

MARIA GAZZINELLI NEVES

**PERFIL DE TESTOSTERONA E PARÂMETROS SEMINAIS DE GARANHÕES DA
RAÇA MANGALARGA MARCHADOR DENTRO E FORA DA ESTAÇÃO
REPRODUTIVA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

N518p
2014

Neves, Maria Gazzinelli, 1989-
Perfil de testosterona e parâmetros seminais de garanhões
da raça Mangalarga Marchador dentro e fora da estação
reprodutiva / Maria Gazzinelli Neves. – Viçosa, MG, 2014.
xvi, 48f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.36-44.

1. Mangalarga (Cavalo). 2. Cavalo - Reprodução.
3. Cavalo - Sêmen. 4. Cavalo - Testosterona. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de
Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.10824

MARIA GAZZINELLI NEVES

**PERFIL DE TESTOSTERONA E PARÂMETROS SEMINAIS DE GARANHÕES DA
RAÇA MANGALARGA MARCHADOR DENTRO E FORA DA ESTAÇÃO
REPRODUTIVA**

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

APROVADA: 25 de Julho de 2014

Ciro Alexandre Alves Torres
(Coorientador)

José Domingos Guimarães
(Coorientador)

Eduardo Paulino da Costa

Giancarlo Magalhães dos Santos

Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

“Tão dócil, de olhar profundo, sentimento puro, amo tanto, se ele soubesse a força que tem... não seria tão fácil maltratá-lo, aprisioná-lo...

...há aqueles que o estimam, que cuidam, sorriem pra ele, até lhe abraçam...

ele é sensível e ao mesmo tempo forte, seu andar desenha as nuvens, faz do vento a carruagem, olhar profundo, certo, corajoso, perfeito, e assim mesmo há quem o abandone.”

(Autor desconhecido)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelas oportunidades que me proporcionaram, pelos valores transmitidos, pelo amor e dedicação. Ao Charles Muller, saudades eternas. Aos equinos, razão da minha escolha.
Com todo amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

É com grande satisfação que chego ao final de mais uma etapa da minha vida! Palavras certamente não serão poucas para definir o que foi fazer o Mestrado na Universidade Federal de Viçosa. Grande desafio, sensação de superação, mais conhecimento, mais amigos...só tenho a agradecer a todos que me ajudaram a alcançar mais um dos meus objetivos.

Começo agradecendo aos animais, que me ajudaram na escolha da profissão, Médica Veterinária. Meu primeiro cavalo, Harraiam, minha maior companheira desde os 15 anos, “Shirroca”, Cachaça, Lampião, Fritz e “Fridinha”, foram esses os grandes incentivadores da minha jornada profissional.

Os maiores responsáveis por despertar meu carinho especial por esses seres foram meus pais. O apoio da minha família foi fundamental para que eu conseguisse trilhar meu caminho, baseado sempre nos princípios da educação transmitidos por eles desde pequenininha. Além disso, a dedicação e torcida, como foi difícil para nós eu ter que sair de casa para vir morar em Viçosa. Realmente não tenho palavras para descrever a minha admiração, carinho, respeito e amor que tenho por eles, Rogério, Uka, Laura e Gabriel.

Ao Dr. Ferraz, que tanto abriu as portas para minha profissão, me apresentou ao Professor Giovanni e me despertou o interesse de fazer mestrado na UFV. Em todos os bons momentos passados aqui, eu me lembro dele e agradeço a Deus por ter o colocado no meu caminho.

Ao meu orientador, professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pelos ensinamentos, tempo dedicado às correções e idéias disponibilizadas. Além do exemplo de profissional acadêmico, demonstrado pela sua seriedade e competência.

Aos meus amigos da graduação, que me ajudaram a gostar ainda mais da profissão escolhida. Em especial, as amantes dos equinos, Ana, May e Jéssica. May, gratidão imensa por todas as horas, retiradas do seu precioso tempo, para me ajudar nas correções e discussões estatísticas. À Marizinha por estar sempre disposta a me ouvir e passar boas energias.

.Ao Tiago de Resende Garcia, de professor a um grande amigo, pelas mediações entre UFV e ABCCMM. E à ABCCMM pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Fernando, um agradecimento especial. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio, pela torcida, pelo companheirismo, como é grande o meu carinho por esta amizade. E à todos os funcionários do Setor de Equideocultura da UFV, Zé, Arcino, Bernardo, Dimas, Sílvio, Roberto, Sebastião.

Aos meus queridos estagiários, que me fizeram descobrir Viçosa e todas as oportunidades oferecidas pela UFV, me ajudaram a desenvolver minha didática e me estimularam a estudar ainda mais. Tornaram os dias mais agradáveis, a rotina menos estressante, foram companheiros do início ao fim da minha pós-graduação. Carlos, Claudiana, Cristian, Caio, Daniel Átila, Daniel Monteiro, Dinah, Duda, Flávia, Iana, Ilana, Isabela, Ju, Lorena, Luis, Mariana, Nicolás, Pablo, Rachel, Vivi à vocês, eterna gratidão. Ao Charles Muller, estagiário impecável, aplicado, companheiro, dedicado, se tornou um grande amigo e resolveu nos deixar precocemente, muita saudade. À Iana, um agradecimento especial, como me ajudou na tabulação dos dados e me tranqüilizou nesses momentos finais, tinha sempre a segurança de poder contar com ela.

Ao Tácio, além de me ajudar muito nas coletas do experimento e da tabulação dos dados, obrigada pelo amor, compreensão, pelo companheirismo, por sempre estar disposto a me ouvir e fazer acreditar que tudo seria possível. Palavras novamente me faltam para descrever o quanto foi e é importante na minha vida.

À Fernanda e Mariana, secretárias do DZO, pela paciência em resolver as questões burocráticas e por não se cansarem de responder as mesmas perguntas, sempre, aos alunos. Fernanda me encontrou um pouco perdida, logo na minha chegada a Universidade e aos poucos me ajudou a me localizar aqui dentro, muitíssimo obrigada!

Ao professor Cândido/ICB-UFMG, pelas orientações em relação à metodologia de análise pelo RIA. E ao professor Alan, por intermediar o contato com o professor Cândido.

Ao Carlinhos, por fornecer os kits de quimioluminescência e disponibilizar dias do seu precioso tempo para me ajudar nas análises laboratoriais.

Ao Gilberto e ao Haras Laglória por abrirem as portas do Haras para que pudéssemos realizar parte das coletas. O Gilberto, exemplo de pessoa, caráter e profissional, obrigada por não medir esforços em ajudar.

Aos amigos da pós-graduação, Bruna, Lu, Camila, Manu e Renan por ajudarem na fase experimental além de contribuírem muito com idéias, para a

definição da metodologia, para a elaboração dos resultados e determinação das análises estatísticas. Foram fundamentais para que eu não ficasse tão perdida na UFV e na pós-graduação.

Um tópico especial para Bruna, exemplo de profissional e pessoa, super carismática, prestativa. Não só me cedeu alguns dados como me ajudou a interpretar os resultados obtidos com o experimento. Uma das grandes conquistas na pós-graduação foi a sua amizade.

Ao Jurandir por me ajudar com as análises estatísticas no momento de sufoco. Ao Professor Eduardo Paulino e ao Giancarlo Magalhães por aceitarem fazer parte da banca de defesa. Aos Professores Ciro e José Domingos Guimarães, por confiarem e aceitarem a co-orientação e pelos ensinamentos durante a pós-graduação.

Enfim, à Universidade Federal de Viçosa, instituição em que tanto me identifiquei, ao Departamento de Zootecnia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

MARIA GAZZINELLI NEVES, filha de Rogério Sieiro Neves e Janda Gazzinelli Neves, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 16 de Março de 1989.

Graduou-se Medicina Veterinária em janeiro de 2012, pela Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG e ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia no mesmo ano.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.A raça Mangalarga Marchador	3
2.2.Testosterona	4
2.3.Parâmetros seminais em garanhões	10
2.4.Comportamento reprodutivo e a influência da testosterona	14
2.6.Sazonalidade em equinos	4
2.7.Efeito sazonal sobre as concentrações de testosterona	16
2.8.Efeito sazonal sobre a biometria testicular	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1.Localização geográfica e período experimental	19
3.2.Animais e instalações	19
3.3.Biometria Testicular	19
3.4.Coletas de sêmen	20
3.5.Avaliação do comportamento	21
3.6.Avaliação do sêmen fresco	21
3.7.Procedimento das coletas de sangue a análise hormonal	23
3.8.Análises estatísticas	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
7. APÊNDICE I	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: MÉDIAS DE PARÂMETROS SEMINAIS DE GARANHÕES PARA DIFERENTES RAÇAS DE EQUINOS _____	13
TABELA 02: VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DA BIOMETRIA TESTICULAR DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR AVALIADOS FORA DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA (TRATAMENTO 1) E NA ESTAÇÃO DE MONTA (TRATAMENTO 2) _____	26
TABELA 03: MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS SEMINAIS DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR NA ESTAÇÃO NÃO REPRODUTIVA (TRATAMENTO 1) E NA ESTAÇÃO DE MONTA (TRATAMENTO 02) _____	27
TABELA 04: MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS NO MOMENTO PRÉ-CÓPULA OBSERVADOS NOS PERÍODOS FORA DA ESTAÇÃO DE MONTA (TRATAMENTO 1) E DURANTE A ESTAÇÃO REPRODUTIVA (TRATAMENTO 2) _____	28
TABELA 05: PICOS E MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA EM GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR AVALIADOS FORA DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA (TRATAMENTO 1) E DURANTE A ESTAÇÃO DE MONTA (TRATAMENTO 2) _____	31
TABELA 06: CORRELAÇÃO SIMPLES DE PEARSON DOS PARÂMETROS QUANTITATIVOS DE BIOMETRIA TESTICULAR E QUALIDADE SEMINAL E COMPORTAMENTO NO MOMENTO PRÉ-CÓPULA COM OS PICOS E MÉDIAS DE TESTOSTERONA EM GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR _____	34
TABELA 07: MÉDIAS E DESVIO-PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TESTOSTERONA (PG/ML) POR GARANHÃO DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR NO PERÍODO FORA DA ESTAÇÃO reprodutiva (TRATAMENTO 1) E DENTRO DA ESTAÇÃO DE MONTA (TRATAMENTO 2) _____	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: PRINCIPAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE MELATONINA.	8
FIGURA 02: MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA (PG/ML) EM GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR EM CADA SESSÃO DE COLHEITA (TESTOSTERONA 1=FORA DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA /TESTOSTERONA 2=DURANTE A ESTAÇÃO DE MONTA)	32
FIGURA 3: VALORES DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE TESTOSTERONA (PG/ML) OBTIDOS DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR EM 25 COLHEITAS INTERVALADAS POR 30 MINUTOS DURANTE 12H	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
°C	Graus Celsius
AA-NAT	Arlalquilamina-N-acetiltransferase
ANOVA	Análise de variância
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CHOL	Colesterol
DA	Dopamina
DHT	5-Dihidrotestosterona
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
GnRH	Hormônio liberador das gonadotrofinas
H	Hora
hCG	Gonadotropina coriônica humana
HHG	Eixo Hipotalâmico-hipofisário-gonadal
HIOMT	Hidroindol-O-metiltransferase
HMG-CoA sintase	3-hidroximetilglutaril coenzima A sintase
HMG-CoA redutase	3-hidroximetilglutaril coenzima A redutase
Hz	Hertz
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio Luteinizante
µL	Microlitro
MEL	Melatonina

Mg	Microgramas
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mm³	Milímetro cúbico
mOsmI	Miliosmol
MPOA	Área pré-óptica medial
NA	Receptores adrenérgicos
NAT	N-acetiltransferase
NSQ	Núcleo supraquiasmático
NPV	Núcleo paraventricular
P	Nível de significância
Pg	Picograma
pH	Concentração de íons hidrogênio
Sptz	Espermatozóide
SV	Coloração supra-vital
TR	Tempo de reação
TL	Tempo de latência
TM	Tempo de monta
Mot	Motilidade
LH	Hormônio Luteinizante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio liberador das gonadotropinas
acetilCoA	Acetil coenzima A

RESUMO

NEVES, Maria Gazzinelli, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014.
Perfil de testosterona e parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador dentro e fora da estação reprodutiva. Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho Co-orientadores: Ciro Alexandre Alves Torres e José Domingos Guimarães.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros reprodutivos e o perfil de testosterona de garanhões da raça Mangalarga Marchador, em dois períodos, dentro da estação de monta e fora da estação reprodutiva, criados nos municípios de Viçosa, Muriaé e Teófilo Otoni – MG e mantidos em regime semi-estabulado. O estudo foi dividido em duas etapas (1ª etapa: julho e agosto de 2013 e 2ª etapa: janeiro e fevereiro de 2014) utilizando onze garanhões na primeira etapa e oito na segunda, com idades entre 5 e 25 anos que foram submetidos a colheitas de sangue para determinação da concentração de testosterona sérica, 20 dias após o início do inverno (1ª etapa) e 20 dias após o início do verão (2ª etapa). As colheitas foram realizadas durante 12 horas, intervaladas por 30 minutos. Foi mensurada, no mesmo dia da colheita de sangue, a biometria testicular de cada animal. Para a determinação dos parâmetros seminais, fez-se nos dois dias consecutivos da colheita de sangue, as colheitas de sêmen, totalizando dois ejaculados de cada garanhão por estação, momento em que também foi avaliado o comportamento pré-cópula de cada animal. Em relação à biometria testicular, percebeu-se que as variáveis quantitativas avaliadas, altura, largura, comprimento e volume dos testículos direito e esquerdo não tiveram diferenças entre as estações ($P > 0,05$). Do mesmo modo, os parâmetros seminais e comportamentais, volume, aspecto seminal, motilidade, vigor e concentração espermática, integridade de membrana dos espermatozoides, tempo de reação, tempo de latência, tempo de monta e número de montas não apresentaram diferenças entre as estações do ano ($P > 0,05$). Apesar de que a distribuição dos valores absolutos de testosterona serem diferentes dentro e fora da estação, não se observou diferença nas médias das concentrações ($P > 0,05$). Essas diferenças foram maiores nas amostras feitas pela manhã, em que as concentrações no período durante a estação de monta foram maiores do que fora da estação reprodutiva ($P > 0,05$). No entanto, ocorreu

interação de animal e estação, o que permitiu concluir que em alguns animais as concentrações médias do andrógeno apresentaram comportamento sazonal, enquanto em outros animais, esse comportamento não foi observado. Portanto, sazonalidade não exerce efeito sobre as características reprodutivas como biometria testicular, comportamento sexual e parâmetros seminais, além da secreção de testosterona, sendo que a influência sobre esta última não apresenta correlações importantes com as demais características estudadas.

