 2006, Cuiabá, **Anais eletrônicos...** Cuiabá: Somatovet, 2006. Disponível em: <<http://www.famato.org.br/arquivos/Trabalhos%20Cientificos%20XXXIII%20Conbravet.pdf>>. Acesso em: 07 de março de 2010.

ROBALO SILVA, J.; AGRÍCOLA, R.; BARBOSA, M.; LOPES da COSTA, L. Variação sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sêmen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 119-125. 2007.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ZHANG, B. R.; LARSSON, B. Bovine sêmen quality and the ability to produce embryos in vivo and in vitro. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Suplemento n.1, v. 25, p. 108-126. 1997.

ROSER, J. F.; HUGHES, J. P. Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations, and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 214-223. 1992.

SISTEMA PARA ANÁLISES ESTATÍSTICAS – SAEG, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes, UFV – Viçosa, 2007.

SCHMITT, F. L. **A concentração, a composição e a qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen equino a +4°C**. 2002. 86 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

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

SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W. R.; GUM, G. G.; WIRSIG, C. R. Demonstration of a direct retinohypothalamic projection in the mare. **Biology of Reproduction**, Supplement, v. 30, p. 156. 1984.

SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W. R.; BERGLUND, L. A.; SEAMANS, K. W. Isoproterenol-stimulation of melatonin release in mares. **Journal of Animal Science**, Supplement, v. 51, p. 534. 1980.

SIEME H.; KATILA T.; KLUG, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 61, p. 769-784. 2004.

SILVA, J. F. S.; MATTOS, R. C.; CRUZ, G. M.; CARBALHO, O. W. F; KLUG, E. Use of the Kenney testis index for prediction of daily sperm output of horses. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 20, p. 18-22. 1996.

SILVA, K. M. G. **Efeito da estacionalidade e da adição de antioxidantes em algumas características espermáticas em eqüino**. 2007. 90 p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

SILVA, R. G. Introdução à Bioclimatologia Animal. São Paulo: Ed. Nobel, 2000. 286 p.

SILVA, R. G. Zoneamento bioclimático para animais de interesse zootécnico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...Goiânia: SBZ**, 2005. p. 388-394.

SISK, C. L.; TUREK, F. W. Gonadal growth and gonadal hormones do not participate in the development of responsiveness to photoperiod in the golden hamster. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 439-445. 1983.

SOUSA, C. E. C.; CRUZ-MACHADO, S. S.; TAMURA, E. K. Os ritmos circadianos e a reprodução em mamíferos. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 26, p. 15-21. 2008.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; ARAÚJO, A. A.; LIMA, A. C. B.; NEIVA, J. N. M. Características reprodutivas, concentração de proteínas seminais e testosteronemia de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida. In: REUNIÃO REGIONAL DA SBBQ-NORDESTE, 6., 2002, Fortaleza. **Anais eletrônicos...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002. p. 1-6. Disponível em: <<http://www.bovinos.ufc.br/resultado.pdf>>. Acesso em: 13 de março de 2010.

STANBENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1993. p. 603-614.

STANKOV, B.; COZZI, B.; LUCINI, V.; FUMAGALLI, P.; SCAGLIONE, F.; FRASCHINI, F. Characterization and mapping of melatonin receptors in the brains of three mammalian species: rabbit, horse and sheep. **Neuroendocrinology**, v. 53, p. 214-221. 1991.

STICH, K.; BRINSKO, S.; THOMPSON, J.; LOVE, C.; MILLER, C.; BLANCHARD, T.; VARNER, D. Stabilization of extragonadal sperm reserves in stallions: application for determination of daily sperm output. **Theriogenology**, v. 58, p. 397-400. 2002.

STULL, C. L.; RODIEK, A. V. Responses of blood glucose, insulin and cortisol concentrations to common equine diets. **The Journal of Nutrition**, v. 118, p. 206-213. 1988.

SWANSON, E. W.; BEARDEN, H. J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 10, p. 981-987. 1951.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos cavalos**. Botucatu: Ed. Varela, 1984. 320p.

THOMPSON, D. L.; PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R.P. Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v. 27, p. 13-17. 1979.

