

**Denise Pereira Leme**

**Características reprodutivas de garanhões  
mantidos sob luz natural ou contínua, em  
ambiente tropical**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária. Área de Reprodução Animal.

Orientador: **Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa**

Botucatu - SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Leme, Denise Pereira.

Características reprodutivas de garanhões mantidos sob luz natural ou contínua, em ambiente tropical / Denise Pereira Leme. – 2003.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução

CDD 636.1089261

Palavras-chave: Garanhões; Sazonalidade; Sêmen; FSH; LH; Testosterona; Citologia testicular

Aos meus queridos pais, **Rita e Bidy**, com muito, muito amor e admiração sempre, pois, nem com todo o tempo ou com todas as palavras eu conseguiria expressar o que sinto por vocês...

Ao **Giuliano**, pelo modo com que tem me mostrado outras maneiras de ver a vida, pelo amor e companheirismo; enfim, te encontrei....

## AGRADECIMENTOS

Em especial ao **Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa**, pela orientação, amizade e, principalmente, pela confiança e credibilidade ao meu modo de trabalhar.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** - UNESP - Campus de Botucatu e à **Área de Reprodução Animal**.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP** - pelo auxílio financeiro deste trabalho.

Aos meus amigos da Reprodução Animal: **docentes, funcionários e colegas da pós-graduação**, pelo apoio e auxílio constantes.

Aos amigos, **Miguel, Bió e Henrique**, que *muito* me ajudaram nas coletas, e a todos estagiários, residentes e pós-graduandos que colaboraram no cuidado dos garanhões.

À **Prof.<sup>a</sup> Maria Dalva Cesário** e ao funcionário **Jarbas do Amaral**, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências - UNESP - Campus de Botucatu, sempre prestativos.

À **Prof. Janet F. Roser**, pelo auxílio, credibilidade e ajuda a esse trabalho, acolhendo-me em seu laboratório, onde foram realizadas as dosagens hormonais. E à técnica **Lil Sibley**, muito prestativa e competente.

À **Prof.<sup>a</sup> Luzia Aparecida Trinca**, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências - UNESP - Campus de Botucatu,

pela grande ajuda na elaboração das análises estatísticas e pelos conselhos sempre muito pertinentes.

À **Prof. Maria Denise Lopes**, amiga, sempre disposta a ouvir e ajudar.

À **Virgínia** e ao **Neto**, além de pais do Giuliano, amigos que ganhei e que me acolheram nestes últimos anos.

Aos **Professores Fernanda e Marco**, pela ajuda constante.

Aos meus amigos **Luciara, Andréia, Érika, Bel, Elaine, Célia, Lissandro, João e Diane**, incríveis companheiros, e à **Vânia, Laís, Rosana, Lu Picon, Luzinha e Sabrina**, amigas que o tempo e a distância não separaram.

Ao meu irmão **Marcelo**, e sua grande família **Glaucia, Lorena, Letícia e Rodrigo** muito importantes para mim.

Ao Haras Agromen, Marcão, Thiago e Área de Reprodução Animal pelo empréstimo dos animais deste estudo.

Enfim, a todos os **garanhões** que permitiram tirar deles amostras importantes que foram transformadas em resultados e originaram este trabalho.

Obrigada, meu **Deus**...

“ A diversidade de nossas opiniões não provém do fato de uns serem mais racionais do que outros, mas tão somente em razão de conduzirmos o nosso pensamento por diferentes caminhos e não considerarmos as mesmas coisas...Assim, pois, como as ações da vida nem sempre permitem um adiamento, é uma verdade muito certa que, quando não está em nosso poder discernir as opiniões mais verdadeiras, devemos seguir as mais prováveis e, mesmo que não vejamos maiores probabilidades em umas do que em outras, devemos, todavia, decidirmos por algumas e passar a considerá-las depois não mais como duvidosas, uma vez que se referem à prática, mas como muito verdadeiras e certas, porque como tal deve ser considerada a razão que nos decidiu por elas”

*René Descartes*

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

*Cora Coralina*

## Sumário

Lista de figuras (gráficos).....	I
Lista da tabelas.....	II
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	4
2.1. Reprodução Estacional.....	5
Glândula pineal e a melatonina: suas influências na fisiologia circadiana e sazonal dos mamíferos.....	7
Ritmo Circanual.....	9
Refratariedade.....	12
Trópicos.....	13
Oportunismo.....	15
A reprodução dos machos: energia.....	16
2.2. Características reprodutivas dos garanhões.....	17
Regulação endócrina da função reprodutiva dos garanhões.....	17
Função testicular e espermatogênese: fatores endócrinos-parácrinos-autócrinos.....	19
Alterações endócrinas e testiculares de garanhões associadas à estação do ano.....	22
3. Material e método .....	30
3.1. Animais, local, grupos e etapas do experimento.....	31
3.2. Exame Andrológico.....	32
3.3. Colheitas de sangue para determinação de FSH, LH e testosterona séricos.....	35
3.4. Citologia aspirativa por agulha fina (Caaf) em testículos...	38
3.5. Metodologia estatística.....	40
4. Resultado.....	41
4.1. Exame andrológico.....	42

4.2. Concentrações séricas de FSH, LH e testosterona.....	47
4.3. Citologia aspirativa por agulha fina (Caaf).....	50
5. Discussão.....	55
5.1.Efeitos da estação do ano nas características testiculares, seminais e endócrinas.....	56
6. Conclusão.....	70
7. Referências bibliográficas.....	72
8. Resumo.....	84
9. Abstract.....	85

## Lista de figuras (gráficos)

- Figura 1** - Médias  $\pm$  EPM do volume testicular combinado ( $\text{cm}^3$ ) dos garanhões de Rubião Júnior (n=4) e do Lageado (n=4). (a,b: P=0,008), sem a influência da estação do ano..... 42
- Figura 2** - Médias  $\pm$  EPM do volume testicular combinado ( $\text{cm}^3$ ) de garanhões (n=8), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno..... 43
- Figura 3** - Médias  $\pm$  EPM do volume testicular combinado ( $\text{cm}^3$ ) de garanhões sob luz natural (n=4) e com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno..... 43
- Figura 4** - Concentrações séricas de FSH, LH e testosterona (T) de garanhões sob luz natural (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno..... 47
- Figura 5** - Concentrações séricas de FSH, LH e testosterona (T) de garanhões com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno..... 47
- Figura 6** - Concentrações séricas de FSH, LH e testosterona (T) de garanhões sob luz natural (n=4) e com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno..... 48

**Lista de tabelas**

<b>Tabela 1</b> - Médias $\pm$ EPM das características do sêmen dos garanhões de Rubião Júnior (n=4) e do Lageado (n=4), sem a influência da estação do ano.....	44
<b>Tabela 2</b> - Médias $\pm$ EPM das características do sêmen de garanhões (n=8), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	45
<b>Tabela 3</b> - Médias $\pm$ EPM das características do sêmen de garanhões sob luz natural (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	45
<b>Tabela 4</b> - Médias $\pm$ EPM das características do sêmen de garanhões com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	46
<b>Tabela 5</b> - Médias $\pm$ EPM das concentrações de FSH, LH e testosterona dos garanhões de Rubião Júnior (n=4) e do Lageado (n=4), sem a influência da estação do ano.....	48
<b>Tabela 6</b> - Médias $\pm$ EPM das concentrações de FSH, LH e testosterona de garanhões (n=8), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	49

<b>Tabela 7</b> - Médias $\pm$ EPM das concentrações de FSH, LH e testosterona de garanhões sob luz natural (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	49
<b>Tabela 8</b> - Médias $\pm$ EPM das concentrações de FSH, LH e testosterona de garanhões com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	49
<b>Tabela 9</b> - Médias $\pm$ EPM das porcentagens de células testiculares em Caaf dos testículos dos garanhões de Rubião Júnior (n=4) e do Lageado (n=4), sem a influência da estação do ano.....	50
<b>Tabela 10</b> - Médias $\pm$ EPM das porcentagens de células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões (n=8), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	51
<b>Tabela 11</b> - Médias $\pm$ EPM das porcentagens de células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões sob luz natural (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	51
<b>Tabela 12</b> - Médias $\pm$ EPM das porcentagens de células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	52

<b>Tabela 13</b> - Médias $\pm$ EPM dos diâmetros nucleares ( $\mu\text{m}$ ) das células testiculares em exames de Caaf dos testículos dos garanhões de Rubião Júnior (n=4) e do Lageado (n=4), sem a influência da estação do ano.....	52
<b>Tabela 14</b> - Médias $\pm$ EPM dos diâmetros nucleares ( $\mu\text{m}$ ) das células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões (n=8), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	53
<b>Tabela 15</b> - Médias $\pm$ EPM dos diâmetros nucleares ( $\mu\text{m}$ ) das células células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões sob luz natural (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	53
<b>Tabela 16</b> - Médias $\pm$ EPM dos diâmetros nucleares ( $\mu\text{m}$ ) das células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.....	54

## **1. Introdução**

Embora nos últimos anos, avanços indiscutíveis tenham sido atingidos com o aprimoramento de técnicas reprodutivas, muitos ainda são os estudos feitos para a compreensão dos mecanismos fisiológicos básicos envolvidos no simples fato do surgimento de um novo indivíduo.

Inumeráveis interesses movem a pesquisa, e não poderia ser diferente para aqueles que desejam ter uma eficiência máxima na criação e produção de eqüinos.

Desde o início do século passado, pesquisadores dedicam-se ao estudo da reprodução eqüina, mas é interessante notar que apenas recentemente aspectos reprodutivos ligados ao garanhão estão recebendo uma maior atenção.

O garanhão é definido como um reprodutor dos dias longos, com ciclo reprodutivo anual bem caracterizado; ao menos em regiões de clima temperado, onde as estações do ano são bem definidas, o clima é previsível e os meses de inverno podem muitas vezes ser incompatíveis para a reprodução. Neste sentido, muitas são as razões para se esperar que as características de animais de reprodução estacional sejam diferentes entre latitudes temperadas e tropicais; entretanto, poucos são os estudos realizados fora da zona temperada.