ABSTRACT

NEVES, Maria Gazzinelli, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014.
Testosterone profile and seminal parameters in Mangalarga Marchador stallions outside and inside the breeding season. Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho Co-advisers: Ciro Alexandre Alves Torres e José Domingos Guimarães.

The aim of this study was to evaluate the reproductive parameters and the profile of testosterone release and their average concentrations in Mangalarga Marchador stallions. It was evaluated in two periods, during breed season and outside the breed season, in Viçosa, Muriaé and Teófilo Otoni-MG. The research was divided in two phases (First: July and August, 2013 and the second: January and February, 2014), using eleven stallions at the first one and eight at the second one, age between 5 and 25 years old. To determine the serum testosterone, they were blood sampled about 20 days after the beginning of winter(1st phase) and 20 days after the beginning of summer(2nd phase). The samples were collected for 12 hours/day, from 7am to 7pm, each 30 minutes. The testicular biometry was measured at the same Day of the blood sample. To determine the seminal parameters, sêmen was collected from the stallions the two days following the blood samples. At this time, during the semen collects, the reproductive behaviour was evaluated. Regarding the measurements of the testis, the quantitative variables, height, width, length and volume of right and left testis did not differ significantly between seasons($P>0.05$). The same was observed about seminal and behavioral parameters, volume, appearance, motility, vigor, concentration, membrane integrity, reaction time, latency time, copulation time and number of mounts, in which the results do not indicate differences between seasons($P>0.05$). Despite the fact that the profile of testosterone release are different during the seasons, there was no difference in means of concentrations ($P>0,05$). These differences were bigger during the morning, when the concentrations in this time were higher during breeding season. However, there was difference between animal interaction and season, which suggests that in some animals the mean androgen concentrations displayed a seasonal pattern, while in other animals, this behavior was not observed. It was concluded that seasonality has no effect on the reproductive characteristics as testis size, sexual behavior and semen parameters, beyond the average testosterone secretion, so

that the influence on the latter not presented correlations with other important traits studied.

1. INTRODUÇÃO

Em 2007, o Brasil possuía o quarto rebanho eqüino do mundo (Faostat, 2007) com 5,8 milhões de cabeças e uma movimentação financeira de R\$ 7,5 bilhões ao ano. O mercado equestre gera aproximadamente 642 mil empregos diretos e 2,6 milhões de empregos indiretos, desempenhando papel de grande importância social e econômica no cenário do agronegócio nacional. As exportações dessa atividade totalizaram no ano de 2009, U\$ 27,4 milhões, receita superior a de produtos como café torrado e cachaça, os quais têm uma divulgação bem mais ampla fora do país (CNA, 2010).

Dentre as raças eqüinas criadas no Brasil, o Mangalarga Marchador é a mais comum. Os animais dessa raça conquistam admiradores em todo país e no exterior, alcançando expressiva expansão nacional e internacional (Cabral et al., 2004a). Em 2010 a Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos Mangalarga Marchador, ABCCMM, é composta por 5000 associados ativos, sendo 105 associados no exterior, em um universo de mais de 400000 animais registrados. Existem 24 mil criadores espalhados pelo Brasil, Estados Unidos, Alemanha, Bélgica, Holanda, Portugal, Canadá, Israel, Peru e Uruguai.

Alguns garanhões chegam a servir um número superior a 200 éguas (VENTUROLI e NICOLINI, 2011) durante a estação de monta sendo de extrema importância um bom desempenho reprodutivo dessa categoria a fim de evitar grandes prejuízos econômicos à atividade. Apesar disso, poucos levantamentos têm descrito características fundamentais como o padrão hormonal de garanhões e a relação com os parâmetros seminais e comportamento sexual. A maior parte dos estudos relevantes relacionados a parâmetros reprodutivos de garanhões foram realizados nas décadas de 70 e 80 (SULLIVAN et al., 1975; DOWSET e PATTIE, 1982; PICKETT et al., 1987), não sendo registrados relatos com número expressivo de animais buscando descrever tais características das raças nacionais.

O eqüino é uma espécie estacional, em que a atividade sexual é aumentada em períodos de dias longos, suspeita-se que as mudanças de comprimento do dia ao longo do ano influenciam o perfeito funcionamento gonadal. 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, 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 do exposto, percebe-se a necessidade de pesquisas que avaliam possíveis fatores que influenciam na fertilidade dos ejaculados e a resposta das raças criadas em condições tropicais à esses fatores. Assim sendo, os objetivos a serem alcançados com este estudo foram:

- Caracterizar o perfil de secreção de testosterona e suas concentrações médias em garanhões da raça Mangalarga Marchador, durante a estação reprodutiva e fora da estação reprodutiva;
- Avaliar a qualidade seminal e o comportamento sexual no momento pré-cópula de garanhões Mangalarga Marchador e constatar possíveis diferenças durante a estação de monta e fora da estação de monta;
- Constatar se ocorrem variações quanto às biometrias testiculares durante a estação de monta e fora da estação de monta;
- Correlacionar a produção de testosterona com o comportamento sexual, parâmetros seminais e biometria testicular nas duas fases: fora e dentro da estação de monta.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A raça Mangalarga Marchador

Na região sudeste está a maior concentração de eqüinos do Brasil, sendo a raça mais popular o Mangalarga Marchador, que se encontra em maior quantidade em Minas Gerais (CNA, 2006). O Mangalarga Marchador é uma raça brasileira de cavalos de sela com aproximadamente 200 anos de seleção, sendo criada pelos integrantes da família Junqueira, por meio do cruzamento de animais Puro Sangue Lusitanos, vindos para o Brasil acompanhados da família real portuguesa, em 1808, com éguas nativas da região do Sul de Minas Gerais. Em 1949, foi fundada a Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador (ABCCMM), que é atualmente a maior associação de raça eqüina da América Latina, possuindo o maior número de associados e de animais inscritos.

Os animais dessa raça conquistaram admiradores em todo país e no exterior, alcançando expressiva expansão nacional e internacional (CABRAL et al., 2004). Os dados mais atuais constam que a ABCCMM é composta por 5000 associados, sendo 105 associados no exterior, em um universo de mais de 400.000 animais registrados. Existem 24 mil criadores espalhados pelo Brasil, Estados Unidos, Alemanha, Bélgica, Holanda, Portugal, Canadá, Israel, Peru e Uruguai. São 53 núcleos brasileiros, um norte-americano, *U.S. Mangalarga Marchador Association* (USMMA), e um europeu, *European Association of Mangalarga Marchador* (EAMM), pelos quais trabalham 50 técnicos de registro, 30 árbitros e 15 instrutores para cursos de treinamento e reciclagem de criadores e de mão-de-obra.

Além da já reconhecida comodidade, o Mangalarga Marchador destaca-se por sua beleza, docilidade, qualidades zootécnicas e versatilidade, o que proporciona aos animais ótimo desempenho nas atividades em que são utilizados. Os animais Mangalarga Marchador atendem ao tipo “sela internacional”, possuindo porte médio, estrutura forte e bem proporcionada, expressão vigorosa e sadia, temperamento dócil e ativo (ABCCMM, 2010).

Tem como característica principal a marcha, que é o passo acelerado, capaz de transportar o cavaleiro de maneira cômoda, pois não transmite nele os impactos ocorridos com os animais de trote. Esse andamento é de origem genética e resulta da coordenação neuromotora dos movimentos e, especialmente, de medidas morfométricas adequadas ao desempenho dessa função (PINTO et al., 2005).

Todas essas habilidades, resistência, docilidade, comodidade e regularidade, permitiram ao Mangalarga Marchador um lugar no Guinness Book, o Livro dos Recordes, em 1993. Entre maio de 1991 e julho de 1993, três cavaleiros (Jorge Dias Aguiar, 64 anos, Pedro Luiz Dias Aguiar, 60 anos, e o capataz de Pedro, José Reis, 65 anos) e seis animais da raça fizeram uma cavalgada durante aqueles dois anos, entre os pontos mais distantes do Brasil, Chuí, no Rio Grande do Sul, e Oiapoque, no Amapá, pelo projeto "Brasil 14 mil". Com o retorno a São Paulo, percorreram 19.300 quilômetros. Uma das maiores estratégias de marketing feitas com a raça, o projeto acabou transformando-se na "Cavalgada Mercosul - Projeto Brasil 14 mil", com a inclusão da Argentina e Paraguai, totalizando 25.104 quilômetros .

Os objetivos da raça são as exposições, os concursos de marcha, o enduro, a lida com o gado, as provas funcionais, cavalgadas e lazer em geral. Anualmente são realizados mais de 200 eventos nos diversos estados do país, o que comprova a grandeza do Mangalarga Marchador. A Exposição Nacional, a mais importante mostra do Mangalarga Marchador, é realizada desde 1982 pela Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador (ABCCMM), no Parque da Gameleira, em Belo Horizonte, e reúne representantes de todos os Estados. Os expositores levam à pista cerca de 1.000 animais, todos credenciados anualmente com os títulos de Campeão ou Reservado Campeão nas exposições oficializadas pela entidade em todo o país (ABCCMM, 2010).

2.2. Sazonalidade em equinos

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, em que o ambiente se encontre em ótimas condições de clima e disponibilidade de alimentos. Além disso, diferentemente desses fatores, o fotoperíodo fornece informações sobre a estação e se mantém constante ano a ano (GERLACH; AURICH, 2000).

Já se sabe que o fotoperíodo, que tem sua duração variável ao longo do ano, seja o fator externo que mais influencia a sazonalidade reprodutiva equina (GINTHER, 1992). Apesar de que, os efeitos do fotoperíodo sobre a reprodução podem ser modificados, até certo ponto, pela temperatura, nutrição, escore corporal e idade (GERLACH; AURICH, 2000).

A melatonina (MEL) é o hormônio que regula a atividade reprodutiva dos animais sazonais e é produzida em períodos de menor luminosidade. Conforme os dias começam a ficar mais curtos, a exposição dos animais à melatonina aumenta, informando ao organismo a duração da noite e conseqüentemente, o período do ano correspondente (SRINIVASAN et al., 2009). Está bem estabelecido que a melatonina exerce influência sobre a sincronização da resposta reprodutora apropriada de vários animais às condições ambientais. O fotoperíodo, mantém-se constante ao longo dos anos e como citado anteriormente, reflete a sazonalidade em função da latitude. Nas regiões tropicais, o tempo de luz se aproxima ao tempo de escuro, 12h. Enquanto em regiões temperadas a fase é ajustada ao longo do ano (ZIV et al., 2005). O fotoperíodo, juntamente com outros sincronizadores como temperatura, disponibilidade de alimentos, de chuva ou água e salinidade, podem moldar os ritmos circadianos e/ou anuais. O fotoperíodo e fenômenos ambientais são os que apresentam maior influência sobre o biorritmo dos animais afetando o ganho de peso, a ingestão de alimentos, o gasto de energia, a atividade de locomoção, assim como outros parâmetros fisiológicos.

A maioria das espécies de mamíferos usa a detecção de modificações no fotoperíodo para registrar mudanças estacionais, regulando o seu comportamento reprodutivo sazonal (fotoperiodismo). A conversão de sinais ambientais em mensagens neuroendócrinas é feita via retina ao núcleo supraquiasmático do hipotálamo, o qual funciona como um controle autônomo para o gânglio cervical superior, de onde as fibras ganglionares posteriores alcançam finalmente a pineal (MAGANHIN et al., 2008).

Os animais classificados como espécies sazonais, as variações no ciclo reprodutivo anual ocorrem em função das variações no fotoperíodo e no perfil de secreção da melatonina, sendo classificados como animais de fotoperíodo curto ou longo. Nas espécies bovina e suína, a expressão fisiológica da sazonalidade foi atenuada ou suprimida, porém na maioria das raças de ovinos, caprinos, eqüinos e bubalinos foi mantida e observada claramente em regiões de climas temperados.

A função reprodutiva é controlada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG), em que os hormônios hipotalâmicos são secretados, de forma pulsátil, o GnRH, que atua na hipófise, estimulando a liberação de LH e FSH, que, por sua vez, agem nas gônadas, estimulando a produção de esteróides e promovendo a gametogênese. Nas espécies que apresentam reprodução sazonal, o eixo HHG é modulado pela melatonina. Isso ocorre por meio da ativação de receptores de

melatonina encontrados em diferentes locais: neurônios hipotalâmicos liberadores de GnRH, hipófise anterior, gonadotrofos e lactotrofos da hipófise posterior, ovários e testículos (ROCHA, R.M.P. et al., 2011).

A partir da puberdade, a melatonina apresenta efeitos estimulatórios e/ou inibitórios sobre o eixo HHG dependendo da espécie. Em roedores de laboratório, assim como em todas as espécies de dias longos, o efeito da melatonina sobre o eixo HHG é predominantemente inibitório. Em células liberadoras de GnRH com expressão de receptores para melatonina (MT1 e MT2), observou-se que a melatonina reduziu a expressão do mRNA para o GnRH (ROY et al., 2001). Isso sugere a possibilidade de um efeito direto da melatonina na secreção de GnRH em neurônios hipotalâmicos. Por outro lado, estudos recentes sugerem efeito indireto na regulação do eixo HHG pelo estímulo da secreção de proteínas denominadas de kisspeptinas (BERLINGUER et al., 2009). Considerando que as kisspeptinas potencialmente influenciam a secreção de FSH/LH via GnRH, a ativação dessa via endócrina pela melatonina poderia gerar um ambiente hormonal mais propício para o crescimento folicular e a maturação oocitária (ROCHA et al., 2011).

A melatonina, reguladora sazonal da função reprodutiva do macho, durante a estação não reprodutiva, que varia entre espécies, altera a secreção e produção de GnRH. Em garanhões, espécie de dias longos, durante a estação reprodutiva, a produção de melatonina é baixa e as reservas de GnRH são maiores e suficientes para promover a função testicular ótima e reservas extra-gonadais. O GnRH ativa a hipófise para a produção de LH e FSH. LH se liga aos receptores nas células testiculares de Leydig, que estimula a produção de testosterona e estrógeno. Enquanto o FSH se liga aos receptores das células de Sertoli, estimulando a produção de estrógeno, inibina e ativina.