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

THOMPSON, D. L.; JOHNSON, L.; St GEORGE, R. L.; GARZA, F. Concentrations of prolactin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in pituitary and serum of horses: effect of sex, season and reproductive state. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 854-860. 1986.

TOJAL, J. H. V. **Termorregulação de equinos em uma construção rural feita com blocos vazados de argamassa de cimento, areia e casca de arroz**. 2002. 143 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

TÖPFER-PETERSEN, E., EKHLASI-HUNDRIESER, M., KIRCHHOFF, C., LEEB, T., SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 159-170. 2005.

TUREK, F. W.; ELLIS, G. B. Steroid-dependent and steroid-independent aspects of the protoperiodic control of seasonal reproductive cycles in male hamsters. In: FOLLET, B. K.; FOLLET, D. E. (Eds.), **Biological Clocks in Seasonal Reproductive Cycles**. Bristol: Sciencetechnica, 1981. p. 251-260.

TUREK, F. W.; VAN CAUTER, E. Rhythms in reproduction. In: KNOBILL, E.; NEILL, J.D. (Eds) **The physiology of reproduction**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press, 1994. p. 519-22.

VALCÁRCEL, A.; de las HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 483-489. 1994.

VAREJÃO-SILVA, M. A. **Meteorologia e Climatologia - Versão digital 2**. Pernambuco, 2006. Disponível em: <[http://www.agritempo.gov.br/modules.php?name=downloads&d\\_op=viewdownload&cid=19](http://www.agritempo.gov.br/modules.php?name=downloads&d_op=viewdownload&cid=19)> . Acesso em: 01 de abril de 2010.

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

VIDAMENT, M.; DUPERE, A. M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, p. 907-917. 1997.

WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; ALM, H.; KANITZ, W.; BLOTTNER, S.; TORNER, H. Characterisation of movement pattern and velocities of stallion spermatozoa depending on donor, season and cryopreservation. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 51, p. 395-408. 2003.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L. A technique of transrectal ultrasonography of stallions during ejaculation. **Theriogenology**, v. 36, p. 831-837. 1991.

WESSON, J. A.; QUAY, W. B.; GINTHER, O. J. Seasonal relationship between pineal hydroxyindole-O-methyl-transferase \_HIOMT. activity and reproductive

status in the pony. **General and Comparative Endocrinology**, v. 38, p. 46–52. 1979.

WRENCH, N.; PINTO, C. R. F.; KLINEFELTER, G. R.; DIX, D. J.; FLOWERS, W. L.; FARIN, C. E. Effect of season on sperm membrane protein 22 and selected mRNAs in fresh and cryopreserved stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, Abstract, v. 107, p. 357. 2008.

WRENCH, N.; PINTO, C. R. F.; KLINEFELTER, G. R.; DIX, D. J.; FLOWERS, W. L.; FARIN, C. E. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 219-227. 2010.

YOUSEF, M. K. **Stress physiology in livestock**. Boca Raton: CRC Press, 1985. 217p.

ZAHN, F. S. **Avaliação dos constituintes bioquímicos e protéicos do plasma seminal e do soro sangüíneo e das proteínas de membrana espermática e sua correlação com a qualidade do sêmen congelado em garanhões**. 2006. 122 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. 1998. 118p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

ZUCKER, I.; JOHNSTON, P. G.; FROST, D. Comparative physiological and biochronometric analyses of rodent seasonal reproductive cycles. **Progress in Reproductive Biology**, v. 5, p. 102-133. 1980.