Recentemente, outro fator tem sido intencionalmente adicionado à reprodução de garanhões: o transporte de garanhões de um hemisfério a outro. O animal transportado, que até então recebia influências de fatores ambientais ligados a uma determinada região, passa a receber outras influências que podem alterar os mecanismos de

controle que regem sua estacionalidade reprodutiva. O mais evidente é a alteração da regularidade das variações do fotoperíodo, ou seja, de um dos mais confiáveis fatores que sincronizam a reprodução de animais estacionais com o meio ambiente em que eles vivem.

Com base nesses aspectos, este estudo teve como objetivos:

- 1) Verificar se existem diferenças das características reprodutivas entre as estações de maior e menor luminosidade do ano em garanhões que vivem em regiões tropicais, mais precisamente dentro da nossa realidade (Sudeste do Brasil – Botucatu, São Paulo);
- 2) Verificar como seriam tais características nos garanhões que vivem em regiões de clima tropical, sem o efeito da variação do fotoperíodo, ou seja, sob luz contínua durante todo o ano.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Reprodução Estacional**

O mundo é repleto de eventos cíclicos, a começar pela rotação diária da Terra e sua volta anual ao redor do Sol. Portanto, a tendência da maioria das coisas vivas é ajustar-se harmoniosamente e eficientemente às mudanças ambientais referentes a esta ciclicidade natural (Sharp et al., 1993).

Ritmos sazonais na fisiologia e no comportamento são bastante característicos na maioria das espécies que vivem em climas temperados e boreais (Bronson e Heideman, 1994). Tais ritmos são necessários para que haja uma sincronização entre as exigências das funções biológicas e os diferentes períodos do ano, permitindo assim que os indivíduos enfrentem situações de estresse, tais como: o declínio sazonal de alimentos e da disponibilidade de água, ou as flutuações da temperatura ambiente (Young e Nelson, 2001).

A maioria das plantas e animais vêm desenvolvendo sistemas inerentes que oscilam em frequências muito próximas aos ritmos naturais, permitindo que eles funcionem bem em um ambiente que muda constantemente. Sendo assim, não é difícil pensar que para uma ótima taxa de sobrevivência e propagação, as diferentes espécies devem coordenar seus processos reprodutivos com o ambiente externo (Saunders, 1977).

Mecanismos internos foram desenvolvidos para que os indivíduos antecipem as condições ambientais precárias, a fim de inibir a reprodução ou o crescimento. Esta capacidade de antecipação é possível pela monitoração de uma variedade de fatores extrínsecos, como o

comprimento do dia ou fotoperíodo, consumo de energia, qualidade do alimento e a disponibilidade de água (Klein e Nelson, 1999).

A estratégia mais comum para enfrentar com urgência as exigências de energia é cortar as atividades que não sejam essenciais para a sobrevivência imediata. Entre as atividades menos importantes, em situações desfavoráveis, estão a locomotora, a reprodutiva e a de crescimento (Klein e Nelson, 1999).

A supressão da reprodução durante o inverno permite que a energia seja usada para a termogênese e; se o inverno não for tão severo, a energia possa ser usada para uma melhora da função imune ou do crescimento, deixando a reprodução para momentos mais favoráveis (Klein e Nelson, 1999).

A vantagem da reprodução sazonal é que ela também assegura ao recém-nascido um início de vida nos meses de primavera ou verão, e provavelmente uma criação em um ambiente que forneça ótimas condições para a sua sobrevivência (Gerlach e Aurich, 2000).

Na maioria dos mamíferos que vivem em climas temperados, a reprodução segue um padrão sazonal, geralmente sob controle do fotoperíodo, que parece ser um dos sinais mais confiáveis das mudanças estacionais. Outros sinais, como a temperatura, disponibilidade e qualidade de alimento e concentração de chuvas, também são usados como fatores sazonais, porém não são tão confiáveis quanto o fotoperíodo, pois podem variar de ano para ano (Ben Saad e Maurel, 2002). Entretanto, servem como uma espécie de sintonia fina à resposta inicial ao fotoperíodo (Wingfield e Kenagy, 1991).

Dependendo da espécie, o aumento do fotoperíodo pode desencadear o início do período reprodutivo (efeito estimulante) ou iniciar uma regressão gonadal (efeito inibitório). Nas espécies com atividade reprodutiva em dias longos, o aumento sazonal da atividade sexual ocorre quando o comprimento da luz do dia aumenta, enquanto que nas espécies com coberturas em dias curtos, a estação reprodutiva é desencadeada pela diminuição da luz dos dias (Ben Saad e Maurel, 2002).

Fatores ambientais que estimulam ou mantêm a reprodução promovem a síntese e a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pela eminência média do hipotálamo, que positivamente regula a secreção das gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), pela pituitária anterior (Bronson e Heideman, 1994). Para que haja a organização dos ritmos circadianos e sazonais, as informações sobre os ciclos claridade:escuridão são transmitidas para as funções biológicas do corpo pelos padrões de secreção de melatonina (Arendt, 1998).

### **Glândula pineal e a melatonina: suas influências na fisiologia circadiana e sazonal dos mamíferos**

A habilidade de antecipar eventos periódicos coloca um organismo em uma posição de vantagem seletiva. Portanto, não é surpresa que a maioria das espécies tenham desenvolvido alguma forma de relógio biológico para regular os processos fisiológicos (Foster e Soni, 1998). A maioria dos relógios biológicos são regulados por alterações nas quantidades e talvez na qualidade de luz ao amanhecer ou entardecer, num processo chamado fotorregulação. Entretanto, embora saibamos que os fotorreceptores desempenhem um papel crucial na regulação do tempo biológico, a compreensão destes sistemas fotossensoriais (fotopigmentos

e elementos celulares) permanece mais que limitada (Foster e Soni, 1998).

Como parte do sistema visual, a glândula pineal parece desempenhar a mesma função em todos os mamíferos estudados: secretar o hormônio melatonina em resposta à intensidade de luz do dia (Arendt, 1998).

A melatonina tem uma função chave na regulação sazonal da atividade reprodutiva. Sinais de luz são recebidos pela retina e transmitidos à glândula pineal, que por sua vez sintetiza e secreta a melatonina. A secreção de melatonina segue um ritmo circadiano, pois ela é liberada em quantidades bem maiores nas horas de escuridão, ou seja, está inversamente correlacionada à exposição à luz (Gerlach e Aurich, 2000).

Um aumento no período diário de secreção de melatonina está associado com a diminuição na liberação de GnRH e conseqüentemente com a regressão das gônadas de animais de estacionalidade reprodutiva em dias longos. De modo contrário, o mesmo sinal de melatonina é seguido por uma ativação das gônadas nos animais de reprodução em dias curtos (Grosse et al., 1993).

A influência da glândula pineal e da melatonina no sistema circadiano parece ser bem mais importante em vertebrados inferiores que em mamíferos. Um exemplo disto é que, em alguns répteis e pássaros, a glândula pineal atua como o gerador central do ritmo circadiano; e nesses animais e nos peixes, o ritmo circadiano é mantido mesmo em culturas celulares da glândula pineal. Nas culturas celulares de mamíferos, a glândula pineal não é capaz de manter seu característico ritmo circadiano (Arendt, 1998).

Outro exemplo pode ser demonstrado pelo fato da pinealectomia causar efeitos bem mais suaves no ritmo circadiano de mamíferos do que em répteis e pássaros. Portanto, acredita-se que a glândula pineal e a secreção de melatonina não devem ser consideradas essenciais para o sistema circadiano no indivíduo adulto, visto que sem uma ou outra tal sistema é mantido (Arendt, 1998).

Entretanto, segundo Arendt (1998), a habilidade de resposta de certos mamíferos às mudanças no comprimento do dia, em termos de função sazonal, é abolida pela pinealectomia. Em animais de vida longa, a pinealectomia dessincroniza o ritmo sazonal da função reprodutiva, o que sugere que a glândula pineal, ao invés de gerar, sincroniza um suposto ciclo endógeno quanto à sua periodicidade anual.

### **Ritmo Circanual**

De modo geral, os ritmos circanuais são sincronizados por sinais ambientais periódicos, como as mudanças sazonais no comprimento do dia, resultando num período rítmico de aproximadamente 12 meses (Turek e Van Cauter, 1994).

As alterações no fotoperíodo induzem correspondentes alterações nos padrões circadianos da secreção de melatonina pela glândula pineal. Os padrões de melatonina são específicos para cada estação do ano. Portanto, o tempo de exposição ao sinal fotoperiódico pode ser crítico para o estabelecimento de um ritmo circanual (Randall et al.1998).

Uma importante propriedade dos relógios endógenos e um pré-requisito para a sua estabilização é possuir uma sensibilidade

diferencial às mudanças de fase do fator regulador (luz) (Randall et al., 1998).

Para Randall et al. (1998), a direção da mudança no comprimento do dia foi a característica do sinal fotoperiódico responsável para se estabelecer um ritmo circanual que controlou a reprodução de trutas. A duração da luz do dia e a magnitude das mudanças no comprimento do dia foram de menor importância.

Segundo Arendt (1998), os fotoperíodos vividos por um indivíduo num passado recente, assim como a direção da mudança no comprimento do dia, influenciam suas respostas ao fotoperíodo, ou seja, a história fotoperiódica é que importa na interpretação dos sinais de melatonina.

Entretanto, Barrel et al. (2000) afirmaram que o fotoperíodo absoluto, mais que sua alteração propriamente dita, é que pareceu ser crítico na determinação de um ritmo circanual em ovelhas.

Portanto, de acordo com essas observações, fica claro que existe uma divergência quanto à resposta da função reprodutiva ao fotoperíodo. Fica claro também que muito provavelmente ela seja espécie-específica e a atividade reprodutiva nas diferentes espécies não deva ser diretamente regida pelo comprimento do dia, e sim, de acordo com a espécie, ela pode ser influenciada pela história fotoperiódica do animal, pela direção da mudança no comprimento do dia ou pelo estágio do ritmo circanual em que o sinal fotoperiódico foi recebido (Bronson e Heideman, 1994).