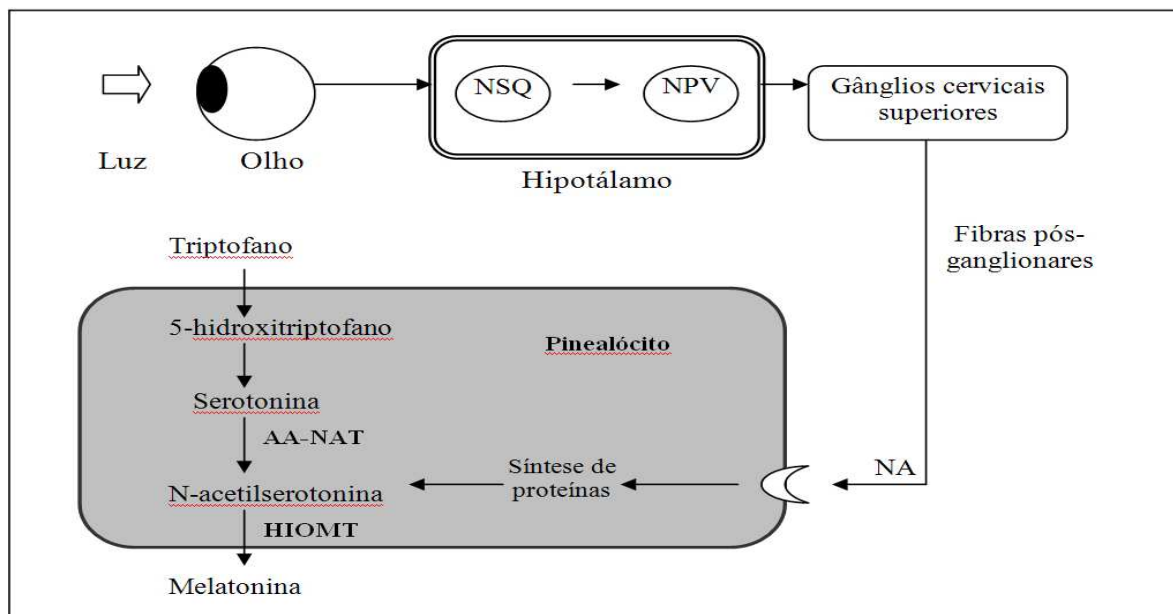
Vários trabalhos já comprovaram as evidências da ação antioxidante da melatonina sobre os espermatozoides. Shiu et al. (2000), detectaram a presença de receptores da melatonina no tecido epididimário de ratos e Lavi et al. (2002) confirmaram a presença do hormônio no plasma seminal de humanos, assim como no de carneiros (CASAO et al., 2010). Isso levou a suspeita de que a melatonina exerce importante função sobre a viabilidade das células espermáticas. A melatonina também está associada a capacitação, reação acrossômica e hiperativação dos espermatozoides, além da ação anti-oxidante.

Esse hormônio é produzido na glândula pineal, localizada no teto do terceiro ventrículo entre os dois hemisférios cerebrais, e é secretada seguindo um padrão

rítmico, com pico no período noturno e quase nenhuma síntese no período diurno. A magnitude e duração de sua concentração no meio extracelular estão na dependência da duração do período de escuro (escotoperíodo) da alternância dia-noite.

A biossíntese da melatonina tem início com a captação do aminoácido essencial triptofano pelas células parenquimatosas da glândula pineal, que é convertido em outro aminoácido, o 5-hidroxitriptofano, pela ação da enzima triptofano hidroxilase e, em seguida, é convertido no neurotransmissor 5-hidroxitriptamina (serotonina) pela enzima descarboxilase de aminoácido aromático. (Figura 1). As concentrações de serotonina são elevadas na pineal e sua conversão em MEL envolve duas enzimas principais: a N-Acetil-Transferase (NAT) e a Hidroxi-Indol-Orto-Metil-Transferase (HIOMT). A enzima NAT apresenta um complexo ritmo diário, atingindo concentrações 100 vezes superiores na fase de escuro, quando comparado à fase de claro (LOTUFO et al. 2001). O ritmo da segunda enzima é menos evidente, mas HIOMT participa da regulação sazonal da produção de melatonina (RIBELAYGA et al., 2000) . Esta variação diária na enzima NAT faz com que a redução da concentração de serotonina na fase de escuro seja acompanhada por aumento das concentrações de N-acetilserotonina e melatonina.

Figura 01: Principais mecanismos envolvidos na síntese de melatonina.



Fonte: Adaptado de Sousa et al.(2008).

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.

A glândula pineal, associadamente aos núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos, constitui parte importante do sistema neuroendócrino, responsável pela organização temporal dos diversos eventos fisiológicos e comportamentais (DUBOCOVICH, L. et al., 2003). Pelo principal produto, a melatonina, exerce esse papel regulador sobre no controle de fenômenos endócrinos independentes do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal; termoregulação; regulação do sistema cardiovascular; ciclos de atividade-reposo e vigília-sono; sistema imunológico, aumentando a mobilidade das células de defesa contra microorganismos; crescimento e envelhecimento. Alguns autores indicam a melatonina como molécula chave, que controla o ciclo circadiano dos animais e humanos.

Em mamíferos, a luz agindo pela retina, cumpre o papel clássico de modulador da ritmicidade circadiana na produção de melatonina, fazendo com que seu pico diário coincida sempre com a noite. Diferentemente, no entanto, do que acontece com outros ritmos endógenos, a luz, incidindo sobre a retina de mamíferos durante o período de escuro da noite circadiana, bloqueia, instantaneamente, a produção de melatonina, fazendo com que sua concentração

plasmática caia a concentrações basais em poucos minutos, podendo ou não ser retomada, dependendo da duração e do momento da noite em que se dá a fotoestimulação retiniana.

O ritmo sazonal da fertilidade é dado primariamente por variações na frequência de pulsos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), controlado parcialmente pela melatonina, o qual regula a liberação dos hormônios gonadotróficos na hipófise e conseqüentemente alterando a função de órgãos genitais (MALPAUX et al., 2001).

Outra característica importante a ser considerada é a variação do perfil plasmático diário da melatonina ao longo do desenvolvimento ontogenético dos mamíferos: a produção é máxima nos primeiros anos de vida, caindo imediatamente precedendo a puberdade e tornando-se mínima com a idade avançada. Dessa forma, postula-se para a melatonina, também, um importante papel na determinação das modificações fisiológicas associadas ao ciclo de vida (crescimento, amadurecimento e envelhecimento).

2.3. Testosterona

O hormônio testosterona é um esteróide produzido nas células de Leydig (testículos), com limitada quantidade produzida pelo córtex da adrenal (GUYTON, 1992). Essencial à função reprodutiva dos machos, atua estimulando os estágios iniciais e finais da espermatogênese, prolonga a vida útil dos espermatozóides no epidídimo e estimula o crescimento, o desenvolvimento e a atividade secretora dos órgãos sexuais do macho, como próstata, glândulas vesiculares e bulbouretrais, vasos deferentes e genitália externa. A manutenção das características sexuais secundárias, do comportamento sexual ou da libido do macho também é controlada pelos andrógenos (HAFEZ, 1995). Estudos realizados por Odonell Santos et al. (1994), em ratos, demonstraram que o desenvolvimento das espermátides arredondadas para a forma alongada é altamente dependente de testosterona.

A biossíntese da testosterona é realizada na mitocôndria e no retículo endoplasmático das células de Leydig. A conversão à 5-dihidrotestosterona (DHT), produto biologicamente mais ativo, é realizada nos órgãos-alvo da testosterona (testículo, próstata, pele, folículos pilosos, cérebro) pela 5- α -redutase que requer NAPH como coenzima. O precursor do hormônio androgênico é o colesterol

(CHOL). As glândulas produzem os hormônios a partir do acetil-CoA ou a partir do colesterol fornecido pelo LDL. O número de receptores para LDL é aumentado por estímulo dos hormônios trópicos, como LH e ACTH. A redução dos estoques intracelular de colesterol estimula a atividade da enzima 3 hidróxi-3metilglutaril coenzima A sintase (HMG-CoAsintase) e da HMG-CoA redutase, enzimas chaves na síntese do colesterol a partir do acetilCoA.

Os hormônios trópicos como LH, FSH, ACTH e hCG atuam na membrana ativando o sistema adenilciclase que produz o AMPc. Este, por sua vez, aumenta a síntese de um ativador protéico e do polifosfoinositol, que promovem aumento da interação do colesterol com o citocromo P450 no interior da mitocôndria, possivelmente facilitando o transporte do colesterol para a mitocôndria. Essa associação é o passo limitante na síntese dos esteróides, pois permite a transformação do colesterol em pregnenolona. A enzima produtora da quebra da cadeia lateral do colesterol (citocromo P 450_{scc}) está localizada na membrana interna da mitocôndria. Após a formação da pregnenolona, essa é convertida, na célula de Leydig, a progesterona, 17 α -OH-progesterona, pela enzima P450_{c17}. A enzima 17,20 desmolase então, remove os carbonos 20 e 21, que pertenciam ao citocromo P450_{c17}, o que produz a androstenediona. Essa, pela ação da 17- β -OH-esteroidedesidrogenase, transforma-se em testosterona.

Influência da estação do ano na concentração da testosterona no plasma periférico de garanhões já foi observado (BERNDTSON et al., 1974; COX e WILLIAMS, 1975; WIESNER e KIRKPATRICK, 1975; KIRKPATRICK et al., 1977). No entanto, estudo mais recentes realizado em regiões de latitudes menores, não obteve resultados significativos que revelam o padrão sazonal esperado na concentração de testosterona em soro de garanhões (PACHECO 2002), o que sugere que outros hormônios além da testosterona devem ser considerados na regulação da reprodução dos garanhões.

A produção qualitativa e quantitativa dos andrógenos e estrógenos testiculares varia de acordo com as espécies. Particularmente, grande quantidade de estrógeno é sintetizada por cachorros (CLAUS e HOFFMANN, 1980, RAESIDE, 1983), e garanhões (BEDRAK e SAMUELS, 1969).

2.4. Parâmetros seminais em garanhões

A avaliação e determinação dos parâmetros seminais se tornaram rotina na reprodução eqüina, devido principalmente à inseminação artificial, que é uma realidade dentro dos criatórios e centros reprodutivos eqüestres do Brasil. Tal fato faz com que as pesquisas se direcionem com o objetivo de obter maior produtividade de garanhões considerados superiores de acordo com as características valorizadas em cada raça. Estudos envolvendo as características reprodutivas em garanhões sugerem que o efeito da raça é importante para os diferentes aspectos reprodutivos, dentre eles, aspectos seminais (Tabela 01) (HENDRIKSE, 1966; SKINNER e BOWEN, 1968; DOWSET e PATTIE, 1982; VOSS et al., 1982; DOWSETT e PATTIE, 1987, OLIVEIRA, 2014).

Segundo Colenbrander et al. (1992), o objetivo geral na avaliação do sêmen seria analisar as perspectivas de fertilidade de um garanhão e/ou de amostras de sêmen (refrigerado, congelado). O melhor método de prever a fertilidade de garanhões seria por meio de um exame clínico dos órgãos genitais e de análises laboratoriais do sêmen (AMANN, 1981).

A fertilidade de um reprodutor pode ser influenciada pelo seu uso, comportamento sexual, momento e método de cobertura e, também pela fertilidade das éguas, dentre outros fatores. Submetidos a um manejo adequado, machos subfêrteis podem atingir taxa de nascimento razoável (HURTGEN, 1992). No entanto, poucos são os reprodutores que cobrem um número suficiente de éguas para se estabelecer, verdadeiramente, o seu potencial de fertilidade (PICKETT e VOSS, 1973). Alguns autores consideram que a espécie equina possui índices de fertilidade mais baixos quando comparada às demais espécies domésticas (SULLIVAN et al., 1975). Parte dessas observações relaciona-se ao fato de que nesta espécie, não há seleção para fertilidade (MERKT, 1986). Além disso, há uma tendência de se atribuir à fêmea os problemas de infertilidade, comprometendo uma avaliação mais criteriosa do garanhão (PIMENTEL, 1989; HAMMES et al., 1996). Dentre os fatores que podem alterar os índices reprodutivos, a qualidade seminal se destaca. No entanto, essa associação ainda apresenta resultados conflitantes na literatura. Neste sentido, Haag (1959), Nishikawa (1959) e Bielanski (1975) foram os pioneiros em estabelecer uma variação da fertilidade a partir de diferentes padrões seminais.

Haag (1959) verificou melhores índices de concepção associados a garanhões que apresentavam mais de 50% de motilidade e percentuais de espermatozoides anormais inferiores a 40%, Bielanski (1975) observou que

garanhões com altos índices de anormalidades morfológicas poderiam apresentar excelente fertilidade. Mais tarde, Kenney et al. (1983) verificaram que a concentração espermática associada ao percentual de espermatozoides morfolologicamente normais e a motilidade espermática foram as características seminais que melhor explicavam variações nas taxas de concepção obtidas ao final de uma estação de monta.

Essas características serviram de base para determinar um padrão qualitativo que pudesse auxiliar na interpretação dos espermogramas de garanhões. Outros autores reportam que, das variáveis seminais, a motilidade e a morfologia espermática são as mais relevantes (DOWSETT et al., 1984; JASKO et al., 1990).

Tabela 01: Médias de parâmetros seminais de garanhões para diferentes raças de equinos

Raça	Volume sem gel (ml)	Volume de gel (ml)	Motilidade (0-100%)	Concentração (x 10⁶/ml)	Numero total sptz (x10⁹)	Autor
Thoroughbred (n=141)	28,3	2,7	70,7	114,3	5,0	Adaptado: Dowsett&Knott, 1996.
Standardbreed (n=111)	30,2	3,1	84,6	97,2	4,7	Adaptado: Dowsett&Knott, 1996.
Árabe (n=73)	36,2	1,0	85,0	286,8	12,7	Adaptado: Dowsett&Knott, 1996.
Australina Stock Horse (n=73)	33,2	5,5	77,8	116,1	4,8	Adaptado: Dowsett&Knott, 1996.
Quarto de Milha (n=30)	23,8	4,0	73,9	171,7	5,4	Adaptado: Dowsett&Knott, 1996.
Palomino (n=44)	23,8	1,1	72,9	138,5	4,0	Adaptado: Dowsett&Knott, 1996.
Ponei (n=38)	20,8	2,5	69,7	104,0	1,1	Adaptado: Dowsett&Knott, 1996.
Shetland (n=8)	44,4	13,1	70,1	101,2	1,7	Adaptado: Dowsett&Knott, 1996.
Apalosa (n=18)	23,3	2,0	73,2	90,4	3,3	Adaptado: Dowsett&Knott, 1996.
Ponei (n=216)	24,2	*	63,8	233,6	4,9	Adaptado: Paccamonti et al., 1999.
Dutch Warmblood–riding type (n=318)	64,3	*	70,0	214,3	11,7	Adaptado: Parlevliet et a., 1994.
Dutch Warmblood–carriagetype (n=80)	67,4	*	66,4	174,2	9,9	Adaptado: Parlevliet et a., 1994.