## 7. APÊNDICE

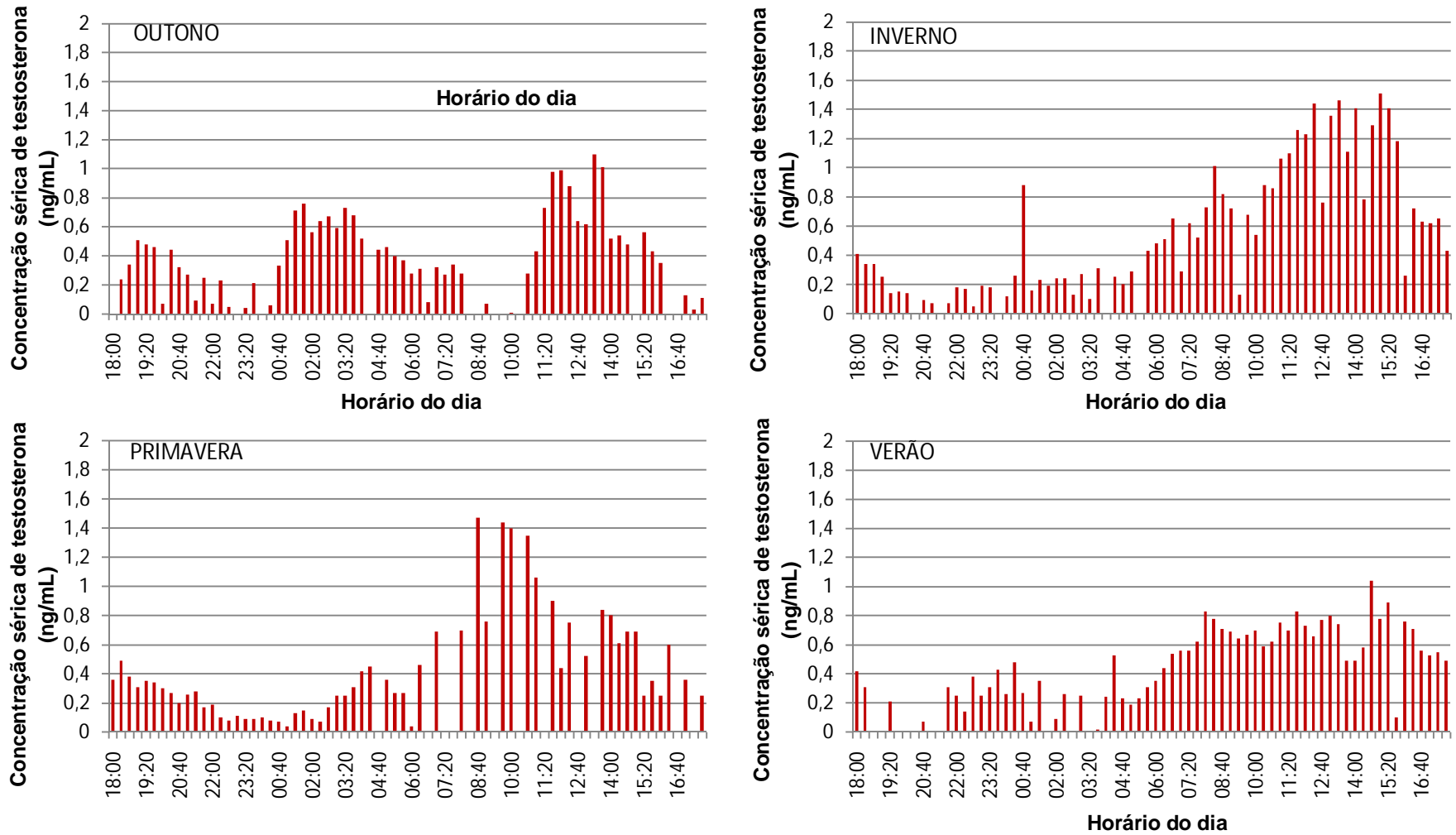


FIGURA 1: Concentrações séricas de testosterona (ng/mL) do animal 1.