Sob condições ambientais constantes, o ritmo circanual pode persistir. Apesar do importante papel desempenhado pelos

fatores ambientais na determinação dos ciclos reprodutivos sazonais, existem evidências substanciais que os ciclos reprodutivos anuais possam ser gerados de forma endógena, sem nenhum sinal de mudança anual dos fatores ambientais (Turek e Van Cauter, 1994).

Diferentes espécies de mamíferos continuam a expressar ritmos circanuais mesmo após a retirada da glândula pineal; interrompem a resposta ao fotoperíodo e mantêm seus ritmos circanuais ocorrendo livremente, sem nenhum agente regulador aparente (Woodfill et al., 1991). Além disso, uma mesma espécie pode apresentar variações individuais na duração do ritmo circanual; e mesmo sob condições ambientais idênticas, os períodos correspondentes a um ciclo circanual pode variar de acordo com o indivíduo, de nove a 14 meses (Turek e Van Cauter, 1994).

De modo inverso, muitos ritmos sazonais não persistem sob condições ambientais constantes, indicando que são, ao menos em parte, de origem exógena (Turek e Van Cauter, 1994).

Parece haver então, diversos modos pelos quais fatores endógenos e exógenos estão envolvidos na geração de um ritmo anual (Turek e Van Cauter, 1994).

Por muito tempo assumiu-se que o ritmo anual da reprodução, dentre outros eventos sazonais, fosse diretamente dirigido pelas alterações sazonais dos fatores de proximidade, particularmente pelo comprimento do dia. Este conceito tem sido desafiado nos últimos anos. Recentemente, são muitas as evidências que, em muitas espécies de vida longa, a variação sazonal do comprimento do dia não dirige ativamente ou induza o desenvolvimento reprodutivo, mas atue efetivamente como um agente regulador para o estabelecimento de um

ritmo endógeno da função reprodutiva (Randall et al., 1998). Pode-se dizer então, que o ciclo reprodutivo anual deve ser dirigido por um ritmo circanual endógeno, que por sua vez é sincronizado com o meio ambiente pelo fotoperíodo (Bronson e Heideman, 1994).

Infelizmente, os estudos sobre a reprodução sazonal de grandes mamíferos estão restritos aos animais de produção, submetidos a uma intensa seleção durante todos estes anos de domesticação e que podem representar muito pouco dos rebanhos selvagens. Alguns deles, como os suínos, perderam quase completamente a capacidade de resposta ao fotoperíodo. Isto nos deixa muito pouca opção, exceto para especulações com bases em dados correlacionados (Bronson e Heideman, 1994).

### **Refratariedade**

A falha em responder a um dado fotoperíodo, como era previsto, tem sido denominado fotorrefratariedade. Em geral, o termo refratário é usado para descrever uma condição em que um animal não é mais sensível ou não responde mais a alguns estímulos que em outras circunstâncias iniciariam ou regularizariam uma resposta. Em animais de reprodução sazonal, este estímulo pode ser uma série de dias longos ou curtos, e a refratariedade pode se referir ao fenômeno da perda da fotossensibilidade do animal, seja ela ao efeito estimulante ou inibitório do fotoperíodo (Clay e Clay, 1992, Pickett, 1993, Gower et al., 1998).

Em alguns pássaros, o crescimento da gônada e a reprodução são estimulados pelo aumento no comprimento do dia, após o solstício de inverno. Entretanto, depois da estação reprodutiva, os órgãos reprodutivos diminuem rapidamente de tamanho, antes do solstício de verão, ou seja, ainda sob o estímulo de aumento do comprimento dos

dias. Neste caso, ocorre a refratariedade ao efeito estimulante do aumento no comprimento dos dias e a reprodução é então encerrada. Outro exemplo pode ser dado pelo que ocorre com alguns roedores que se tornam refratários ao efeito inibitório dos dias curtos e, mesmo mantidos sob um regime de pouca luz, exibem uma reativação espontânea do desenvolvimento gonadal, após um determinado período de supressão (Gower et al., 1998).

Porém, para algumas espécies, a expressão circannual rítmica só é possível sob uma limitada condição de exposição à luz, onde uma determinada fase é impedida de proceder à próxima pela refratariedade a um determinado fotoperíodo (Turek e Van Cauter, 1994). É necessário, para estes animais, experimentar um período de dias longos antes que os dias curtos surtam efeito, ou vice-versa; ou seja, existe a exigência da alternância de exposição a períodos de dias curtos e longos. Esta alternância é fundamental para que o organismo seja reposicionado ou volte a uma determinada condição para responder de forma ideal ao estímulo (Pickett, 1993, Arendt, 1998).

## **Trópicos**

Quatro- quintos de todos os mamíferos vivem nos trópicos e, mesmo assim, muito do que se sabe sobre reprodução de mamíferos têm sido aprendido em estudos realizados com as poucas espécies que habitam a zona temperada (Bronson e Heideman, 1994).

Existem duas razões principais a respeito do porquê é menos provável que em baixas latitudes os indivíduos usem o fotoperíodo como sinalizador para a reprodução sazonal. Primeiro, ao passo que as latitudes diminuem, as estações tornam-se menos marcadas, o clima menos previsível e os meses de inverno não necessariamente impróprios

para reprodução. Segundo, à medida que as latitudes diminuem, a extensão do dia muda e abaixo dos 10° as mudanças no comprimento do dia não são suficientes para agirem como um sinal para a reprodução (Jackson e Bernard, 1999).

Estudos sobre o controle da reprodução têm sido concentrado em espécies de reprodução sazonal que vivem em latitudes temperadas da Europa e dos Estados Unidos. Nessas localidades, a reprodução sazonal é geralmente controlada por um sinal de proximidade, como o fotoperíodo; ou também pelas chuvas, temperatura e/ou componentes vegetais secundários (Jackson e Bernard, 1999).

Embora existam muito menos variações na temperatura ambiente a baixas latitudes, as variações sazonais são freqüentemente marcadas pelas chuvas. As chuvas tendem a concentrar-se claramente em determinados períodos, na maioria das regiões tropicais, apresentando um ou dois picos ao ano. Nas duas situações, o resultado é a evidente sazonalidade quanto à disponibilidade de alimento, fazendo com que, mesmo próximo ao equador, a reprodução sazonal seja bastante comum (Bronson e Heideman, 1994).

Não existem variações no comprimento dos dias nas regiões ao longo do equador; portanto, não é possível usar o fotoperíodo como sinal sazonal. Por outro lado, existe apenas pouco mais de uma hora de variação anual a 10° e cerca de 2 ½ horas de variação a 20° de latitude (Bronson e Heideman, 1994).

A confiabilidade no fotoperíodo para regular a reprodução sazonal, muito provavelmente, desaparece nos animais que vivem abaixo dos 30° de latitude. Nestes casos, o oportunismo passa a ser a estratégia mais usada por estes animais para o estabelecimento de uma reprodução

sazonal (Bronson e Heideman, 1994). Entretanto, ainda assim, dentro de uma mesma população, foram encontradas alguns indivíduos que podem responder ao fotoperíodo e outros oportunistas (Bronson e Heideman, 1994, Jackson e Bernard, 1999).

Os mamíferos de vida longa que vivem nos trópicos também apresentam reprodução sazonal ou contínua, de acordo com o padrão anual das chuvas. Contudo, pouco se sabe sobre a resposta ao fotoperíodo entre os grandes mamíferos, pois poucos estudos foram feitos nesse sentido. Acredita-se que deva haver uma troca de sinal sazonal, do fotoperíodo para outro que indique as futuras mudanças ambientais. Até agora, a natureza deste sinal permanece desconhecida (Bronson e Heideman, 1994).

### **Oportunismo**

Uma estratégia oportunista dita que os machos permaneçam sexualmente prontos a qualquer período do ano, enquanto as fêmeas podem se reproduzir de forma sazonal ou contínua, dependendo somente das condições energéticas e nutricionais do momento, sem a influência do fotoperíodo. O oportunismo é sem dúvida menos comum em grandes animais, mas pode ser visto também em animais que vivem em zonas temperadas. Uma mesma espécie pode reproduzir-se de forma sazonal ou não, baseados apenas na temperatura e na disponibilidade de alimento (Bronson e Heideman, 1994).

Nas espécies oportunistas, a reprodução é essencialmente contínua, mas é inibida quando existe uma deficiência de energia. O oportunismo pode resultar em reprodução estritamente sazonal, se o inverno for sempre rigoroso, frio e com escassez de

alimento; entretanto, permitirá a atividade reprodutiva se o inverno for atípico, quente e úmido (Jackson e Bernard, 1999).

Portanto, a grande vantagem da reprodução oportunista é a capacidade de resposta rápida a qualquer alteração na disponibilidade de alimento, como ocorre com as primeiras chuvas e o aumento rápido na quantidade das pastagens (Jackson e Bernard, 1999).

### **A reprodução dos machos: energia**

Já é esperado que a reprodução sazonal nos mamíferos apresente diferenças entre os sexos, pois os custos energéticos dos esforços da reprodução masculina são primariamente comportamentais e, exceto em casos raros onde o macho exibe cuidado paterno, o investimento energético masculino na cria termina no momento da inseminação (Bronson e Heideman, 1994).

Em média, o macho chega a perder até 41% de seu peso corporal durante a estação reprodutiva. Porém, uma vez terminada a estação, os machos podem recuperar-se e então armazenar gordura para a próxima estação (Deutsch et al., 1990).

Existem três aspectos quanto à sazonalidade reprodutiva do macho em relação à fêmea: (1) em situações sazonais não tão severas, onde a fêmea poderia ocasionalmente ser capaz de se reproduzir durante um período do ano, com condições energética limitantes, o macho apresentaria pouco ou nenhum declínio no seu potencial reprodutivo; (2) mesmo em condições sazonais cruéis, quando energeticamente é impossível para a fêmea se reproduzir, pode-se observar que o macho entra na estação reprodutiva mais cedo e sai mais tarde que a fêmea (Lincoln, 1981); (3) e em casos extremos, em muitas populações de mamíferos, a regulação ambiental da reprodução difere

qualitativamente e quantitativamente entre os sexos (Heideman, 1989, Wood et al., 1991).

Para um macho mamífero, está bastante claro a existência de uma vantagem evolutiva em sempre estar apto à reprodução, ou estar muito próximo deste estado (Bronson e Heideman, 1994).