2.5. Comportamento reprodutivo e a influência da testosterona

Uma etapa fundamental no exame andrológico do garanhão é a avaliação do comportamento sexual. Em estudos com garanhões domesticados, mantidos sob uma variedade de condições semi-selvagens, pesquisadores encontraram variações extremas nas concentrações de testosterona e comportamento sexual que podem ser produzidas com a manipulação das condições sócio-sexuais do eqüino (Mc DONNELL et al. 1995). Com a crescente produção das biotécnicas reprodutivas e predominância das mesmas, os garanhões, que participam de muitas atividades eqüestres, são obrigados a exercer os dois papéis, reprodutivo e esportivo ao mesmo tempo. Apesar de que, alguns garanhões parecem lidar bem com o duplo desafio, para a maioria dos animais criados sob regime intensivo ou semi-intensivo, a libido e fertilidade tendem a diminuir com o manejo reprodutivo uma ou duas vezes por dia (Mc DONNELL et al. 2000, 2011). De acordo com Mc Donnell et al. (1995), a exposição do garanhão à égua, resulta em aumento nas concentrações de testosterona, do comportamento sexual e agressividade. Percebe-se que uma simples colheita de sêmen, com rápida estimulação do garanhão, resulta em pequenos aumentos nas concentrações de testosterona.

Muitos hormônios estão envolvidos na regulação da função reprodutiva dos machos, controlando o comportamento sexual, influenciando a excitação, os momentos de ereção e ejaculação e a detumescência pós-ejaculatória. Sabe-se que os hormônios esteróides sexuais estão ligados ao controle central do comportamento sexual. Os andrógenos parecem agir principalmente no controle espinhal, apresentando efeitos trópicos (aumenta a síntese de neuromediadores pró-erétil e facilita a transmissão do glânglio nicotínico) (KEAST et al. 1998). A dopamina (DA), na área pré-óptica medial (MPOA), facilita o comportamento sexual de camundongos machos (MELIS e ARGOLAS, 1995, HULL et al. 2002). Na MPOA a DA é liberada na presença da fêmea em estro e durante a cópula (HULL et al., 1995). A presença da testosterona é necessária para esse aumento pré-copulatório da liberação de DA. Embora a neuroendocrinologia da reprodução tem sido intensamente estudada em roedores e primatas nas últimas décadas, muito pouco foi pesquisado em eqüídeos. Uma melhor compreensão sobre os mecanismos que regulam os processos reprodutivos sexuais de comportamento

poderiam ser benéficos para aumentar o desempenho reprodutivo tanto em garanhões normais quanto em subférteis.

Segundo Mc Donnell (2009) o comportamento normal de um garanhão após aproximação de uma égua em cio pode incluir: vocalização, investigação olfatória e tátil e reflexo de flehmen. A maior parte dos animais apresenta ereção em até 2 minutos e realizam a monta 5-10 segundos após ereção. Dessa forma, os garanhões normalmente ejaculam após a primeira monta, tendo uma duração total do cortejo e copula que varia de 2-5 minutos.

Em estudo avaliando o comportamento de garanhões da raça árabe, Najjar et al. (2010) relataram maiores valores médios no número de montas (1,6 ; 1,2), tempo de preparação para colheita (107 s.; 89 s.) e tempo de colheita (136 s.; 117s.) para garanhões com menos de 15 anos de idade, quando comparado com os de mais de 15 anos. Os pesquisadores também observaram que quanto maior o número de montas e maior a duração da colheita, maior o número de espermatozoides mortos e menor a motilidade do sêmen fresco destes garanhões.

Analisando o comportamento de garanhões da raça Mangalarga Marchador, Oliveira (2014) não observou diferença nas características de comportamento pré copula em diferentes faixas etárias avaliadas para garanhões adaptados ao regime de colheita de sêmen. No mesmo experimento, características como tempo de reação e tempo de latência variaram de 1s a 29m39s e 1s a 7m53s, respectivamente.

2.6. A influência da sazonalidade e das concentrações de testosterona nos parâmetros seminais

Efeitos da estação nas funções gametogênica e endócrina dos testículos em garanhões têm sido bem relatados. Já revisado por Johnson (1985) e Roser e Hughes (1992), a reserva espermática, concentração de gonadotropinas, testosterona e estrógenos aumentam durante a estação de monta. Além do controle hipotalâmico e adeno-hipofisário, as funções gametogênica e endócrina testiculares são influenciadas por vários fatores autócrinos e parácrinos (MORERA et al.,1987; FABBRI e DUFAU,1998; YING,1989). Além disso, os esteróides testiculares também exercem efeitos locais nas funções das células de Leydig e Sertoli, possivelmente envolvendo também ações genômicas e não genômicas (SANCHEZ-BUENO et al., 1991, BLACKMORE,1993). Tendo em vista a

diversidade dos mecanismos endócrinos que controlam a função testicular, muito pouco se sabe sobre os machos equinos. Em acordo, os diagnósticos de infertilidade causada por disfunções endócrinas, continuam sem solução nas criações de equinos.

Hoffmann e Landeck (1999), em estudo avaliando a função endócrina testicular, sazonalidade e qualidade seminal, observaram que apenas a motilidade espermática estava correlacionada com a estação, seguindo a conclusão de que a função gametogênica do testículo é menos afetada pela estação do que a função endócrina. Sendo esse último importante fator que controla a funcionalidade do epidídimo e das glândulas acessórias e portanto, também, a motilidade espermática (JASKO et al., 1990; JOHNSON, 1991).

Janett et al. (2003) 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. (2003) obtiveram menores porcentagens de espermatozoides morfologicamente normais no verão, quando ocorreram as maiores concentrações de defeitos maiores, comparado à primavera e outono. Avaliando o parâmetro seminal de garanhões Mangalarga Marchador nas quatro estações do ano, Freitas (2010) observou que o volume do ejaculado com ou sem a fração gel e a motilidade espermática mostraram-se influenciados pela estação do ano.

2.7. Efeito sazonal sobre as concentrações de testosterona

Em garanhões, a função endócrina e conseqüentemente a testicular são influenciadas pela estação do ano (HOFFMANN e LANDECK, 1999) e de acordo com Morera et al. (1987) por inúmeros fatores autócrinos e parácrinos. 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. Sabe-se que no hemisfério Norte, as concentrações plasmáticas dos hormônios sexuais exibem padrão sazonal bem definido. Diversos autores verificaram a maior concentração plasmática de testosterona durante a estação reprodutiva, quando comparado à não reprodutiva

(BERNDTSON et al., 1974; HARRIS et al., 1982; COX et al., 1988; ROSER; HUGHES, 1992; HOFFMANN e LANDECK, 1999).

A influência da estação na concentração da testosterona no plasma periférico de garanhões já foi observada há mais tempo (BERNDTSON et al., 1974; COX e WILLIAMS, 1975; WIESNER e KIRKPATRICK, 1975; KIRKPATRICK et al., 1977). No entanto, Thompson et al. (1977) não obtiveram resultados significativos que revelaram o padrão sazonal esperado na concentração de testosterona em soro de garanhões, o que sugere que outros hormônios além da testosterona são considerados na regulação da reprodução dos garanhões. Em estudo feito com garanhões da raça Mangalarga Marchador, Freitas (2010) concluiu que o padrão de secreção da testosterona não apresentou um ritmo circadiano bem definido e as médias de secreção variaram com a estação climática.

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). 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).

2.8. Efeito sazonal sobre a biometria testicular

As dimensões testiculares estão diretamente relacionadas com a produção espermática diária, visto que esta produção depende do número 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).

Uma das influências da sazonalidade nas características reprodutivas do garanhão é o aumento do tamanho testicular durante a primavera e o verão, devido ao maior fotoperíodo (BURNS et al., 1984). O aumento da largura testicular resulta em maior produção espermática, o que sugere a positiva correlação entre volume testicular e número total de espermatozóides no ejaculado (LOVE et al., 1991). Além disso, as concentrações de testosterona são mais altas durante a estação reprodutiva, o que influencia também o volume testicular, maior na primavera e no verão (JOHNSON L. et al., 1987). Alguns estudos verificaram diferentes medidas dos testículo direito e esquerdo durante a estação reprodutiva e não reprodutiva (THOMPSON et al., 1979 e KAVAC et al., 2003). Essa variação, no entanto, não foi observada por Carluccio et al. (2013), em que as biometrias dos testículos direito e esquerdo não sofreram alterações entre estações, apesar de que, nesse mesmo estudo, observou-se influência sazonal no comportamento reprodutivo (tempo de reação) e nos parâmetros seminais.

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).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização geográfica e período experimental

O experimento foi realizado nos municípios de Viçosa, Muriaé e Teófilo Otoni, em Minas Gerais, Brasil, latitude variando entre 20°45'14" e 17°51'27". O período experimental foi dividido em duas fases, a primeira realizada em julho e agosto de 2013 (tratamento 1) e a segunda em janeiro e fevereiro de 2014 (tratamento 2).

3.2. Animais e instalações

Foram utilizados 11 garanhões da raça Mangalarga Marchador com idade entre 5 e 25 anos, que estavam alojados em baias dos Haras Laglória, Recreio e Invernada e no Setor de Equideocultura da Universidade Federal de Viçosa. Durante o período experimental, nos dias de colheita de sangue e de sêmen, os garanhões ficaram alojados em baias de alvenaria de 16 m², com cama de capim gordura ou maravalha. A alimentação foi oferecida duas vezes ao dia, sendo constituída por capim tifton (*Cynodon spp.*) picado (Haras Laglória, Recreio e Invernada) e capim elefante (*Pennisetum purpureum cv.cameroon*) com cana (*Saccharum officinarum*) picada (3,5% + 1% do peso vivo, respectivamente), sendo a cana oferecida apenas aos animais do primeiro tratamento (julho), sal mineral e água *ad libitum*. Os onze garanhões que compuseram o grupo experimental foram considerados hígidos e classificados como aptos à reprodução ao exame andrológico.

3.3. Biometria Testicular

As biometrias dos testículos de cada animal foram realizadas no dia das colheitas de sangue, no intervalo de colheitas, no período da manhã. Para realização das mensurações testiculares, com auxílio de paquímetro, os garanhões foram contidos em troncos e as seguintes medidas foram avaliadas:

- Comprimento testicular: avaliação realizada entre a inserção da cabeça e a cauda do epidídimo (avaliação crânio-caudal).

- Largura testicular: maior diâmetro lateral de cada testículo (avaliação látero-medial).

- Altura testicular: avaliação entre o corpo do epidídimo e sua extremidade contra lateral na região de maior diâmetro (avaliação dorso-ventral).

- Consistência testicular: classificou-se a consistência testicular de 1-3 (1-flácido, 2- normal (tenso-elástico), 3-rígido).

Com estes dados, foi calculado o volume testicular individual e combinado (a partir do somatório dos volumes dos dois testículos) conforme Love et al. (1991):

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

Em que,

VT: volume testicular (mm³);

C: comprimento testicular (mm);

L: largura testicular (mm);

A: altura testicular (mm)

3.4. Colheitas de sêmen

As colheitas de sêmen foram realizadas utilizando vagina artificial, modelo Botucatu¹, preenchida previamente com água aquecida a 47 °C. A mucosa plástica descartável que revestia internamente a mucosa de látex foi lubrificada com vaselina estéril. O sêmen foi colheitado em copo coletor revestido por saco plástico próprio para colheita, sendo o copo coletor protegido da luz e oscilações da temperatura.

Antes do início de cada colheita, os animais tiveram o pênis higienizado com água a 33 °C (RAPHAEL, 2007). Todas as colheitas de sêmen ocorreram com auxílio de égua em estro natural, durante a estação de monta, ou induzido com cipionato de estradiol² (5mL – 2mg/mL) , no período fora da estação de monta devidamente contida fisicamente.

Ao início do experimento, cada reprodutor foi submetido a seis colheitas 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

¹BiotechLtda, Botucatu, Brasil.

² ECP® – Pfizer Saúde Animal, SP, Brasil.

experimento. As colheitas de sêmen foram realizadas nos dois dias seguintes à colheitas de sangue, no período da manhã. Os garanhões foram retirados das baias e em local próximo foram feitas as colheitas.

3.5. Avaliação do comportamento

A partir da visualização da égua em estro pelo garanhão na área de colheita de sêmen, os seguintes tempos foram cronometrados e as seguintes variáveis foram quantificadas:

- Tempo de reação (segundos): duração entre a visualização da égua pelo garanhão até a ereção completa do pênis.

- Tempo de latência (segundos): duração entre a ereção e a realização da primeira monta do garanhão.

- Tempo de monta (segundos): duração entre o início da monta do garanhão na égua e a introdução do pênis na vagina artificial até a descida após ejaculação.

- Número de montas (n): número de montas, com garanhão em ereção, necessárias para a colheita do sêmen. Foram quantificadas apenas as montas em que houve introdução do pênis do garanhão na vagina artificial.

- Número de reflexos de flehmen(n): foram quantificados do momento de visualização da égua em cio pelo garanhão até a finalização da colheita de sêmen.

3.6. Avaliação do sêmen fresco

As características seminais analisadas após a obtenção do ejaculado foram: volume ejaculado livre de gel (mL), volume de gel (mL), motilidade espermática total (%), vigor espermático (0 a 5), concentração espermática (10^6 espermatozoides/mL). O volume do ejaculado e do gel foi aferido mediante a utilização de proveta graduada de 300 mL, previamente aquecida a 37 °C. O sêmen foi então acondicionado em banho Maria à 37 °C, onde permaneceu até que as análises fossem devidamente concluídas.

Para determinação da motilidade total e vigor espermático, uma gota de 20 μ L 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 determinada a partir de uma alíquota de 50 µL de sêmen diluída em 950 µL de formol salina tamponado, proporção 1:20. 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 10^6 , a fim de se obter o número de espermatozóides por mL de ejaculado.

A avaliação das células viáveis e não viáveis pelo teste supravital (SV) 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 feito 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 espermatozóides 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.

A integridade da membrana espermática foi avaliada pelo 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 de contraste de fase sob óleo de imersão e 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).

Para a avaliação da morfologia espermática, foram adicionados em 1mL 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.

3.7. Procedimento das colheitas de sangue e análise hormonal

As colheitas de sangue foram realizadas 20 dias após o início de cada solstício, de inverno e verão. Foram realizadas uma vez em cada estação durante um período de 12 horas (7h às 19h), com intervalo de trinta minutos entre cada colheita, o que representa 25 amostras por animal, por estação. No primeiro período, fora da estação de monta colheitou-se amostras dos 11 garanhões. No entanto, no segundo período, dentro da estação de monta, só foi possível realizar a coleta de 8 garanhões, uma vez que os animais foram vendidos e já não se encontravam nos haras e nem nas proximidades.