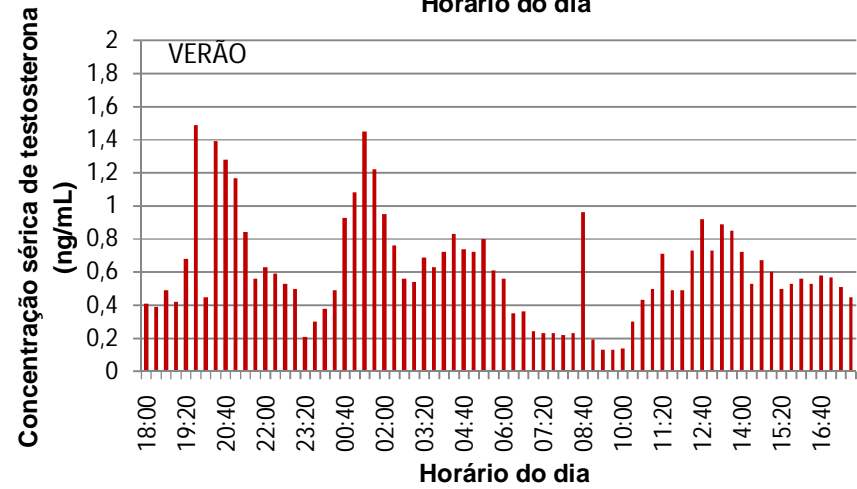
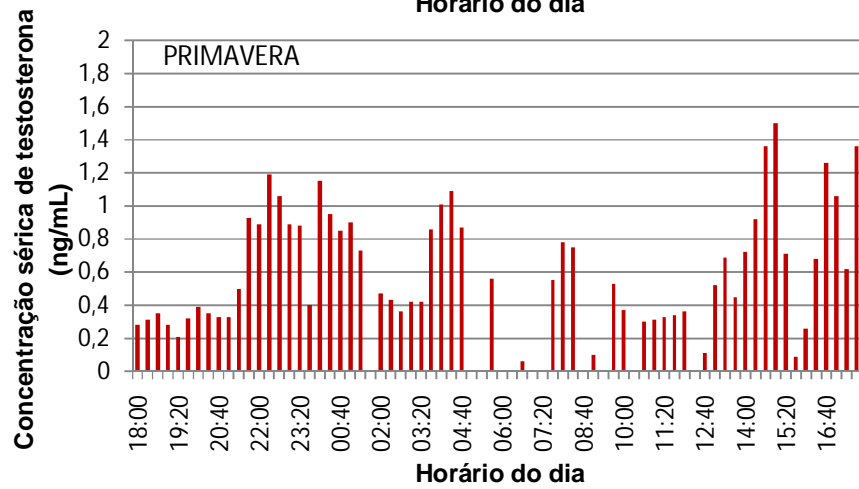
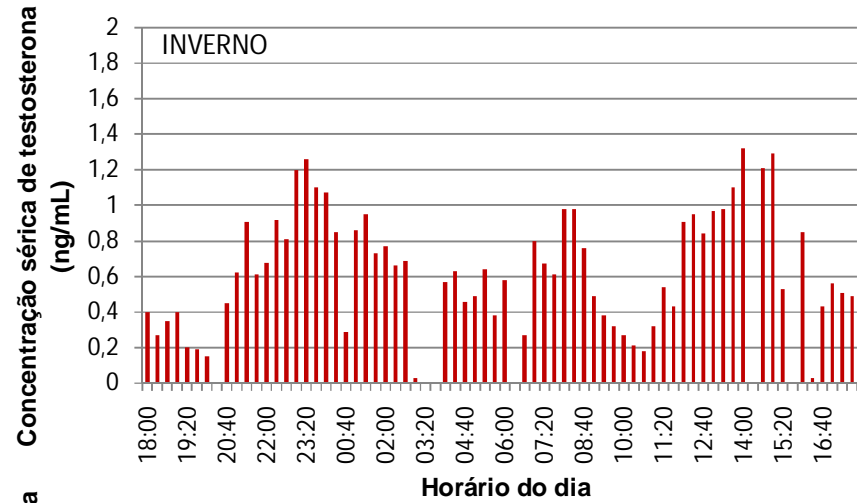
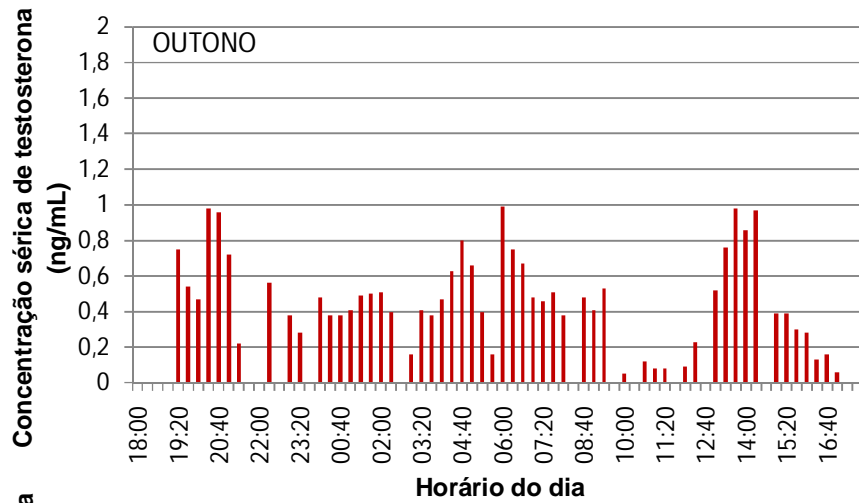