## **2.2. Características reprodutivas dos garanhões**

### **Regulação endócrina da função reprodutiva dos garanhões**

A função dos órgãos reprodutivos é controlada pelo sistema neuroendócrino. Este sistema inclui grupos especializados de células nervosas e tecidos endócrinos que secretam mensageiros químicos, os hormônios. Os hormônios são carregados pelo sangue, de um órgão para controlar a função de outro órgão (Amann, 1993).

O aumento do comprimento dos dias provoca uma diminuição da secreção diária de melatonina e, conseqüentemente, estimula o hipotálamo, que é um órgão pequeno situado à base do cérebro, a liberar o GnRH (Grosse et al., 1993). Pelas terminações nervosas do hipotálamo, o GnRH caminha por pequenos vasos até a glândula pituitária anterior (Irvine e Alexander, 1982), onde é liberado em pequenas e pulsáteis descargas rápidas. Ao atingir a glândula pituitária anterior, o GnRH estimula a liberação de LH e FSH por esta glândula (Amann, 1993).

Com base nos dados de outras espécies, Roser (2000) acredita que o GnRH liberado em altas amplitudes pode estimular a

secreção de FSH, enquanto que em frequências maiores estimule a secreção de LH.

O LH estimula a produção e a liberação da testosterona e do estrógeno pelas células de Leydig de garanhões adultos (Eisenhauer et al., 1994, Eisenhauer e Roser, 1995). Os altos níveis locais de testosterona permitem que este hormônio atue na espermatogênese. Pela circulação periférica, a testosterona age em vários órgãos alvos para manter as características físicas masculinas, a libido e a função das glândulas sexuais acessórias (Pickett et al., 1998).

O FSH, como demonstrado em outras espécies, provavelmente se liga às células de Sertoli para que estas secretem inibina, ativina, proteína ligadora de andrógeno (ABP), além de outros fatores necessários à espermatogênese (Pickett et al., 1998).

Embora a prolactina também seja liberada pela glândula pituitária anterior e deva desempenhar determinada função nos testículos de humanos, ainda não está claro se este hormônio exerce alguma função nos testículos de garanhões (Roser, 2000).

A testosterona, proteínas e hormônios protéicos produzidos nos testículos retroagem negativamente no hipotálamo e na pituitária anterior, via circulação periférica, para modular a secreção de GnRH, FSH e LH (Amann, 1993).

Em um estudo realizado por Muyan et al. (1993), os estrógenos, particularmente o  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), e não os andrógenos, modularam claramente a liberação de LH das células pituitárias do garanhão. O estradiol estimulou significativamente a liberação de LH induzido pelo GnRH das células pituitárias anteriores de eqüinos incubadas em cultura, enquanto a testosterona e a dihidrotestosterona

não tiveram nenhum efeito (Muyan et al., 1993). Nas culturas de células da pituitária anterior de eqüinos, o estrógeno modulou a liberação de FSH e LH induzida pelo GnRH (Baldwin et al., 1991, Muyan et al., 1993).

Apesar desses estudos, o local exato de ação do estrógeno ainda não foi identificado; portanto, ainda existe a possibilidade dele agir no hipotálamo, alterando a amplitude e frequência do GnRH e então modificando a relação de LH e FSH secretados pela pituitária anterior, como observado em ratos e primatas (Roser, 2000).

Para o controle do FSH no garanhão, acredita-se que tanto a testosterona como o estrógeno tenham efeito inibitório. Em um estudo realizado por Thompson et al. (1979), tratamentos com estradiol ou testosterona diminuíram os níveis de FSH em cavalos castrados. Porém, uma vez que a inibina inibe a secreção de FSH em outras espécies (Vale et al, 1994), talvez ela possa, junto com a testosterona e o estrógeno, controlar a secreção de FSH também em garanhões (Roser, 2000).

Pouco se sabe sobre a ativina nos garanhões, mas parece ser secretada pelas células de Sertoli, sob estímulo do FSH e atuar na pituitária anterior para a liberação do próprio FSH (Roser, 2000)

### **Função testicular e espermatogênese: fatores endócrinos-parácrinos-autócrinos**

Está bem definido na literatura que a testosterona é essencial para a manutenção e restauração da espermatogênese no testículo adulto (Sharpe, 1994).

Embora seja aceito que o FSH tenha importância crítica na iniciação e expansão da espermatogênese nos mamíferos durante a puberdade; sua função na espermatogênese em adultos não está bem clara (Sharpe, 1994).

De acordo com Zirkin et al. (1994), em quase todos os mamíferos, a testosterona sozinha é capaz de manter qualitativamente a espermatogênese completa, enquanto que o FSH influencia a quantidade de espermatozoides produzidos.

Entretanto, o aumento dos dados referentes à participação do estrógeno na reprodução masculina e seu potencial na modulação parácrina-autócrina da espermatogênese sugerem um evento muito mais complexo, principalmente em eqüinos, onde o estrógeno é produzido em quantidades atipicamente altas (Thompson et al., 1979, Raeside, 1979, Amann, 1993).

Devido aos altos níveis de estrógeno produzidos nos testículos de garanhões, supõe-se que o estrógeno, junto com a testosterona e o FSH, desempenhe um importante papel na espermatogênese desta espécie (Roser, 2000).

Nos mamíferos, os testículos evoluíram como um elaborado sistema de comunicação intercelular, para eficientemente coordenar os diferentes compartimentos (intersticial e intratubular) e seus componentes celulares, assegurando assim uma espermatogênese ordenada. Embora a regulação endócrina dos testículos seja importante para assegurar que o processo reprodutivo seja sincronizado com eventos fisiológicos, tais como puberdade, e contextualizado num processo ainda maior envolvendo meio ambiente, estação do ano e nutrição; é cada vez mais evidente que é um controle local parácrino-autócrino que modula a

intrincada rede de interações intercelulares nos testículos (Spiteri-Grech e Nieschlag, 1993, Roser, 2000).

Fatores parácrinos-autócrinos da função testicular foram introduzidos na literatura somente na década passada. Estes fatores têm sido caracterizados como moduladores locais da função celular, secretados por um tipo de célula para atuarem em outro tipo celular (parácrino) ou retornarem para agirem na própria célula que os secretaram (autócrino) (Roser, 2000).

Os mecanismos de controle parácrino-autócrino coordenam várias funções de diferentes tipos celulares no testículo ou modulam a ação das gonadotrofinas (FSH e LH) nos testículos, de acordo com as condições e exigências locais (Roser, 2001).

Esteróides, proteínas e peptídeos têm sido identificados como substâncias produzidas e secretadas por diferentes tipos de células testiculares (Roser, 2001). Muitos reguladores parácrinos-autócrinos em potencial da função testicular e da espermatogênese foram comprovados, como testosterona, inibina, ativina, fatores de crescimento, transferrina, entre outros; porém, os mecanismos pelos quais tais fatores agem no testículo do garanhão ainda não foram elucidados (Roser, 2000, Roser, 2001).

Poucas pesquisas foram feitas para identificar os fatores parácrinos-autócrinos do testículo do garanhão. Mas, já é reconhecido que o bom entendimento dos mecanismos de controle parácrino-autócrino da função testicular do garanhão, assim como o clássico mecanismo endócrino, é de fundamental importância para a compreensão do processo reprodutivo dos garanhões (Roser, 2001).

### **Alterações endócrinas e testiculares de garanhões associadas à estação do ano**

Durante os meses de primavera e verão, pode-se observar um aumento no tamanho e no peso testicular, na produção e liberação de espermatozóides, nas concentrações dos hormônios LH, FSH, testosterona,  $17\beta$ -estradiol, inibina e prolactina e uma visível melhora na libido de garanhões (Thompson et al., 1978, Clay e Clay, 1992, Roser et al., 1994).

Por esse motivo, o garanhão tem sido classificado como um reprodutor de dias longos; basicamente porque sua máxima capacidade reprodutiva é atingida durante períodos de aumento gradual no comprimento dos dias (Roser, 2000). Ao contrário das éguas que se tornam anovulatórias fora da estação reprodutiva, os garanhões não são azoospérmicos durante este mesmo período (Aurich et al., 1996).

Entretanto, esta classificação parece ser um tanto anacrônica, pois ignora quando os eventos neuroendócrinos que deram início à estação reprodutiva foram iniciados. Muito provavelmente, os eventos que levam à máxima capacidade reprodutiva do garanhão iniciaram-se ainda no inverno (Clay e Clay, 1992).

Por analogia a outros mamíferos, é provável que as alterações anuais na capacidade reprodutiva do garanhão sejam resultado da presença de um ciclo circanual endógeno da função testicular, que é iniciado por um fator externo, um marcador do tempo ou ritmo ambiental. O fator externo mais comum utilizado como marcador sazonal é o fotoperíodo, principalmente por ser fidedigno ao representar as mudanças ao longo do ano (Clay e Clay, 1992, Roser, 2000).

No caso dos eqüinos, um conceito claro sobre refratariedade é fundamental para o bom entendimento sobre seu ciclo circanual ou sazonal. Em garanhões, é aceito que os dias longos agem desencadeando e iniciando os mecanismos que levam ao mais alto grau da capacidade reprodutiva. Entretanto, independente da presença ou não do fotoperíodo como fator estimulante, estes mecanismos irão cessar e o animal reiniciará espontaneamente uma pausa na atividade reprodutiva. Sem que ele seja exposto a dias curtos, não haverá novamente a estimulação dos mecanismos pelos dias longos. (Pickett et al., 1998)

Esta condição de refratariedade exige uma alternância de exposição a dias curtos e longos. Portanto, os dias curtos funcionam como o reposicionamento de uma condição à espera de um estímulo, enquanto os dias longos funcionam como o fator que irá estimular e desencadear os mecanismos (Pickett et al., 1998).

Este conceito é um pouco mais complexo, pois os ritmos circanuais são ajustados internamente. Ele pode ser visto na ausência completa de variações no comprimento do dia, mas são estas variações que atuam como agentes sincronizadores do ciclo sob condições normais. Então, pode-se dizer que o garanhão possui um ritmo anual da sua capacidade reprodutiva inerente a ele, que se dá a uma periodicidade de aproximadamente 12 meses. São exatamente as variações no comprimento dos dias que sincronizam ou encaixam este ritmo interno com a periodicidade de um ano (Pickett et al., 1998).