Para quantificação da testosterona sérica, a veia jugular de cada animal foi canulada com cateter 14G para obtenção do sangue. Para evitar possíveis transtornos, a cada colheita o cateter foi lavado com solução de heparina (1000UI/mL), visando diminuir a coagulação de sangue e entupimento do catéter. Anteriormente a cada punção descartou-se 1mL de sangue, a fim de diminuir a contaminação da amostra e depois o sangue foi depositado em tubos vacuteiner para centrifugação. As amostras foram centrifugadas a 330G por 10 minutos para a obtenção do soro, que foi acondicionado em tubos plásticos de 2 mL em duplicata e congelado a -20°C para posterior análise. A determinação das concentrações séricas de testosterona foi realizada pelo teste de quimioluminescência, pela técnica imuno-enzimática utilizando-se de kits de reagentes comerciais³, conforme as especificações do fabricante, no aparelho Access®⁴, que pertence ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

O preparo dos animais para colheita das amostras teve início sempre às 6:00h, uma hora antes do início das colheitas.

3.8. Análises estatísticas

Para análise dos dados o *Statistical Analysis System* foi utilizado (SAS, 2002). Para a avaliação da normalidade dos dados e homocedasticidade das

³ Beckman Coulter, Inc., CA, E.U.A.

⁴ Beckman Coulter, Inc., CA, E.U.A.

variâncias, foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e Cochran e Bartlett, respectivamente.

As variáveis quantitativas (Motilidade, volume seminal, volume testicular, concentração espermática, supravital (SV), TR, TL, TM, RF, NM e as concentrações médias e picos de testosterona) foram analisadas por análise de variância.

As concentrações de testosterona em cada horário de colheita foram comparados dentro e fora da estação pelo teste t.

As variáveis qualitativas (aspecto seminal, vigor espermático e consistência testicular) foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

A correlação simples de Pearson foi realizada entre as variáveis quantitativas, e a correlação de Spearman entre as variáveis qualitativas. A significância adotada foi $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à biometria testicular (tabela 2), percebeu-se que as variáveis quantitativas avaliadas, comprimento, altura, largura, e volume dos testículos direito e esquerdo não tiveram diferenças entre as estações ($P > 0,05$). Robalo Silva (2007), em pesquisa com garanhões da raça Lusitano, em alta latitude ($39^{\circ}12'$ ao Norte) observou variabilidade sazonal e entre garanhões em relação às dimensões testiculares. Estudando jumentos da raça Martina, Carluccio et al. (2013) observaram que nas condições experimentais impostas, à latitude de $42^{\circ}42'$, a morfometria testicular não sofreu alterações estacionais. Os dados desses experimentos levantam a possibilidade da influência de outros fatores, não só a duração do fotoperíodo, nas medidas testiculares ao longo do ano. No presente estudo, pode-se mostrar que sob essas determinadas condições geográficas e de manejo, os garanhões da raça Mangalarga Marchador não apresentaram diferenças nas biometrias testiculares durante as estações avaliadas.

Tabela 02: Valores médios e desvio padrão da biometria testicular de garanhões da raça Mangalarga Marchador fora da estação reprodutiva (tratamento) e na estação de monta (tratamento 2)

Características	Tratamento 1 (n=11)	Tratamento 2 (n=8)
CONSTD	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,0
CTD (mm)	98,0 ± 3,3	100,2 ± 5,0
LTD (mm)	57,1 ± 1,5	54,1 ± 2,0
ATD (mm)	74,0 ± 2,6	72,5 ± 2,5
VTD (mm ³)	222139,9 ± 18634,7	207588,2 ± 17740,5
CONSTE	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,0
CTE (mm)	100,9 ± 4,3	100,5 ± 4,5
LTE (mm)	61,2 ± 2,2	62,7 ± 3,2
ATE (mm)	73,4 ± 2,8	75,7 ± 3,8
VTE (mm ³)	245167,9 ± 22386,9	259705,8 ± 35519,5
VTT (mm ³)	233653,9 ± 19166,3	233647,0 ± 24708,0

$P > 0,05$, ANOVA.

Consistência, comprimento, largura, altura e volume do testículo direito (CONSTD, CTD, ATD, VTD); consistência, comprimento, largura, altura e volume do testículo esquerdo (CONSTE, CTE, ATE, VTE); volume testicular total (VTT).

Todos os animais utilizados neste estudo apresentaram consistência testicular normal e biometrias constantes durante os dois períodos avaliados (Tabela 02). A determinação da dimensão e da consistência testicular deve ser sistematicamente associada à avaliação das características seminais nos exames de avaliação do potencial reprodutivo de cada garanhão (ROBALO SILVA, 2007), visto que, o tamanho e volume testiculares são medidas diretas da quantidade de parênquima presente no tecido (THOMPSON et al., 1979), considerando-se também que é possível de prever a produção espermática a partir do volume testicular.

Com relação aos parâmetros seminais avaliados, volume, aspecto, motilidade, vigor, concentração e supra-vital, os resultados obtidos não apresentaram diferenças entre as estações do ano ($P > 0,05$) (Tabela 03). Na literatura há citações de variações desses dados ao longo do ano, 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). Freitas (2010), avaliando garanhões da raça Mangalarga Marchador em região de clima tropical, a 20° 45'20" de latitude sul, encontrou diferenças sazonais, tanto o volume médio total quanto o volume médio desprovido da fração gel aumentaram progressivamente entre o verão e o outono (30,2 a 73,1 mL e 35,8 a 115,4 mL, respectivamente). Essas diferenças podem ser explicadas em função das diferentes raças estudadas, frequência na coleta de sêmen e principalmente pela latitude e pelo clima, que parece influenciar o comportamento sexual dos reprodutores e a proporção de gel nos ejaculados (ROBALO SILVA et al., 2007).

Tabela 03: Média e desvio padrão dos parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador na estação não reprodutiva (tratamento 1) e na estação de monta (tratamento 2)

VARIÁVEIS	TRATAMENTO 1 (n=11)	TRATAMENTO 2 (n=8)
Volume (mL)	49,8 ± 4,7	59,6 ± 5,6
Aspecto	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,1
Motilidade (%)	74,3 ± 1,7	73,4 ± 1,9
Vigor (1-5)	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2
Concentração (10 ⁶ /mL)	163,0 ± 11,5	136,9 ± 10,5
Supra Vital (%)	78,9 ± 2,1	73,8 ± 1,8

P > 0.05, ANOVA.

Durante as avaliações microscópicas do sêmen fora da estação reprodutiva e dentro dela, Silva et al. (2007) observaram valores de motilidade total (MT) e progressiva (MP), respectivamente, $76,67 \pm 5,59$; $66,67 \pm 5,59$; $83,89 \pm 5,46$; $75,56 \pm 6,35$ para o sêmen *in natura*, logo, os valores de MT e MP dos espermatozoides no verão foram superiores àqueles observados no inverno. Da mesma forma, no mesmo trabalho, o vigor espermático do sêmen *in natura* apresentou-se superior nas amostras colhidas na estação reprodutiva ($4,00 \pm 0,71$) quando comparados àquelas colhidas na estação não reprodutiva ($3,39 \pm 0,42$). É importante ressaltar, que o experimento citado foi realizado a $8^{\circ}01'18''$ de latitude Sul, ou seja, a diferença entre duração do fotoperíodo entre as estações é muito pequena, o que leva a pensar na interação de outros fatores climáticos na influência da reprodução equina e na variação individual de garanhões.

Freitas (2010) obteve valores superiores de motilidade espermática durante as estações de outono e inverno, 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. Esses autores relataram que as diferenças estacionais na motilidade espermática podem ser influenciadas pelo manejo dos animais, frequência na colheita 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).

Conforme exposto na Tabela 03, os valores médios obtidos nas duas estações para o volume total do ejaculado, vigor e concentração espermática foram semelhantes aos resultados apresentados por Oliveira (2014) trabalhando com garanhões da raça Mangalarga Marchador ($61,3\text{mL}$; $3,4$ e $159,4 \times 10^6$ espermatozoides/mL, respectivamente) Da mesma forma, as médias de motilidade espermática total e integridade da membrana espermática, avaliada pelo teste supra-vital, foram também semelhantes aos obtidos pelo mesmo pesquisador ($73,94$ e $72,8$, respectivamente). Os valores médios de motilidade espermática total também foram semelhantes aos descritos para raças como Thoroughbred, Shetland, Appalosa, Ponei, Palomino e Quarto de Milha que foram respectivamente, 71 , 70 , 73 , 70 , 74 %. Foram inferiores aos valores médios descritos para as raças Árabe e Standardbred, respectivamente, 85 e 79 % (DOWSETT e KNOTT, 1996).

As características de tempo de reação, tempo de latência, tempo de monta e número de montas não apresentaram diferenças entre os períodos estudados ($P > 0,05$) (Tabela 04).

Tabela 04: Médias e desvios padrão dos parâmetros comportamentais no momento pré-cópula observados nos períodos fora da estação reprodutiva (tratamento 1) e durante a estação de monta (tratamento 2)

VARIÁVEIS	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2
TR	48.7 ± 10.5	32.2 ± 7.3
TL	74.7 ± 13.7	60.9 ± 10.5
TM	96.0 ± 15.5	87.8 ± 9.1
RF	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2
NM	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1

$P > 0.05$, ANOVA.

TR = Tempo de Reação, TL= Tempo de latência, TM = Tempo de monta, RF = número de reflexos de flehmen, NM = número de montas.

Thompson et al. (1977) trabalhando com garanhões submetidos ao tratamento com luz artificial, simulando o aumento natural do fotoperíodo em uma região de latitude 40°35' ao norte, também não verificaram alterações em relação ao número de montas. No entanto, o tempo de reação foi menor nos animais que foram submetidos à luz. Isso já havia sido relatado por Skinner e Bowen (1968) e Pickett et al. (1970,1976) em que a média do tempo de reação tende a ser a maior durante o inverno e a menor durante a estação de monta natural. Talvez, a menor latitude em que foi realizado o presente estudo, com pouca diferença entre a duração do fotoperíodo durante as estações, não foi possível de perceber esta diferença de comportamento dos garanhões.

Os valores obtidos para o comportamento neste experimento foram inferiores aos observados por Oliveira (2014), que trabalhou com 110 garanhões da raça Mangalarga Marchador, em que as médias para tempo de reação, tempo de latência, tempo de monta, número de reflexos de flehmen e número de montas foram 101,1s; 28,1s; 32,8s; 0,9; 1,6, respectivamente. Isso pode ser observado na tabela 04. Percebe-se então, que neste estudo, a duração da colheita de sêmen foi menor do que o verificado para a raça Mangalarga Marchador por Oliveira (2014). O número de colheitas de sêmen e de garanhões trabalhados pode explicar a diferença dos resultados.

Nett (1993) sugere que, para a dosagem de hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular, as colheitas de sangue devem ser realizadas num período mínimo de seis a oito horas e em intervalos de 30 minutos, visto que a avaliação de uma única amostra pode estimar concentrações de três a quatro vezes diferentes. Como observado na tabela 05, os picos de testosterona observados nos dois tratamentos, são superiores aos valores de referência determinados para garanhões segundo Nachreiner e Hyland (1993) (200-1000pg/ml), trabalhando com animais puro sangue inglês em única colheita no dia. Isso explica a necessidade da colheita de amostra sanguínea em vários momentos do dia, já que a maioria dos estudos avaliando a concentração dos hormônios esteróides se baseia em uma colheita no dia. Além disso, deve-se levar em conta a metodologia de análise hormonal utilizada, uma vez que os trabalhos relacionados a dosagem de hormônios esteróides são embasados na análise por radioimunoensaio (RIA) e neste estudo, determinamos os valores pelas análises da quimioluminescência.

Os animais neste experimento não apresentaram comportamento sazonal quanto às concentrações séricas de testosterona. Corroborando com Pacheco (2002), trabalhando com cinco animais da raça Puro Sangue Árabe, em pesquisa realizada na região sudeste do país (~ 22 ° S) em que as concentrações médias de testosterona, obtidas de colheita única de sangue durante a manhã, ao longo das estações do ano não apresentaram variações nas estações climáticas.

A influência do fotoperíodo na secreção de testosterona tem sido relatada na literatura (BERNDTSON et al., 1974; HARRIS et al., 1982; JOHNSON; THOMPSON, 1983; COX et al., 1988; ROSER; HUGHES, 1992; HOFFMANN e LANDECK, 1999; PACHECO, 2002; LEME, 2003), o que indica que, normalmente, as maiores concentrações desse hormônio são observadas durante o período de maior luminosidade. No entanto, a maioria dessas pesquisas são realizadas em regiões de clima temperado, em que devido às altas latitudes, as estações climáticas são muito bem marcadas, caracterizadas por uma maior diferença entre o comprimento do dia durante o ano. Nas regiões tropicais, como as estudadas neste experimento, as estações climáticas são menos definidas e os meses de inverno não são necessariamente impróprios para a reprodução dos machos equinos, o que reflete em menores mudanças da luminosidade ao longo do ano, o que pode não ser suficiente para a sinalização da luminosidade. 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°. Apesar disso, o

efeito da diferença de luminosidade entre estações, mesmo que pequena, é observado nas fêmeas equinas, que entram em anestro durante um período do ano.

Tabela 05: Picos e médias das concentrações de testosterona em garanhões da raça Mangalarga Marchador avaliados fora da estação reprodutiva (Tratamento 1) e durante a estação de monta (Tratamento 2)

	Tratamento 1	Tratamento 2
Pico de testosterona (pg/mL)	1676,4 ± 277,2	2451,1 ± 956,0
Concentração média de testosterona (pg/mL)	835,4 ± 32,2	854,5 ± 53,0
Concentração média de testosterona (pg/mL)*	752,4 ± 36,1	854,5 ± 53,0

P > 0.05. * 8 garanhões; pelo teste t.

Freitas (2010) não observou um padrão regular de secreção diária da testosterona, assim como pesquisa conduzida por Cox e Williams (1975). No mesmo estudo, a pesquisadora percebeu variação de secreção do hormônio entre animais e entre estações, em que as maiores concentrações foram observadas, de uma forma geral, entre 10:00 e 14:00h, mas outros picos de secreção ocorreram ao longo das 24 horas de colheita em todas as estações. Essa mesma inconstância em relação à secreção do hormônio foi proposto por Nett (1993), no entanto, obteve as maiores concentrações ao entardecer. De acordo com Pickett et al. (1989), as concentrações deste hormônio estão elevadas às 06:00 e 18:00h. Em estudo conduzido por Sharma (1976), as maiores concentrações de testosterona foram observadas nas colheitas realizadas às 08:00h, corroborando com Kirkpatrick et al. (1976), enquanto Ganjam e Kenney (1975) observaram que as maiores concentrações ocorriam às 06:00h. Como mostrado nas figuras 2 e 3, pode-se perceber que a distribuição dos valores de testosterona foi diferente dentro e fora da estação, apesar de não se observar diferença nas médias das concentrações. Ainda, as figuras mostram que as diferenças foram maiores nas colheitas pela manhã, em que as concentrações no período durante a estação de monta foram maiores do que fora da estação reprodutiva. Essa variação no perfil de secreção hormonal justifica, mais uma vez, a importância da metodologia empregada, colheita a cada 30 min, visto que a maioria dos estudos se baseia em amostras únicas, normalmente obtidas no período da manhã. A partir das figuras 2 e 3, pode-se pensar que a secreção de testosterona ocorreu de forma pulsátil e sem um comportamento definido entre os diferentes períodos de luminosidade. O que mais uma vez, confirma que uma única coleta de sangue durante o dia pode

levar a superestimação ou subestimação de resultados, o que provoca uma conclusão errônea em relação o status endócrino daquele animal.