FIGURA 2: Concentrações séricas de testosterona (ng/mL) do animal 2.

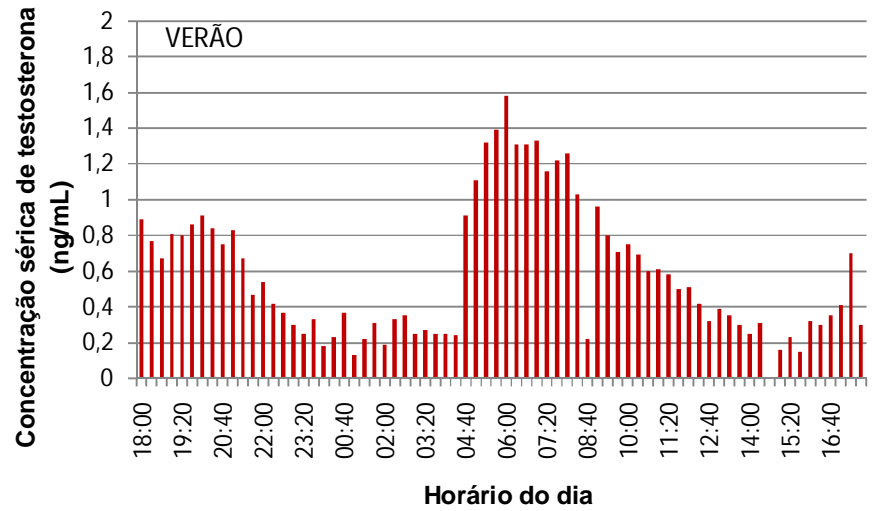
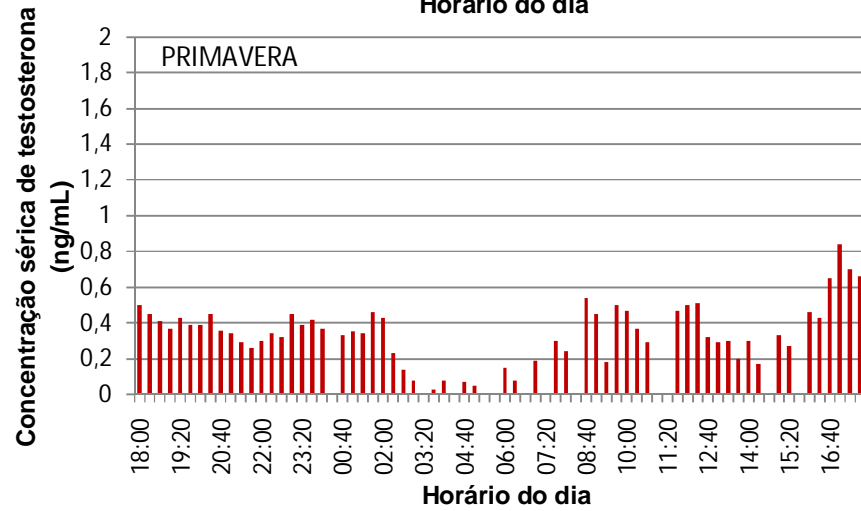
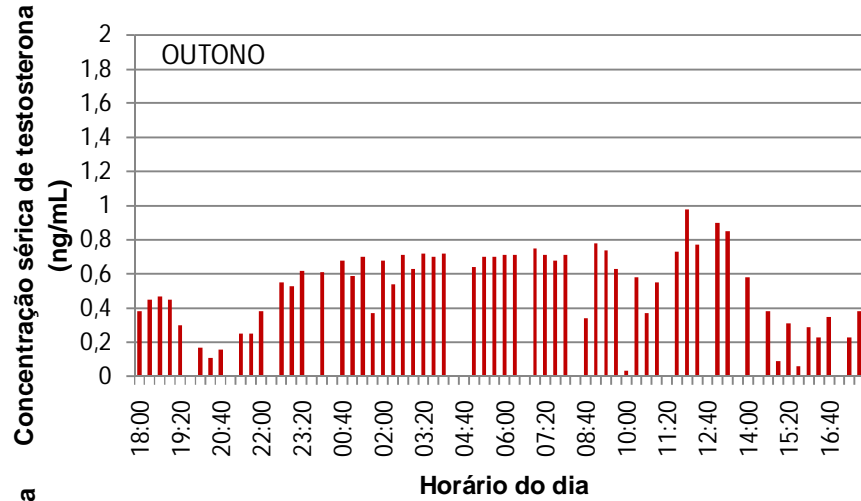