Fatores ambientais regulam a função testicular por meio do eixo hipotálamo-pituitária-gônada (Young e Nelson, 2001). Contudo, os eventos endócrinos envolvidos no início do restabelecimento da máxima capacidade testicular em garanhões não estão adequadamente caracterizados. Tal restabelecimento parece iniciar com uma diminuição

fotoinduzida da melatonina, que por sua vez permite um aumento do GnRH e um subsequente aumento na liberação das gonadotrofinas (LH e FSH) pela pituitária anterior para a circulação periférica (Bronson e Heidemen, 1994, Roser, 2000).

É bem aceito que a secreção das gonadotrofinas, LH e FSH, em machos, depende da liberação do GnRH pelo hipotálamo (Tillbrook e Clark, 2001). Em garanhões, existe uma concordância entre os pulsos de GnRH e LH; e a influência do fotoperíodo nas secreções de GnRH é claramente refletida pelas variações circanuais na liberação do LH. Concordância semelhante entre o GnRH e o FSH não é observada (Clay e Clay, 1992).

Em garanhões, a liberação de LH é positivamente correlacionada com o comprimento do dia. As concentrações de LH aumentam com o início da estação reprodutiva; e as concentrações basais de LH no verão são duas vezes mais altas que aquelas observadas próximo ao solstício de inverno (Irvine e Alexander, 1982, Johnson e Thompson, 1983).

O aumento nas concentrações periféricas de LH associado com o aumento sazonal da capacidade sexual do garanhão se dá pelo aumento da quantidade de LH liberado, e menos provavelmente pelo aumento da frequência de descargas de LH. Isto significa que o restabelecimento sazonal da função reprodutiva máxima dos garanhões pode ser, ao menos em parte, devido a um aumento na síntese de LH pela pituitária, como ocorre nas éguas (Clay e Clay, 1992).

As variações na liberação de LH nos eqüinos dependem da presença das gônadas, indicando que os efeitos do fotoperíodo são dependentes dos esteróides (Thompson et al., 1986). As concentrações

séricas de testosterona e estrógeno também apresentam flutuações sazonais, com as máximas concentrações ocorrendo em abril e maio (relativos a outubro e novembro do Hemisfério Sul) (Thompson et al., 1978). As variações do LH sérico, descritas como altamente sazonais, apresentam picos em maio e junho (relativos a novembro e dezembro no Hemisfério Sul) (Johnson e Thompson, 1983, Clay e Clay, 1992).

Byers et al. (1983) também relataram um aumento sazonal dos níveis de testosterona, com os maiores níveis observados no verão; porém, com um aumento secundário no outono, menor que o do verão.

As concentrações de FSH apresentam flutuações semelhantes, porém com a variação da magnitude muito menos pronunciada de estação para estação do que o LH (Johnson e Thompson, 1983, Clay e Clay, 1992).

Os dados sobre variações sazonais da liberação do FSH são conflitantes. Thompson et al. (1986) demonstraram que as concentrações de FHS no plasma de garanhões foram quase constantes durante todo o ano, exceto por apresentarem pequeno aumento durante a estação reprodutiva.

Um ciclo anual na função testicular dos garanhões foi relatado pelas variações sazonais das características seminais por diferentes autores.

A estação do ano mostrou uma evidente influência nas características seminais de garanhões, incluindo volume do ejaculado, motilidade espermática, total de espermatozóides e porcentagem de espermatozóides anormais. Van der Holst (1975) estudou a influência da estação do ano e a aplicação de luz contínua na baía em garanhões, na

Holanda. Seus resultados mostraram que a estação teve bastante influência nas características seminais dos garanhões; e a manutenção de garanhões sob luz contínua durante o inverno pareceu ter um benefício sobre a espermatogênese, evidenciado pelo aumento da motilidade e queda do número de espermatozóides anormais presentes no ejaculado, comparado com o mesmo período do ano anterior.

Byers et al. (1983) observaram que o volume seminal foi maior no verão, e a concentração espermática e o número de espermatozóides por ejaculado foram mais altos durante o outono. Magistrini et al. (1987) relataram que durante o inverno, ao contrário da primavera e verão, houve uma diminuição do volume seminal, aumento da concentração espermática e baixa motilidade. Entretanto, segundo Pickett et al. (1998), a motilidade progressiva não sofreu qualquer variação por efeito da estação do ano.

Segundo Clay e Clay (1992), a largura total máxima da bolsa escrotal e o maior número de espermatozóides ejaculados observados nos meses de primavera e verão começaram a declinar antes do solstício de verão, ou antes do início da diminuição no comprimento do dia. Neste caso, é provável que um estado fotorrefratário também estivesse agindo para uma regressão normal do tamanho testicular e da produção de espermatozóides.

Se isto estiver correto, a função fisiológica normal dos dias curtos durante o outono não serve para finalizar a estação reprodutiva, mas sim abolir um estado fotorrefratário e restabelecer um mecanismo pelo qual o garanhão irá ser sensível novamente ao aumento do comprimento dos dias (Clay e Clay, 1992).

Da mesma forma, o restabelecimento sazonal da função testicular máxima não foi iniciado pelos dias longos, ou seja, o início do restabelecimento da função testicular levando ao pico da capacidade reprodutiva no final da primavera e início do verão ocorreu de forma evidente durante o outono, quando os dias ainda estavam diminuindo. Portanto, o nível mais baixo de produção espermática parece ocorrer nos meses de setembro e outubro (referentes a março e abril no Hemisfério Sul), que aumentam gradualmente até maio e junho (referentes a novembro e dezembro no Hemisfério Sul) (Clay e Clay, 1992).

Segundo Pickett (1993), o número de espermatozoides ejaculados chega a ser 50% maior nos meses da estação reprodutiva para o primeiro ejaculado e 39% para o segundo, com uma hora de intervalo entre as colheitas de sêmen. Este padrão de produção espermática está em concordância com as observações feitas sobre a espermatogênese (Berndtson et al., 1983). Entretanto, não está ainda precisamente estabelecido como os elementos testiculares do gananhão são reversivelmente estimulados ou inibidos pela estação do ano (Clay e Clay, 1992). Alterações no número absoluto de células de Sertoli por testículo (Johnson e Thompson, 1983), no número de células germinativas por células de Sertoli (Johnson e Neaves, 1981) e a taxa de degeneração das células germinativas (Johnson, 1985) são fatores que têm sido considerados como responsáveis pela variação sazonal da função testicular em gananhões.

O aumento sazonal da produção espermática deve ser atribuído, pelo menos em parte, ao um aumento da massa do parênquima testicular e ao aumento da eficiência da produção espermática por grama de parênquima testicular (Clay e Clay, 1992).

De acordo com Johnson (1985), um aumento sazonal da espermatogônia do tipo A por testículo observado durante a estação reprodutiva poderia ser responsável pela maior produção espermática nesta estação. Mais tarde, Johnson (1991) demonstrou que há um aumento do número de espermatogônias  $A_1$  e uma melhora na eficiência das divisões das espermatogônias durante a estação reprodutiva.

Como ocorre para o tamanho testicular e para a produção espermática, um ciclo sazonal na manifestação da libido também pode ser observado em garanhões. Um ritmo espontâneo no comportamento sexual parece estar mais relacionado com os dias curtos (inibição) e com os dias longos (estímulo) do que os ritmos observados no tamanho testicular e na produção espermática. Entretanto, este restabelecimento da libido em relação ao tamanho testicular e a produção espermática é considerado atrasado, por estar realmente ligado à estação do ano em que se manifesta. Isto mostra que não deve haver correlação entre a libido e o tamanho testicular ou a produção espermática, e que deve existir uma regulação endócrina do comportamento sexual (Thompson et al., 1980).

Todas estas variações sazonais na capacidade reprodutiva do garanhão levou à idéia de que a manipulação da taxa luz:escuridão pudesse melhorar a capacidade reprodutiva do garanhão, ou mesmo ajustar o seu ciclo anual à demanda do mercado imposto pelos homens (Clay e Clay, 1992, Pickett, 1993).

Pôde-se notar que a aplicação de um fotoperíodo longo (16 horas de luz:8 horas de escuridão) em dezembro (Hemisfério Norte), foi efetiva para um adiantamento do restabelecimento máximo da capacidade reprodutiva do garanhão, mas não foi efetiva para prolongar indefinidamente esta capacidade (Clay e Clay, 1992).

Garanhões submetidos a fotoperíodos contínuos também apresentam um ciclo anual da capacidade testicular. Nos animais submetidos a períodos contínuos de dias curtos, houve um restabelecimento da maior capacidade testicular, a despeito da falta de estímulo dos dias longos; enquanto que, os animais sob contínuos dias longos, não apresentaram um prolongamento da fase de maior capacidade reprodutiva, e a regressão desta capacidade ainda assim aconteceu (Clay et al., 1987, Clay e Clay, 1992).

Baseando-se nesses dados, é plausível que o fotoperíodo sirva simplesmente para sincronizar ou iniciar um ciclo circanual endógeno; pois, na ausência de um fotoperíodo, o ciclo endógeno ainda persiste. Porém, sem uma sincronização com o meio externo, o ciclo endógeno ficaria livre para se manifestar e o intervalo anual da máxima capacidade reprodutiva variaria de garanhão para garanhão (Clay e Clay, 1992).

Mais recentemente, em 1998, Pickett e Voss levantaram uma preocupação quanto ao crescente número de garanhões que são transportados de um hemisfério a outro, para realizarem duas estações de cobertura ao ano. Nestes casos, o principal problema seria uma possível exposição insuficiente aos dias curtos, essencial para tirar os garanhões de um estado de refratariedade e ressensibilizá-los aos dias longos. Sem um ciclo anual da capacidade reprodutiva sincronizado com o ambiente externo, o difícil é saber em que fase do ciclo endógeno estes animais estão. Acredita-se que garanhões férteis não apresentam problemas quanto às constantes viagens de um hemisfério a outro, o mesmo não pode se dizer sobre os subférteis. Porém, o fato é: até quando um animal de natureza reprodutiva sazonal irá suportar mais uma imposição feita pela homem ?