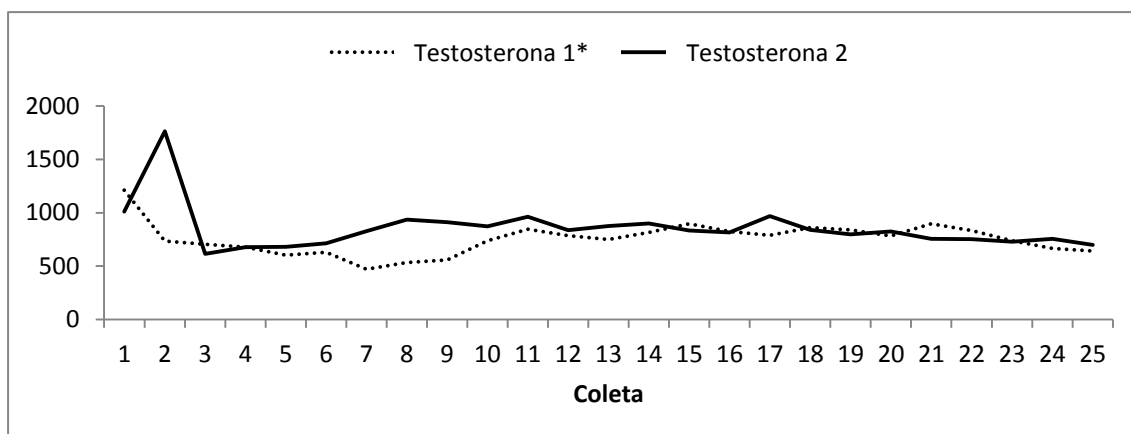


Figura 02: Médias das concentrações de testosterona (pg/mL) em garanhões da raça Mangalarga Marchador em cada sessão de colheita (Testosterona 1=Fora da estação reprodutiva /Testosterona 2=durante a estação de monta)

*Médias baseadas nos dados obtidos com os 11 garanhões

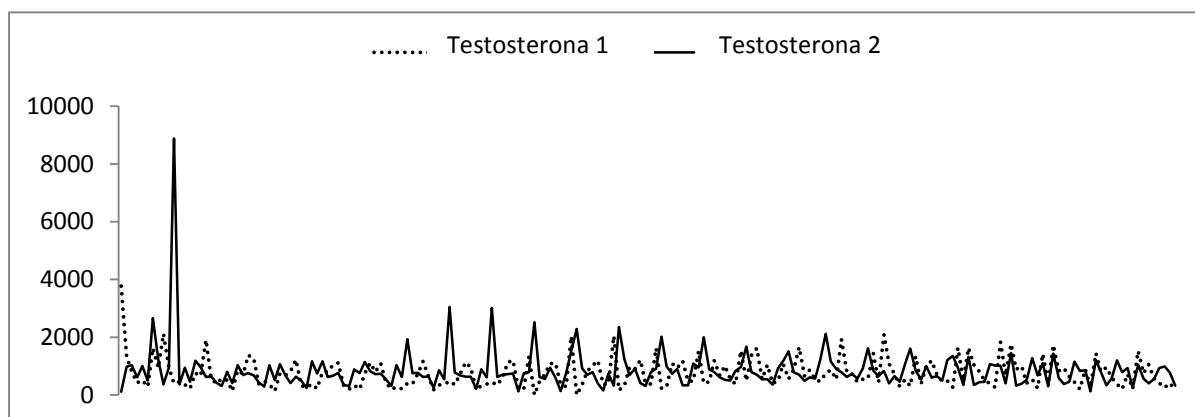


Figura 3: Valores da concentração sérica de testosterona (pg/mL) obtidos de garanhões da raça Mangalarga Marchador em 25 colheitas intervaladas por 30 minutos durante 12h

Nos resultados deste estudo não se verificou relação da concentração de testosterona com volume do ejaculado, motilidade espermática, concentração espermática e integridade espermática ($P>0,05$). Pickett et al. (1976) verificaram baixa correlação entre as concentrações desse hormônio e parâmetros seminais. No entanto, no presente estudo, quando relacionado ao comportamento no momento pré-cópula, percebeu-se média correlação, do número de montas com as concentrações séricas de testosterona (Tabela 06). Como já exposto, alguns pesquisadores observaram que em garanhões, as concentrações circulantes de

testosterona são influenciadas pela estação e são maiores durante a estação reprodutiva (BERNDTSON, et al., 1974; THOMPSON, 1977; KIRKPATRICK, 1977; CLAY, 1988). Esse fato, associado às mudanças de comportamento sazonais é consistente com a hipótese de que variações sazonais na libido e na espermatogênese são mediados, em parte, pela disponibilidade do andrógeno (PICKETT, 1992). Ainda, isso pode explicar os resultados verificados neste estudo, em que não se percebeu alterações sazonais do comportamento sexual no momento pré-cópula e das concentrações de testosterona.

Apesar de existir diferença significativa nas dosagens de testosterona entre animais (Tabela 07), não ocorreu diferença entre as estações. No entanto, ocorreu diferença entre a interação animal e estação, o que permite concluir que em alguns animais as concentrações médias do andrógeno apresentou comportamento sazonal, enquanto em outros animais, esse comportamento não foi observado, Thompson (1977), Thompson et al. (1985) e Pacheco (2002) não observaram alterações da interação animal e estação e entre animais, Freitas (2010) trabalhando com garanhões da mesma raça deste estudo, observou diferenças significativas.

Em relação aos resultados obtidos o que deve ser levado em consideração é que o fotoperíodo exerce importante influência nos mecanismos reprodutivos da espécie eqüina, mas ainda assim, as inter-relações entre o ambiente, a nutrição e a reprodução devem ser mais estudadas. Freitas (2010) observou altas correlações entre variáveis climáticas e características do sêmen fresco. Sabe-se que a variação do fotoperíodo das regiões estudadas é muito pequena, por isso talvez, os resultados observados. No entanto, deve-se atentar para outros fatores, visto que os efeitos do fotoperíodo podem ser modificados por temperatura, nutrição, condição corporal e idade (GRUBAUGH et al., 1982). Além disso, a escassez de literatura com metodologia semelhante, várias colheitas durante o dia para a dosagem de hormônios esteróides e análise pela quimioluminescência, dificulta a comparação entre os resultados.

Ainda, devem ser consideradas 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. O anestro sazonal das fêmeas foi observado claramente em todas regiões estudadas, tendo em vista que nas coletas durante a estação não reprodutiva (tratamento 1), foi necessária a indução das fêmeas ao estro para serem utilizadas como manequim.

Tabela 06: Correlação simples de Pearson dos parâmetros quantitativos de biometria testicular e qualidade seminal e comportamento no momento pré-cópula com os picos e médias de testosterona em garanhões da raça Mangalarga Marchador

	Pico testosterona	Média testosterona
VTD(mm ³)	-0,08	0,11
VTE(mm ³)	-0,09	-0,12
Volume (mL)	0,25	0,01
Motilidade (%)	0,12	0,20
Concentração (10 ⁶ /mL)	0,13	0,35
SV(%)	0,04	0,37
TR (s)	-0,02	0,33
TL (s)	0,03	0,34
TM (s)	-0,01	0,27
RF	-0,04	0,33
NM	0,23	0,56*

* P < 0.05; **VTD (Volume testicular direito), VTE(Volume testicular esquerdo), SV(supra-vital), TR(Tempo de Reação), TL (Tempo de latência), TM (Tempo de monta), RF (número de reflexos de flehmen), NM (número de montas).

Tabela 07: Médias e desvio-padrão da concentração de testosterona (pg/mL) por garanhão da raça Mangalarga Marchador no período fora da estação reprodutiva (tratamento 1) e dentro da estação de monta (tratamento 2)

Garanhões	Tratamento 1	Tratamento 2
1	1401,2 ±136,7 ^{a1}	788,3 ±63,0 ^{b2}
2	966,2 ±44,0 ^{a2}	670,1 ±36,2 ^{a23}
3	813,5 ±59,4 ^{a3}	861,8 ±335,7 ^{a2}
4	404,9 ±28,2 ^{a4}	377,2 ±29,7 ^{a3}
5	407,4 ±18,0 ^{b4}	980,2 ±32,6 ^{a2}
6	652,1 ±127,3 ^{a34}	910,1 ±88,5 ^{a2}
7	832,7 ±93,8 ^{b3}	1559,9 ±146,0 ^{a1}
8	547,5 ±59,1 ^{a34}	688,1 ±57,7 ^{a23}

Valores seguidos por letras diferentes na linha diferem entre si (P < 0.05), valores seguidos por números diferentes na coluna diferem entre si (P < 0.05). Resultados obtidos pelo teste t.

5. CONCLUSÃO

As biometrias testiculares, parâmetros seminais e comportamentais e concentrações de testosterona não são influenciadas pelo fotoperíodo dentro das condições geográficas e de manejo estudadas. Além disso, as características biométricas, comportamentais e seminais não se mostram influenciadas pelas concentrações séricas de testosterona.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEGRA, M.; REITER, R.J.; TAN, D.X.; GENTILE, C.; TESORIERE L. & LIVREA M.A. 2003. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **Journal of Pineal Research**. 34 (1): 1–10.

AMANN, R.P. 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology**; 2 ;37—58. **and artificial insemination**. Ed. By Juan C. Samper, 2 ed., p. 41-46.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAVALO MANGALARGA MARCHADOR – ABCCMM. **Arquivos**. Belo Horizonte: ABCCMM, 2010.

BEDRAK, E., SAMUELS, L.T. 1969. Steroid biosynthesis by the equine testis. **Endocrinology**. Dec: 85(6):1186-95.

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

BERLINGUER, F.; LEONI, G. G.; SUCCU, S. et al. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. **Journal of Pineal Research**, v. 46, p. 383-391, 2009.

BIELANSKI, W. 1975. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. In: **International Symposium on Equine Reproduction**, 1974. Cambridge. Proc. Cambridge. p.19-24.

BLACKMORE, P.F. 1993. Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca²⁺-influx and the acrosome reaction in human sperm. **Cell Signalling** 5, 531–538.

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

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

BURNS, P.J.; JAWAD, M.J.; WELD, J.; KAUFMAN, W.C.; WITHERSPOON, D.M.; WILSON, E.A.; DOUGLAS, R.H. 1984. Effects of season, age and increased photoperiod on reproductive hormone concentrations and testicular diameters in Thoroughbred stallions. **Equine Veterinary Science**. 5:202-208.

BURNS, P.J.; JAWAD, M.J.; WELD, J.M.; KAUFMAN, W.C.; WITHERSPOON, D.M.; WILSON, E.A. 1984. Effects of season, age and increased photoperiod on reproductive hormone concentrations and testicular diameters in thoroughbred stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**. 4:202–8.

CABRAL, G.C.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R. 2004.Avaliação morfométrica de eqüinos da raça Mangalarga Marchador: medidas lineares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 989-1000.

CARLUCCIO, A.; PANZANI, S.; CONTRI, A.;BRONZO, V.; ROBBE, D.; VERONESI, M.C.2013.Influence of season on testicular morphometry and semen characteristics in Martina Franca jackasses. **Theriogenology**.79; 502-507.

CASAO, A.; MENDOZA, N.; PEREZ-PE, R.; GRASA, P.; ABECIA, J.A.; FORCADA, F. 2010. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. **Journal of Pineal Research**, 48(1), 39-46.

CLAUS, R.; HOFFMANN, B. 1980.Oestrogens compared to other steroids of testicular origin, in blood plasma of boars. **Acta Endocrinologica**, 94, 404–411.

CLAY, C.M.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. 1987. Influences of season and artificial photoperiod on stallions: testicular size, seminal characteristics and sexual behavior. **Journal of Animal Science**. 64:517–25.

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

CNA: Estudo do complexo do agronegócio cavalo no Brasil: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada ESALQ-USP/**Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil**, 2010. 70p (coletânea estudos gleba, 40).

COLENBRANDER, B.; PUYK H.; ZANDEE A. R.; PARLEVLIT, J. 1992. Evaluation of the stallion for breeding. **Acta Vet Scand Suppl**. 88, p. 29-37

COX, J.E.;WILLIAM, S.J.W.; ROWE P.H. 1975.Testosterone in normal, cryptorchid and castrated male horses. **Journal of Reproduction and Fertility**. 23(Suppl):75.

CUZZOCREA, S.; REITER, R.J. 2001.Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury.. **European Journal of Pharmacology** .426(1-2):1-10.

DINIZ, M.S.; TORRES, C.A.; RUAS, J.R.M.;MACHADO, G.V.; COSTA,S.P.; ÂNGULO, L.M. 2000. Concentração sérica de testosterona em touros zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29(3):738-744.

DOUGLAS, R.H.1982.Effect of increased photoperiod on hormone concentrations of Thoroughbred stallions. Proc. 3rd Int. Syrup.on Equine Reprod. Sidney, Australia. **Journal of Reproduction and Fertility**.Suppl 33:103-111.

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

DOWSETT, K.F.; PATTIE, W.A. 1987. Variation in characteristics of stallion semen caused by breed, age, season of year and service frequency. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 35; 645—647.