FIGURA 3: Concentrações séricas de testosterona (ng/mL) do animal 3.

## 8. ANEXOS

TABELA 1: Descrição das soluções estoque e de trabalho utilizadas na avaliação da integridade de membrana plasmática de espermatozoides pelo método da fluorescência.

SOLUÇÃO	CONSTITUINTE	QUANTIDADE
I. Solução estoque de CFDA*	CFDA	9,2 mg
	DMSO**	20 mL
II. Solução estoque de IP***	IP	10 mg
	Solução fisiológica (NaCl 0,9%)	20 mL
III. Solução estoque de formaldeído	Formalina a 40%	Diluição 1:80
	Solução fisiológica (NaCl 0,9%)	
IV. Solução estoque de citrato de sódio a 3%	Citrato de sódio	3 g
	Solução fisiológica (NaCl 0,9%)	100 mL
V. Solução de trabalho	Solução I	20 µL
	Solução II	10 µL
	Solução III	10 µL
	Solução IV	960 µL

\* CFDA: diacetato de carboxifluoresceína

\*\* DMSO: dimetilsulfóxido

\*\*\* IP: iodeto de propídeo

Fonte: Zúccari (1998).

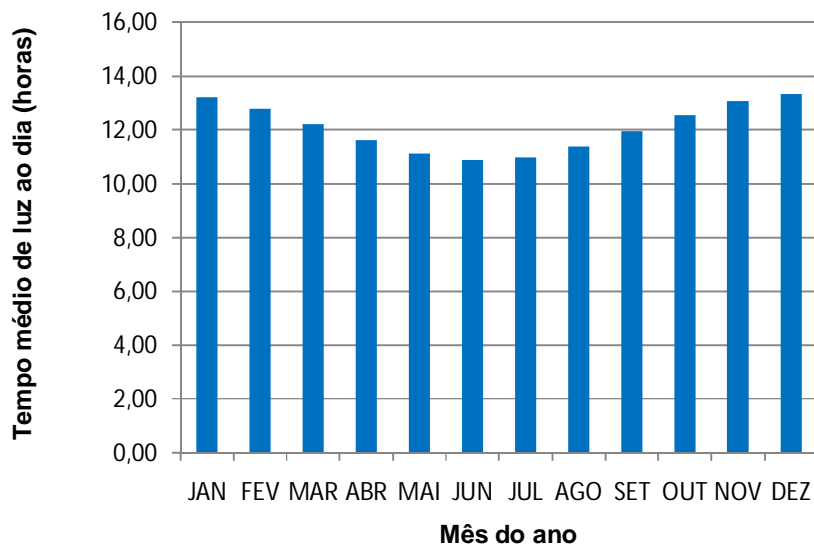


FIGURA 1: Fotoperíodo (horas) em Viçosa, MG, ao longo de um ano.