### 3. Material e método

#### 3.1. Animais, local, grupos e etapas do experimento

Foram utilizados oito garanhões, clinicamente sadios, com características reprodutivas normais, entre 3½ e 15 anos de idade, de diferentes raças (Mangalarga, Quarto de Milha, PSA, Brasileiro de Hipismo e Sela Francesa), nascidos e criados no Estado de São Paulo.

O experimento foi desenvolvido no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP - Campus de Botucatu, Rubião Júnior e Fazenda Lageado (Posto de Monta), ambos com localização na latitude 22°52'S, longitude 48°26'W e altitude 756m.

Os animais foram semi-estabulados, por aproximadamente um ano, alimentados com feno de Coast-cross (*Cynodon dactylon*) e ração comercial (proteína 11%), duas vezes ao dia.

Quanto à luz recebida, os animais foram divididos em:

- Rubião Júnior: luz natural (n=4);
- Lageado: 24 horas de luz - luz natural durante o dia e luz artificial de 250W durante a noite, nas baias (n=4);

As colheitas de dados foram realizadas nos períodos de transição primavera-verão (novembro/dezembro 1999/janeiro 2000 e novembro/dezembro 2000/janeiro 2001) e nos períodos de transição outono-inverno (maio/junho/julho 2000 e maio/junho/julho 2001). Foram necessárias dois períodos de transição de cada estação para completar o número de animais usados neste estudo. Cada período de transição estacional consistiu em 12 semanas exatas, com 6 semanas antes e 6 semanas depois do solstício de cada estação.

### 3.2. Exame andrológico

#### Exame clínico

Foram avaliados os seguintes aspectos:

- Cordão espermático: inspeção e palpação.
- Bolsa escrotal: inspeção
- Testículos: simetria, forma, consistência, posição, mobilidade, sensibilidade e volume testicular \*.
- Epidídimos: palpação da cabeça, corpo e cauda.
- Prepúcio.
- Pênis

Estes exames foram feitos antes do experimento ser iniciado, e repetidos no início e no fim de cada período de colheitas de dados. As avaliações testiculares também eram realizadas depois das punções de citologia aspirativa por agulha fina (Caaf) testicular.

\* O volume testicular (VT) e o volume testicular combinado (VTC) foram obtidos somente ao final de cada período de colheita de dados, imediatamente antes das Caafs testiculares. Com o auxílio de um paquímetro, efetuou-se a aferição das medidas testiculares e, posteriormente, aplicou-se as seguintes fórmulas apresentadas por Blanchard e Varner (1996):

$VT = 4/3\pi \times (C/2) \times (L/2) \times (H/2)$ ; C - comprimento, L - largura e H - altura.

VTC = volume do testículo direito + volume do testículo esquerdo

## Exame do sêmen

Antes de cada período de colheita de dados, todos os animais tiveram o sêmen colhido por dez dias consecutivos, para se estabelecer um padrão individual da qualidade seminal. Durante os períodos de colheitas de dados, foram feitas duas colheitas semanais de sêmen, de cada garanhão, em vagina artificial “Modelo Botucatu”, com auxílio de égua em cio.

Imediatamente após as colheitas, os ejaculados foram avaliados por exames macro e microscópicos dos seguintes parâmetros e os dados anotados em fichas individuais apropriadas.

- *Volume*: o volume foi medido em provetas graduadas.
- *Cor e aspecto*: a cor e o aspecto do sêmen foram examinados macroscopicamente.
- *Motilidade total e motilidade progressiva dos espermatozóides*: para cada amostra, de cada ejaculado, foi utilizada uma lâmina histológica (26 x 76 x 1,2 mm), aquecida à 38-40°C, onde era depositada uma gota de sêmen recoberta com uma lamínula (24 x 32 mm) e o material avaliado por microscopia de contraste de fase (x160). O movimento total e progressivo dos espermatozóides foram avaliados de forma subjetiva (Krause, 1966), onde os resultados, dados em porcentagem, diferenciavam a quantidade de espermatozóides móveis e dos imóveis; e os espermatozóides com motilidade progressiva e com movimento circular aberto daqueles com outro tipo de movimento.

- *Vigor*: O vigor do movimento dos espermatozóides foi avaliado seguindo uma escala padronizada de zero a cinco, onde zero representa espermatozóides com vigor nulo e cinco, vigor máximo.
- *Concentração espermática*: a concentração espermática foi avaliada em câmara de NEUBAUER e o número de espermatozóides foi registrado em  $\text{mm}^3$  (Krause, 1966), após diluição de 0,1 ml de sêmen em 1,9 ml de água destilada.
- *Número total de espermatozóides*: o número total de espermatozóides por ejaculado foi calculado pela multiplicação do resultado do volume de cada ejaculado, em ml, pelo número de células espermáticas por  $\text{mm}^3$ .
- *Morfologia espermática*: para cada ejaculado, foi confeccionado um esfregaço em lâmina histológica, corado pelo método de Karras (1950) e modificado por Papa et al. (1988). Foram contadas 200 células espermáticas em cada esfregaço, e as alterações morfológicas, classificadas segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Fonseca et al., 1992).
- *Osmolaridade e pH*: o valor da osmolaridade de cada ejaculado foi obtido pelo uso do aparelho Osmette A (Automatic Osmometer) da Precision Systems, INC®; enquanto que o valor do pH foi obtido por meio do pH-metro B374 da Micronal®.

## **Libido**

A libido dos garanhões foi estimada de forma subjetiva pelo número de montas antes da colheita do sêmen, desinteresse e desistência em efetuar a monta.

### **3.3. Colheitas de sangue para determinação de FSH, LH e testosterona séricos**

No mesmo período de colheitas de sêmen, foram colhidas amostras de sangue todas as 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> - feiras, entre 9:00 e 11:00 horas, para a dosagem das concentrações séricas de FSH, LH e testosterona.

O sangue era colhido diretamente da veia jugular em tubos apropriados sem anti-coagulante. Em temperatura ambiente, as amostras eram mantidas por aproximadamente 30 minutos, para a coagulação e separação do soro. Depois desta etapa, as amostras eram ainda centrifugadas por 15 a 20 minutos, para completar a separação do soro.

Com o auxílio de uma pipeta, cada amostra de soro era transferida para um tubo de plástico, com tampa, devidamente identificado. Imediatamente, os tubos de plástico eram armazenados e congelados a 20° C negativos até o momento da avaliação das amostras.

As amostras foram devidamente transportados para o Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Ciências Animais da Universidade da Califórnia, Davis, EUA, para serem avaliadas pelo método de radioimunensaio.

Antes de se iniciar as quantificações hormonais, as três amostras de soro de cada semana foram transferidas para um único frasco. Com este procedimento, as amostras foram agrupadas por semana de estudo.

Os hormônios protéicos FSH e LH foram quantificados por uma versão modificada da técnica de radioimunoensaio de duplo anticorpo heterólogo descrita por Matteri et al. (1986). As quantificações de testosterona foram realizadas segundo método descrito por Roser e Hughes (1991).

- *Radioimunoensaio para FSH:* Como primeiro anticorpo foi utilizado o anticorpo de coelho anti-FSH ovino (Papkoff H47). O FSH equino (Papkoff, e265B) foi usado para a curva padrão e para a iodação. As concentrações dos padrões variaram entre 0,25 a 64 ng/ml. Alíquotas de 100µl de soro, ou das diluições da curva padrão ou dos controles foram incubadas com 100µl de solução tampão para radioimunoensaio (0,5 M PO<sub>4</sub>, pH 7,5; 0,15 M NaCl, 0,5% BSA, 0,002 EDTA; 0,01% timerosol) e 150µl do primeiro anticorpo no Dia 1. No Dia 2, adicionou-se 50µl do hormônio marcado (20.000 cpm), permanecendo assim incubados por três dias a 4°C. No Dia 5, adicionou-se 100µl de soro normal de coelho (1%) e 1ml da diluição de 1:300 do anticorpo de cabra antigamaglobulina de coelho (GαR, Antibodies, Inc. 51-156), utilizado como segundo anticorpo, em polietilenoglicol (5%). Os tubos foram incubados por 4 horas em temperatura ambiente, centrifugados por 20 minutos a 2500 rpm e os *pellets* foram transferidos para um contador gamma (Model 10/200; Micromedic System Inc., Horsham, Pennsylvania). A sensibilidade dos ensaios foi de 0,25 ng/ml e os coeficientes de variação intra e interensaio foram 3,3 e 7,5%, respectivamente.
- *Radioimunoensaio para LH:* Como primeiro anticorpo do ensaio foi utilizado o anticorpo de camundongo monoclonal anti-LH bovino (518B7). Para a curva padrão e para a iodação foi usado LH equino altamente purificado (Papkoff, e263B). As concentrações dos padrões variaram entre 0,125 a 32 ng/ml. No Dia 1, alíquotas de 100µl de soro,

ou das diluições da curva padrão ou dos controles foram incubadas com 100µl de solução tampão para radioimunoensaio (0,5 M PO<sub>4</sub>, pH 7,5; 0,15 M NaCl, 0,5% BSA, 0,002 EDTA; 0,01% timerosol), com 150µl do primeiro anticorpo mais 50µl do hormônio marcado (20.000 cpm) à temperatura ambiente por 24 horas. No Dia 2, adicionou-se 100µl de soro normal de camundongo (1,5%) e 1ml da diluição de 1:300 do anticorpo de cabra antigamaglobulina de camundongo (GαM, Antibodies, Inc.51-146), utilizado como segundo anticorpo, em polietilenoglicol (5%). Os tubos foram incubados por uma hora em temperatura ambiente, centrifugados por 20 minutos a 2500 rpm e os *pellets* foram transferidos para um contador gamma (Model 10/200; Micromedic System Inc., Horsham, Pennsylvania). A sensibilidade dos ensaios foi 0,125 ng/ml e os coeficientes de variação intra e interensaio foram 5,0 e 11,8%, respectivamente.