- DOWSETT, K.F.; PATTIE, W.A. 1982.Characteristics and fertility of stallion semen.**Journal of Reproduction and Fertility Suppl.** 32:1–8.
- DOWSETT, K.F.; OSBORNE, H.G.; PATTIE, W.A. 1984.Morphological characteristics of stallion's spermatozoa.**Theriogenology**, v.22, n.5, p.463-472.
- DUBOCOVICH, L.; RIVIERA-BERMUDEZ, M.A.; GERDIN, M.J.; MASANA, M.I. 2003. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors.**Frontiers in Bioscience.** 8(10):1093-108.
- DUBOCOVICH, M.L. & MARKOWSKA, M. 2005.Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. **Endocrine.** 27 (2): 101–110.
- FABBRI, A.; DUFAU, M.L.; 1988.Hormonal regulation of b-endorphin in the testis. **Journal of Steroid Biochemistry.** 30,347–352.
- FAOSTAT, 2007.
- FREITAS, B.W. 2010. Parâmetros fisiológicos e seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador na região da zona da mata mineira no decorrer das estações climáticas. **Tese de mestrado.** Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa.
- GANJAM, V.K.; KENNEY, R.M. 1975.Androgens and Estrogens in Normal and Cryptorchid Stallions.**Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v. 23, p. 67-73.
- 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. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. **Wisconsin: Cross Plains.** 1992. 642p.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. 1992.**Tratado de Fisiologia Médica.**
- HAAG, F.M. Evaluation of "dismount" semen in thoroughbred horse breeding.1959. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.1, p.312-314.
- HAFEZ, E.S.E. 1995. Hormônios, fatores do crescimento e reprodução. In: Reprodução Animal, 6ªed. São Paulo: Manole, 1995. p.59-94.
- HAMMES, A. M.; PIMENTEL, C. A.; FERNANDES, C. E. Fertilidade em garanhões avaliada através do exame andrológico. **Ciência Rural**, v.26, n.2, p.277-283, 1996.
- HENDRIKSE,J. 1966. Sperma van normal bevruchtend deekhengsten. **TidschDrierg9**; 1, 300-311.
- HOFFMANN, B.; LANDECK, A. 1999. **Animal Reproduction Science** 57; 89–98

HULL, E. M.; MEISEL, R. L.; SACHS, B. D. Male sexual behavior. In: PfaffDW et al., editors. *Hormones Brain and Behavior*. San Diego-CA: Elsevier Science (USA); 2002. pp.1-138.

HURTGEN, J.P. 1992. Evaluation of the stallion for breeding soundness. **Veterinary Clinics of North America.-Equine Practice.**, v.8, n.1, p.149-165.

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.

KEAST, J.R.;SAUNDERS, R.J. 1998. Testosterone has potent, selective effects on the morphology of pelvic autonomic neurons which control the bladder, lower bowel and internal reproductive organs of the male rat. **Neuroscience**, 85, pp. 543–556

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

JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. 1990. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988 **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.197, n. 3, p.389-394.

JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. 1990.The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion.**Theriogenology**, 35, 317–327

JOHNSON, L.; THOMPSON, J.R.1987.Effect of seasonal changes in leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, 81:227–32.

JOHNSON, L. 1991. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. **Biology of Reproduction**. 44, 284–291

KAVAK, A.; LUNDEHEIM, N.; AIDNIK, M.; EINARSSON, S. 2003.Testicular measurements and daily sperm output of Tori and Estonian breed stallions. **Reproduction of Domestic Animals**. 38:167–9.

KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.P.; PIERSON, R. 1983.Society for theriogenology manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Hastings: **Society for Theriogenology**, 100p.

KIRKPATRICK, J.F.; WIESNER, L.; KENNEY, R.M.; GANJAM, V.K.; TURNER, J.W. 1977. Seasonal variation in plasma androgens and testosterone in the North American wild horse. **Journal of Endocrinology**.72:237.

LAVI S.; LAVI P. et al. Melatonin administration alters semen quality in healthy men. **Journal of Andrology**, v.23, p.572-578, 2002.

- LOTUFO, C.M.; LOPES, C.; DUBOCOVICH, M.L.; FARSKY, S.H.; MARKUS, R.P. 2001. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **European Journal of Pharmacology**;430:351-7.
- LOVE, C.C; GARCIA, M.C; RIERA, F.R; KENNEY, R.M. 1991. Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl**, 44:99–105.
- MACCHI M.M.E BRUCE J.N. 2004.Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**.25 (3-4): 177–195.
- MAGANHIN, CARLA C. et al. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**. [online]. 2008, vol.54, n.3, pp. 267-271.ISSN 0104-4230.
- MALPAUX, B. et al. Biology of mammalian photoperiodism and critical role of pineal gland and melatonin. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, p. 336-347, 2001.
- MASANA M.I. & DUBOCOVICH M.L. 2001.Melatonin Receptor Signaling: Finding the Path Through the Dark. **Science-Signal Transduction Knowledge Environment**. 107: pe39.
- MASANA MI, SOARES JM JR, DUBOCOVICH ML. 17Beta-estradiol modulates hMT1 melatonin receptor function. **Neuroendocrinology**. 2005; 81(2):87-95.
- MCDONNELL SM, MURRAY SC. Bachelor and harem stallion behavior and endocrinology. **Equine Reproduction VI, Biol. Reprod. Monogr. Ser. Reprod Biol**1995;l:(in press).
- MCDONNELL SM. Normal sexual behavior. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. **Equine reproduction**. 2nd ed. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2011. p. 1385-95.
- MCDONNELL SM. Reproductive behavior of stallions and mares: comparison of free-running and domestic in-hand breeding. **Animal Reproduction Science** 2000;60-61:211-9.
- MCDONNELL SM. Stallion sexual behavior. 2009. IN. **Equine breeding management**
- MELIS, M. R.; ARGIOLAS, A. Dopamine and sexual behavior. **Neuroscience Biobehav Rev**, 19:19-38.
- MERKT, H. Exame andrológico e problemas de cobertura no garanhão. Esquema para o exame andrológico. In: **Encontro Nacional de Equideocultura**, 4, 1986, São Paulo. *Anais*.São Paulo: Sociedade Brasileira de Hipologia, 1986. p.33–34.
- MORERA, A.M., CHAUVIN, M.A., PERETTI DE, E., BINOUX, M., 1987.Somatomedin Cr Insulin-Like Growth Factor 1: an intratesticular differentiative factor of Leydig cells?. **Hormone Research**. 28, 50–57

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.

NAJJAR A, BENAOUN B, EZZAOUIA A, et al., 2010. Determination of sêmen sexual behavior parameters of Arabian stallions to be selected for an artificial insemination program under Tunisian conditions. *Am-Euras. Journal of Agricultural and Environment. Sci.*, 8 (2), p. 173-177.

NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; TAKAYAMA, H.; KATO, H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertility and Sterility*, v. 80, p. 1012-1016, 2003.

NISHIKAWA, Y. Studies on reproduction in horses. Tokyo: **Japan Racing Association**, 1959, 340p.

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.

ODONNELL, L., McLACHLAN, R.I., WREFORD, N.G., ROBERTSON, D.M. 1994. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology*, 135(6):2608-2614.

OLIVEIRA, R.R. Parâmetros reprodutivos de garanhões da raça Mangalarga Marchador em função da faixa etária (comportamento, biometria testicular, aspectos seminais, resistência ao refrigeração e congelamento de sêmen). **Tese de doutorado**. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa, 2014.

PACCAMONTI, D. L.; BUITEN, A. V.; PARLEVLIT, J. N; COLENBRANDER, B. Reproductive parameters of miniature stallions. *Theriogenology*, v. 51, p. 1343-1349, 1999.

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.

PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; BOWEN, R.A.; SQUIRES E.L.; MCKINNON, A. O. Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. **Proceedings of the 33rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, 1987; pp. 487–518.

PICKETT, B.W.; VOSS, J.L. Reproductive Management of the stallion. *Proc. American Association - Equine Practice*, v.18, p.501-531, 1973.

PIMENTEL, C. A. Aspectos da patologia espermática e a fertilidade no garanhão. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 1989. Belo Horizonte, Anais, CBRA, p. 127-132.

PINTO, L. F. B.; ALMEIDA, F; Q.; QUIRINO C. R. et al. Análise multivariada das medidas morfométricas de potros da raça Mangalarga Marchador: análise de

- components principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p. 589-599, 2005.
- POON AM, LIU ZM, PANG CS, BROWN GM, PANG SF. 1994. Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. **Biologic Signals**, v.3, p.107-17.
- PUGLIESI, G. Viabilidade e fertilidade do semen equino resfriado a 5°C por 24h com dois diluidores. 2009. 123p. **Tese de mestrado**. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa.
- RAESIDE, J.I., WILKINSON, C.R. E FARKAS, G., 1993 Ontogenesis of estrogen secretion by porcine fetal testis. **Acta Endocrinologica** 125, 549–554
- RIBELAYGA, C.; PÉVET, P. & SIMONNEAUX, V. 2000 HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. **American Journal of Physiology**, v.278, p.R1339-R1345.
- 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.
- ROCHA, R.M.P. et al. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.2, p.147-157, 2011.
- RONNBERG L, KAUPPILA A, LEPPALUOTO J, MARTIKAINEN H, VAKKURI O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 1990;71(2):492-6.
- ROSER, J.F., HUGHES, J.P., 1992. Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations, and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions. **Journal of Andrology**. 13, 214–223.
- ROY, D.; ANGELINI, N. L.; FUJIEDA, H.; BROWN, G. M.; BELSHAM, D. D. Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. **Endocrinology**, v. 142, p. 4711-4720, 2001.
- SANCHEZ-BUENO, A., SANCHO, M.J., COBBOLD, P.H., 1991. Progesterone and oestradiol increase cytosolic Ca²⁺ in single rat hepatocytes. **Biochemistry Journal**. 280, 273–276.
- SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT[®] 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SCHAEFFER, H. J.; SIROTKIN, A. V. Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells. **Experimental and Clinical Endocrinology e Diabetes**, v. 105, p. 109–112, 1997.
- SHI, J. M.; TIAN, X. Z.; ZHOU, G. B.; WANG, L.; GAO, C.; ZHU, S. E.; ZENG, S. M.; TIAN, J. H.; LIU, G. S. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in

vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 47, p. 318–323, 2009.

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

SHIU, S. Y., LI, L., SIU, S. W., XI, S. C., FONG, S. W., & PANG, S. F. (2000). Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. **Biological Signals and Receptors**, 9(3-4), 172-187.

SKINNER E.L., BOWEN J. 1968. Puberty in the Welsh stallion **Journal of Reproduction and Fertility**; 16:133-135.

SOUSA NETO J.A., SCALDAFERRI P., Melatonina e Câncer – revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 51 (1):49-58 , 2005.

SRINIVASAN V., SPENCE W.D., PANDI-PERUMAL S. R., ZAKHARIA R., BHATNAGAR K. P. e BRZEZINSKI A. 2009. Melatonin and human reproduction: Shedding light on the darkness hormone. **Gynecological Endocrinology**. 25 (12): 779–785.

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.

SULLIVAN, J. J.; TURNER, P. C.; SELF, L. C.; GUTTERIDGE, H. B.; BARTLETT, D. E. Survey of reproductive efficiency in the Quarter-horse and Thoroughbred. **Journal of Reproduction and Fertility Supply** 1975;23:315–18.

SULLIVAN, J.J.; TURNER, P.C.; SELF, L.C. et al. Survey of reproductive efficiency in the quarter horse and thoroughbred. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl.23, p.315-318, 1975.

TAMURA, H., NAKAMURA, Y., KORKMAZ, A., MANCHESTER, L. C., TAN, D. X., SUGINO, N., et al. (2009). Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, 92(1), 328-343.

THOMPSON JR DL, PICKETT BW, SQUIRES EL, AMANN RP. Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility Supply** 1979;27:13–7.

THOMPSON, D. L., JR., B. W. PICKETT, W. E. BERNDTSON, J. L. VOSS AND T. M. NETT. 1977. Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behavior and concentration of LH and testosterone in serum. **Journal of Animal Science**, 44:656.

VENTUROLI, E.; NICOLINI, L. **Garanhões Mangalarga Marchador 2011**. Nova Top Editora e Publicidade Ltda. 2011. p.4.

VOSS JL, PICKETT BW, LOOMS PR. 1982. The relationship between semen characteristics and fertility in Thoroughbred stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**.32, 635.

WIESNER, L. M. AND J. F. KIRKPATRICK. 1975. Seasonal and diurnal testosterone in wild stallions. Proc. 8th Annu.Soc. for the Study of Reprod.Abstr.no. 101.

WOO, M. M. M.; TAI, C. J.; KANG, S. K.; NATHWANI, P. M.; PANG, S. F.; LEUNG, P. C. K. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 4789–4797, 2001.

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.

YING, S.Y., 1989. Inhibins, Activins and Follistatins. **Journal of Steroid Biochemistry**. 33, 705–713.

ZIV L., LEVKOVITZ S., TOYAMA R., FALCÓN J., GOTHILF Y., Functional development of the zebrafish pineal gland: light-induced expression of period 2 is required for onset of the circadianclock. **Journal of Neuroendocrinology**, v.17,p.314-320, 2005.

7. APÊNDICE I

Figura 01: Gráfico das concentrações de testosterona (pg/mL) do Garanhão 1, fora da estação de monta (tratamento 01) e durante a estação reprodutiva (tratamento 02)

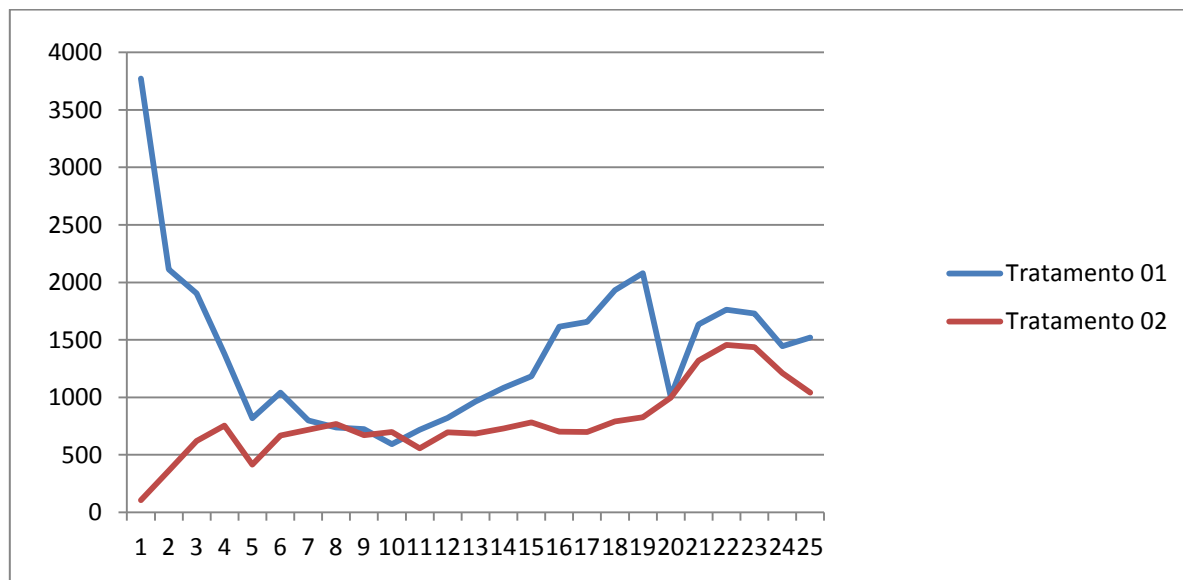


Figura 02: Gráfico das concentrações de testosterona (pg/mL) do Garanhão 2, fora da estação de monta (tratamento 01) e durante a estação reprodutiva (tratamento 02)