- *Radioimunoensaio para testosterona:* O anticorpo primário foi o anticorpo de ovelha antitestosterona (Niswender, S-250). No Dia 1, alíquotas de 50µl de soro ou dos controles foram utilizadas para extração da testosterona em 1 ml de éter etílico. Os tubos foram cobertos, agitados por três minutos e incubados por mais cinco para permitir a separação das camadas orgânicas e aquosas. As bases dos tubos foram imersas em nitrogênio líquido até serem congeladas. A camada de éter foi então separada e o éter evaporado com auxílio de tubos de ar. Alíquotas de 50µl das diluições da curva padrão foram pipetadas em concentrações que variaram entre 0,05 e 4 ng/ml. O extrato seco foi ressuspenso em 300µl de PBS/G (0,5 M PO<sub>4</sub>, pH 7,0; 0,15 M NaCl, 1% gelatina; 0,02% timerosol). Adicionou-se 100µl (8.000 cpm) do marcador H<sup>3</sup>-testosterona (New England Nuclear, NET-370) em cada tubo mais 100µl do anticorpo e incubou-se os tubos a 4°C por 24 horas. No Dia 2, os hormônios ligados foram separados dos livres usando-se 300µl de uma solução de

carvão/dextran (pH 7,0); incubados por mais 20 minutos a 4°C, centrifugados por 10 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante transferido para tubos plásticos de cintilação contendo 4,5 ml do *cocktail* RPI BioSafe. As contagens foram feitas num contador de cintilação beta (Packard Tri-Carb 460). A eficiência da extração variou de 70 a 78%. A sensibilidade dos ensaios foi de 0,1 ng/ml e os coeficientes de variação intra e interensaio foram 5,1 e 10,5%, respectivamente.

### **3.4. Citologia aspirativa por agulha fina (Caaf) em testículos**

Ao final de cada período de colheita de dados, foram realizados os exames de Caaf testicular em ambos os testículos de todos os animais, de acordo com a técnica descrita por Leme e Papa (2000).

Os animais foram tranqüilizados com acepromazina (Acepran® 1%, 0,1 mg/kg) associada com romifidina (Sedivet®, 0.08 mg/kg) e colocados em tronco de contenção. Em seguida, realizou-se a anti-sepsia da região dos testículos, com álcool iodado. Fixou-se o testículo com uma das mãos e introduziu-se uma agulha 30x7mm, acoplada a uma seringa de 10 ml, na porção medial do parênquima testicular. Com a agulha dentro do testículo, tracionou-se o êmbolo para permitir a formação de vácuo dentro de seringa e uma amostra do parênquima foi trazido para dentro da agulha. Aliviou-se o êmbolo e retirou-se a agulha do testículo. Em seguida, fez-se uma pressão digital, no local da punção, para conter possíveis hemorragias. Nos casos em que o material obtido não foi suficiente ou se houve grande contaminação da amostra com sangue, o procedimento foi repetido, no mesmo momento, apenas alterando-se o local da punção para uma região mais cranial ou caudal. O material obtido pela punção foi expelido em lâminas de vidro, utilizando-se a pressão da seringa. Com o auxílio de outra

lâmina, foram confeccionados esfregaços, que após serem secos ao ar ambiente, foram corados pelo método de Giemsa. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz sob aumento de 400x para identificação e quantificação das células da espermatogênese e das células de Sertoli. Foram contadas 200 células consecutivas da série espermatogênica, e as células de Sertoli, encontradas entre as células germinativas foram anotadas separadamente. Os resultados foram transformados em porcentagens.

Além da quantificação das células germinativas e das células de Sertoli, foram avaliados os diâmetros dos núcleos dos diferentes tipos celulares. Em cada esfregaço, nove a dez células dos tipos mais freqüentemente observados (espermatócitos primários, espermatídes iniciais e finais, espermatozóides e células de Sertoli) foram selecionadas aleatoriamente. Para os tipos celulares menos freqüentes (espermatogônia e espermatócito secundário) todas as células encontradas foram selecionadas, sempre menos que dez. Os esfregaços foram analisados em microscopia de luz sob aumento de 1.250x (Fotomicroscópio Zeiss Axiophoto HBO 100 W/2) e as imagens selecionadas foram transferidas para o sistema de processamento de imagens via uma câmera JVC. O diâmetro nuclear máximo ( $\mu\text{m}$ ) dos diferentes tipos celulares foram mensurados com auxílio do programa Zeiss KS300 (Kontron Eletronic).

Tanto para a quantificação como para o diâmetro nuclear, os dados de cada animal foram anotados separadamente para o testículo direito e para o esquerdo para posterior análise estatística.

### 3.5. Metodologia estatística

Inicialmente, os dados foram explorados através de cálculos de medidas descritivas e pelas construções de tabelas e gráficos.

A média foi utilizada como medida de tendência central e o erro padrão da média (EPM) como medida de variabilidade para todas as variáveis analisadas. O programa Proc Mixed do SAS (1998) foi utilizado para toda a análise estatística. Os testes de significância foram realizados através do teste F (aproximação). Foram consideradas significantes as diferenças com  $P \leq 0,05$ . Os dados originais da quantificação das células testiculares foram transformados em arco seno, quando necessário, antes da análise dos dados.

Para cada uma das variáveis do sêmen e para as concentrações séricas dos hormônios FSH, LH e testosterona, ajustou-se um modelo linear misto no qual os efeitos de luz (ou local), estação e a interação entre estes foram considerados fixos e os efeitos de animal foram considerados aleatórios. Para os dados de citologia (quantificação e diâmetro nuclear), adicionou-se os efeitos dos testículos (direito e esquerdo). Desta forma incorporou-se a correlação entre as medidas realizadas no mesmo animal.

## 4. Resultado

### 4.1. Exame andrológico

#### Exame clínico

Todos os animais apresentaram características normais das estruturas avaliadas nos exames clínicos, antes e durante o estudo.

#### Volume Testicular Combinado (VTC)

Houve diferença significativa ( $P=0,008$ ) do VTC entre os garanhões de Rubião Júnior ( $254,61 \pm 16,80$ ) e os garanhões do Lageado ( $112,27 \pm 16,80$ ) (Figura 1).

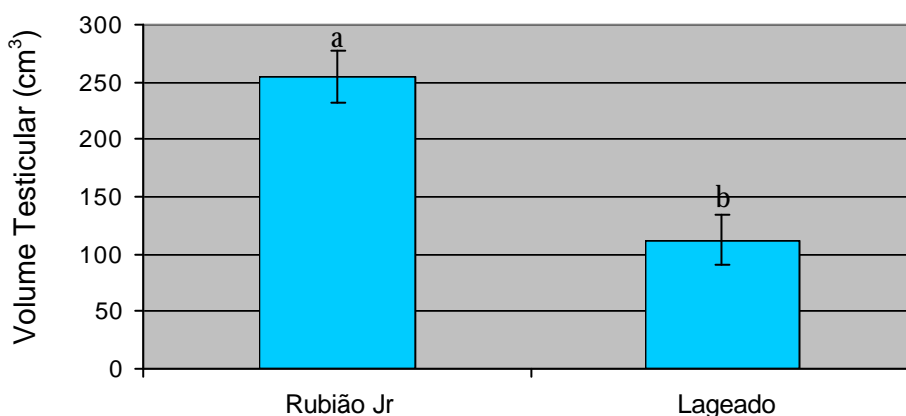


Figura 1 - Médias  $\pm$  EPM do volume testicular combinado ( $\text{cm}^3$ ) dos garanhões de Rubião Júnior ( $n=4$ ) e do Lageado ( $n=4$ ). (a,b :  $P=0,008$ ).

Não houve diferença significativa ( $p=0,20$ ) do VTC dos garanhões entre as transições primavera-verão ( $191,03 \pm 16,80$ ) e outono-inverno ( $175,83 \pm 16,80$ ) (Figura 2).

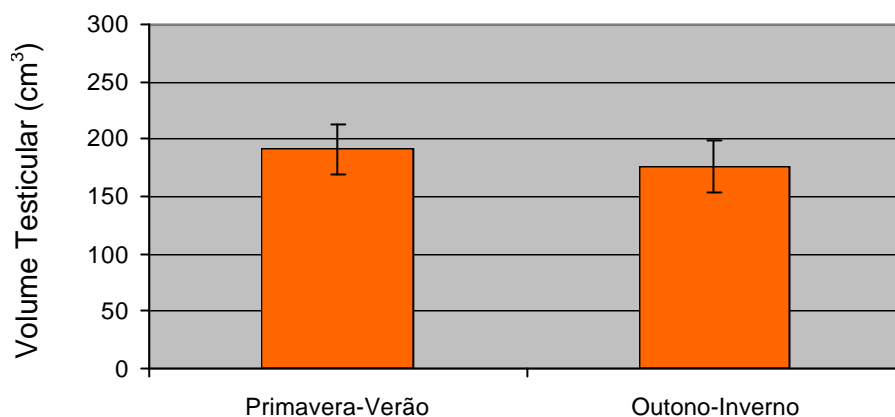


Figura 2 - Médias  $\pm$  EPM do volume testicular combinado (cm<sup>3</sup>) de garanhões (n=8); observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Não houve diferenças significativas entre os períodos de transição primavera-verão e outono-inverno nos dois grupos observados (luz natural:  $263,47 \pm 19,38$  vs  $245,73 \pm 19,38$ ;  $P=0,22$  e luz artificial:  $118,59 \pm 19,38$  vs  $105,93 \pm 19,38$ ;  $P=0,18$ ) (Figura 3).

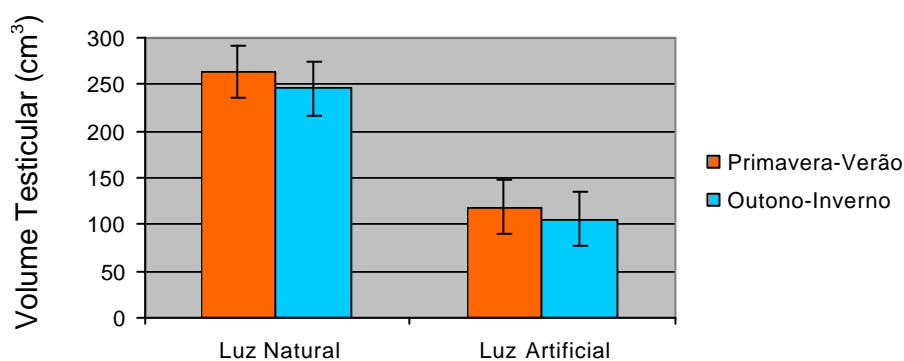


Figura 3 - Médias  $\pm$  EPM do volume testicular combinado (cm<sup>3</sup>) de garanhões sob luz natural (n=4) e com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

## Exame do sêmen

As características seminais dos animais utilizados neste estudo estão apresentadas nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1 - Médias  $\pm$  EPM das características do sêmen dos garanhões de Rubião Júnior (n=4) e do Lageado (n=4), sem a influência da estação do ano.