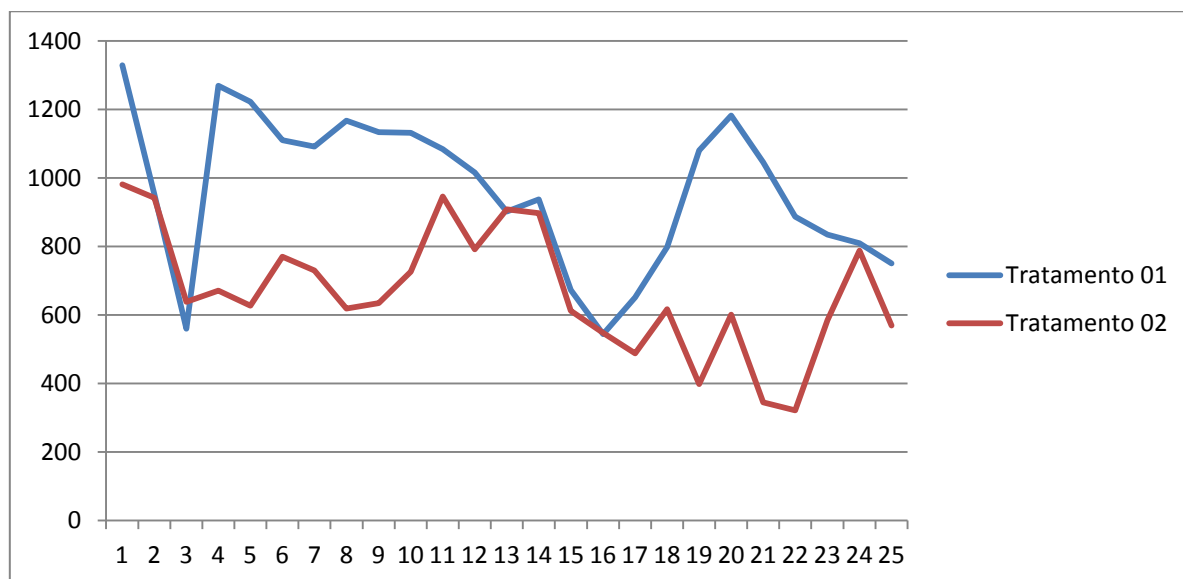


Figura 03: Gráfico das concentrações de testosterona (pg/mL) do Garanhão 3, fora da estação de monta (tratamento 01) e durante a estação reprodutiva (tratamento 02)

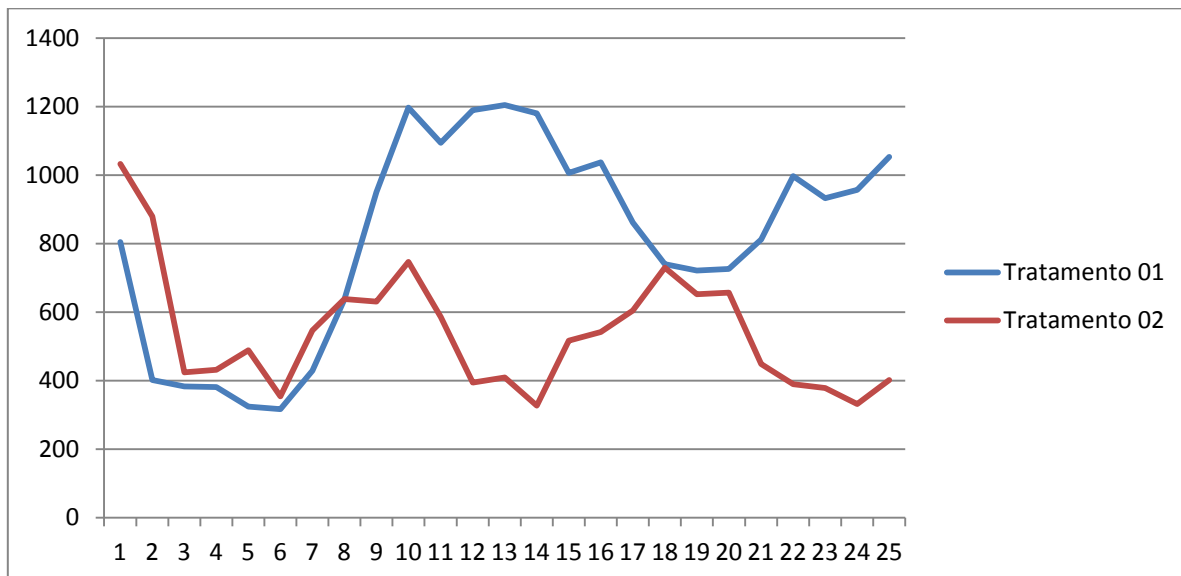


Figura 04: Gráfico das concentrações de testosterona (pg/mL) do Garanhão 4, fora da estação de monta (tratamento 01) e durante a estação reprodutiva (tratamento 02)

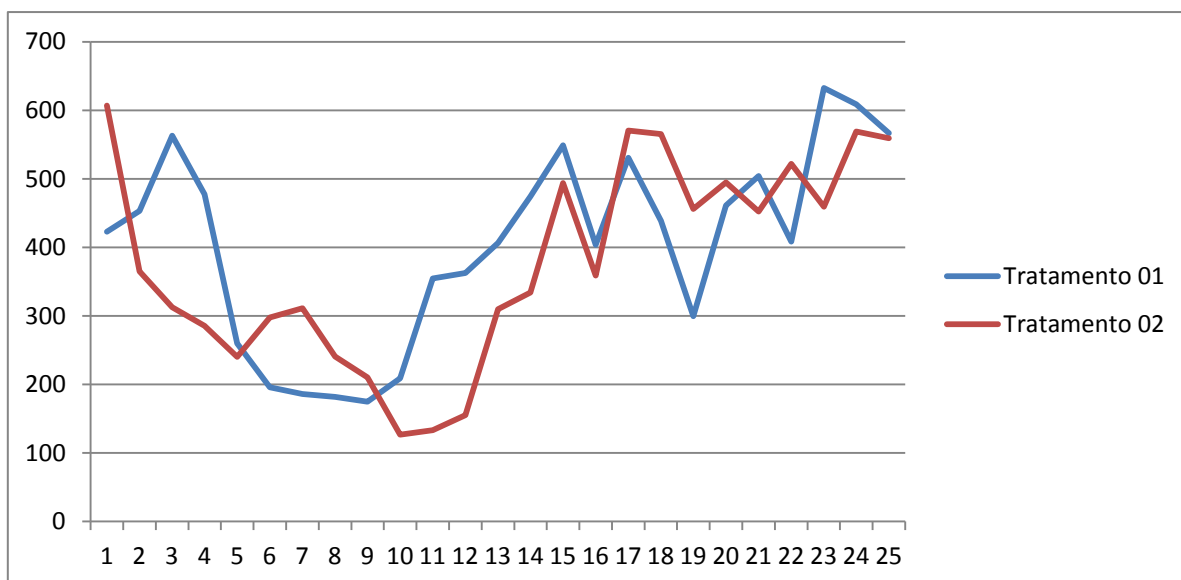


Figura 05: Gráfico das concentrações de testosterona (pg/mL) do Garanhão 5, fora da estação de monta (tratamento 01) e durante a estação reprodutiva (tratamento 02)

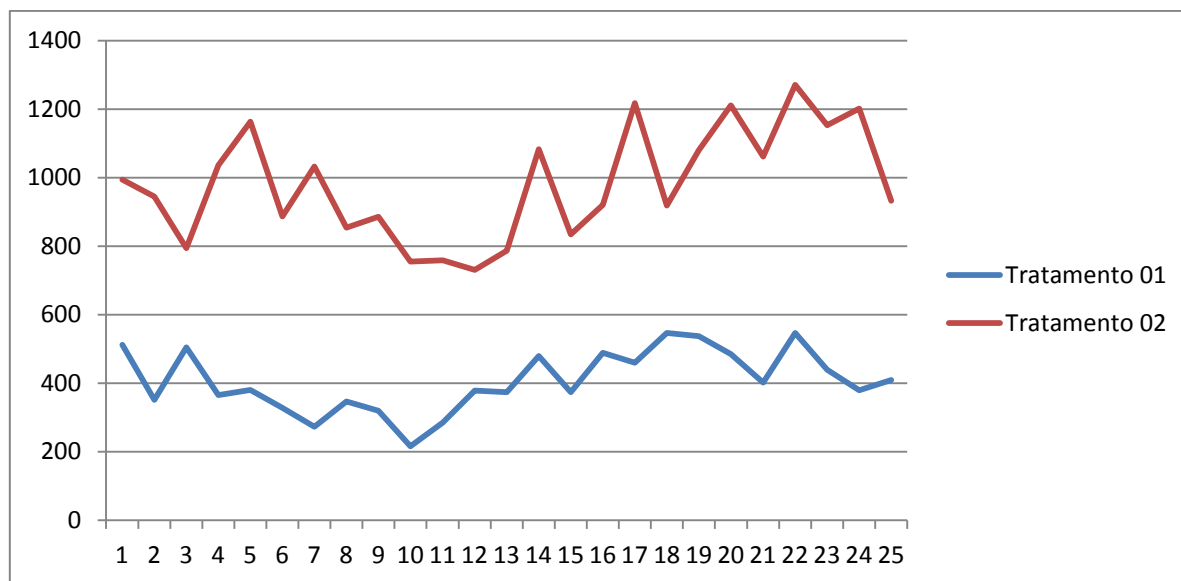


Figura 06: Gráfico das concentrações de testosterona (pg/mL) do Garanhão 6, fora da estação de monta (tratamento 01) e durante a estação reprodutiva (tratamento 02)

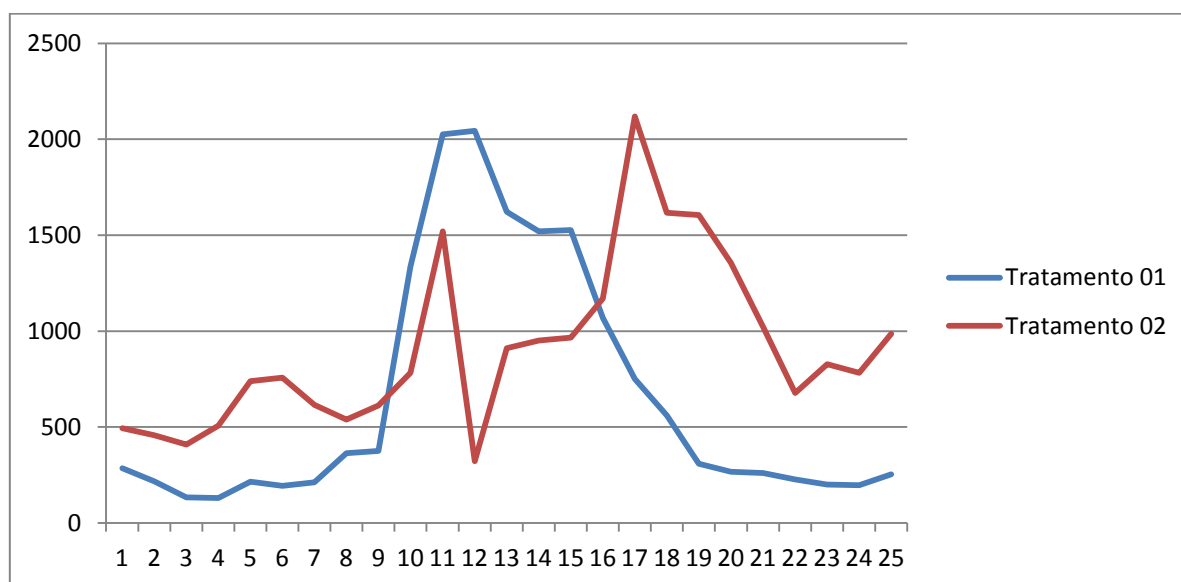


Figura 07: Gráfico das concentrações de testosterona (pg/mL) do Garanhão 7, fora da estação de monta (tratamento 01) e durante a estação reprodutiva (tratamento 02)

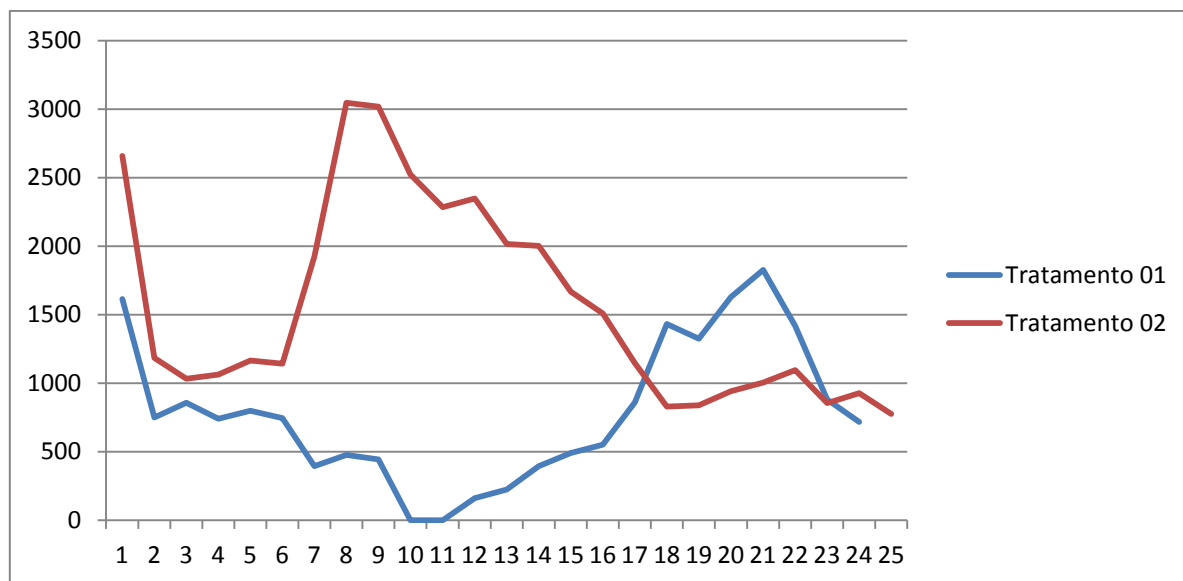


Figura 08: Gráfico das concentrações de testosterona (pg/mL) do Garanhão 8, fora da estação de monta (tratamento 01) e durante a estação reprodutiva (tratamento 02)