Características do sêmen	Grupos	
	Rubião Júnior	Lageado
Volume (mL)	50,58 $\pm$ 4,69 <sup>a</sup>	34,77 $\pm$ 4,69 <sup>b</sup>
Motilidade (%)	75,94 $\pm$ 4,01 <sup>a</sup>	53,90 $\pm$ 4,01 <sup>b</sup>
Motilidade Progressiva (%)	42,43 $\pm$ 4,32 <sup>a</sup>	26,37 $\pm$ 4,32 <sup>b</sup>
Vigor (0 - 5)	3,65 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	3,10 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>
Concentração ( $\times 10^6$ /mm <sup>3</sup> )	160,16 $\pm$ 21,18 <sup>a</sup>	85,69 $\pm$ 21,18 <sup>b</sup>
Total de espermatozoides ( $\times 10^6$ )	7.299,20 $\pm$ 651,70 <sup>a</sup>	2.593,57 $\pm$ 651,70 <sup>b</sup>
Defeitos Menores (%)	7,36 $\pm$ 1,69 <sup>a</sup>	12,84 $\pm$ 1,69 <sup>b</sup>
Defeitos Maiores (%)	18,61 $\pm$ 3,78 <sup>a</sup>	37,02 $\pm$ 3,78 <sup>b</sup>
pH	7,38 $\pm$ 0,03	7,40 $\pm$ 0,05
Osmolaridade	280,04 $\pm$ 3,67	282,03 $\pm$ 3,67

<sup>a,b</sup> Letras diferentes representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 2 - Médias  $\pm$  EPM das características do sêmen de garanhões (n=8), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Características do sêmen	Estação do Ano	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
Volume (mL)	45,64 $\pm$ 4,69	39,71 $\pm$ 4,69
Motilidade (%)	66,02 $\pm$ 4,01	63,82 $\pm$ 4,01
Motilidade Progressiva (%)	35,19 $\pm$ 4,32	33,61 $\pm$ 4,32
Vigor (0 - 5)	3,48 $\pm$ 0,11	3,28 $\pm$ 0,11
Concentração ( $\times 10^6$ /mm <sup>3</sup> )	123,67 $\pm$ 21,18	122,17 $\pm$ 21,18
Total de espermatozoides ( $\times 10^6$ )	5.169,11 $\pm$ 651,70	4.723,66 $\pm$ 651,70
Defeitos Menores (%)	9,17 $\pm$ 1,69	11,09 $\pm$ 1,69
Defeitos Maiores (%)	26,93 $\pm$ 3,78	28,71 $\pm$ 3,78
pH	7,35 $\pm$ 0,03	7,42 $\pm$ 0,03
Osmolaridade	278,65 $\pm$ 3,67	283,40 $\pm$ 3,67

Tabela 3 - Médias  $\pm$  EPM das características do sêmen de garanhões sob luz natural (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Características do sêmen	Luz Natural	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
Volume (mL)	48,05 $\pm$ 6,63	53,11 $\pm$ 6,63
Motilidade (%)	74,95 $\pm$ 5,70	76,93 $\pm$ 5,70
Motilidade Progressiva (%)	41,95 $\pm$ 6,12	42,93 $\pm$ 6,12
Vigor (0 - 5)	3,71 $\pm$ 0,16	3,59 $\pm$ 0,16
Concentração ( $\times 10^6$ /mm <sup>3</sup> )	151,45 $\pm$ 29,96	168,87 $\pm$ 29,96
Total de espermatozoides ( $\times 10^6$ )	6.772,06 $\pm$ 921,64	7.826,33 $\pm$ 921,64
Defeitos Menores (%)	6,63 $\pm$ 2,36	8,10 $\pm$ 2,36
Defeitos Maiores (%)	17,11 $\pm$ 5,35	20,12 $\pm$ 5,35
pH	7,37 $\pm$ 0,05	7,39 $\pm$ 0,05
Osmolaridade	281,39 $\pm$ 5,18	278,69 $\pm$ 5,18

Tabela 4 - Médias  $\pm$  EPM das características do sêmen de garanhões com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Características do sêmen	Luz Artificial	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
Volume (mL)	43,24 $\pm$ 6,63	26,31 $\pm$ 6,63
Motilidade (%)	57,08 $\pm$ 5,70	50,71 $\pm$ 5,70
Motilidade Progressiva (%)	28,44 $\pm$ 6,12	24,31 $\pm$ 6,12
Vigor (0 - 5)	3,24 $\pm$ 0,16	2,97 $\pm$ 0,16
Concentração ( $\times 10^6$ /mm <sup>3</sup> )	95,90 $\pm$ 29,96	75,46 $\pm$ 29,96
Total de espermatozóides ( $\times 10^6$ )	3.566,14 $\pm$ 921,64	1.620,99 $\pm$ 921,64
Defeitos Menores (%)	11,59 $\pm$ 2,36	14,08 $\pm$ 2,36
Defeitos Maiores (%)	36,75 $\pm$ 5,35	37,30 $\pm$ 5,35
pH	7,33 $\pm$ 0,05	7,47 $\pm$ 0,05
Osmolaridade	275,93 $\pm$ 5,18	288,13 $\pm$ 5,18

### Libido

Aparentemente, a libido foi normal nos meses de primavera-verão nos dois grupos observados. Entretanto houve uma evidente diminuição da libido relacionada aos dias mais frios dos períodos de colheita de dados, durante a transição outono-inverno.

Como evidência da diminuição da libido, os animais de Rubião Júnior apresentaram demora para efetuar a cobertura nos dias mais frios, mas não desistiam da monta. Ao contrário, os animais da Fazenda Lageado, muitas vezes desistiram da monta, obrigando a mudança de hora ou dia da colheita de sêmen.

## 4.2. Concentrações séricas de FSH, LH e testosterona

As variações séricas das concentrações de FSH, LH e testosterona dos animais utilizados neste estudo estão apresentadas nas figuras 4, 5, e 6 e nas tabelas 5, 6, 7 e 8.

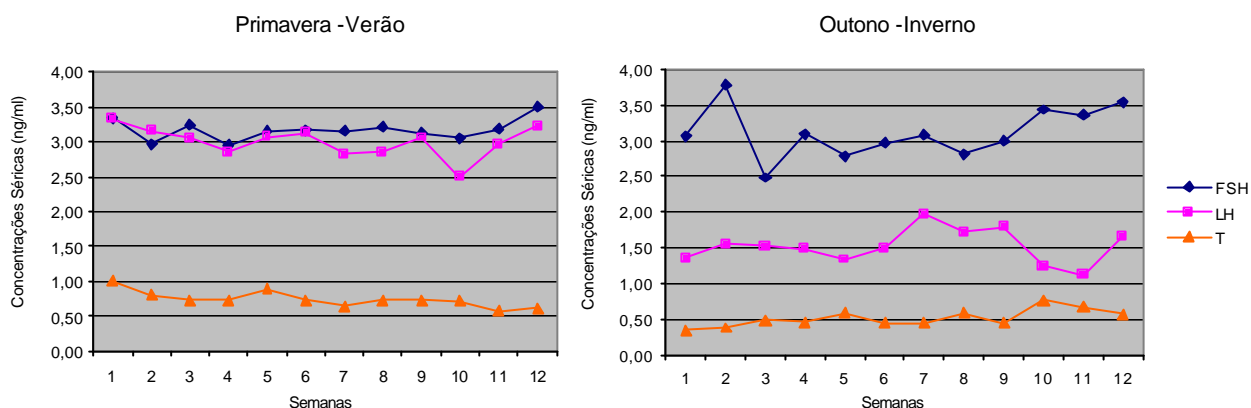


Figura 4 – Concentrações séricas de FSH, LH e testosterona (T) de garanhões sob luz natural (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

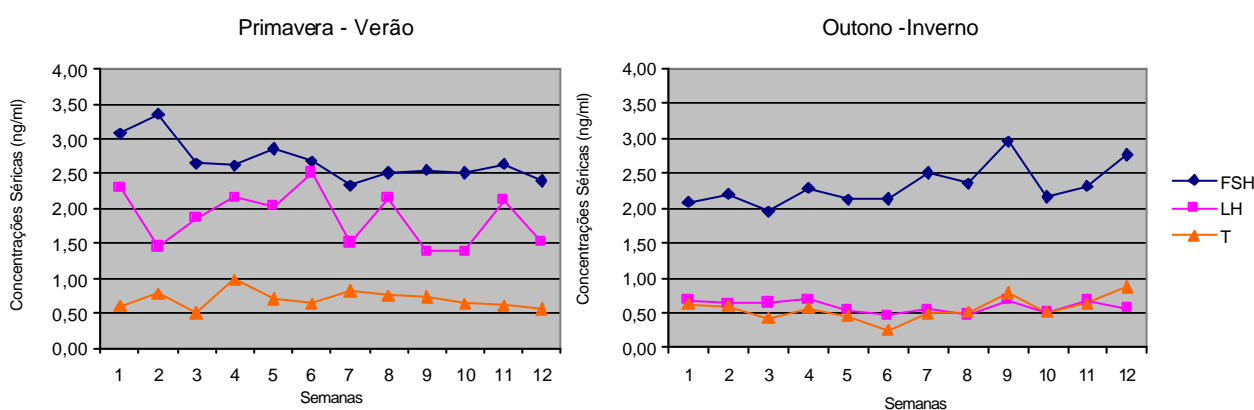


Figura 5 – Concentrações séricas de FSH, LH e testosterona (T) de garanhões com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

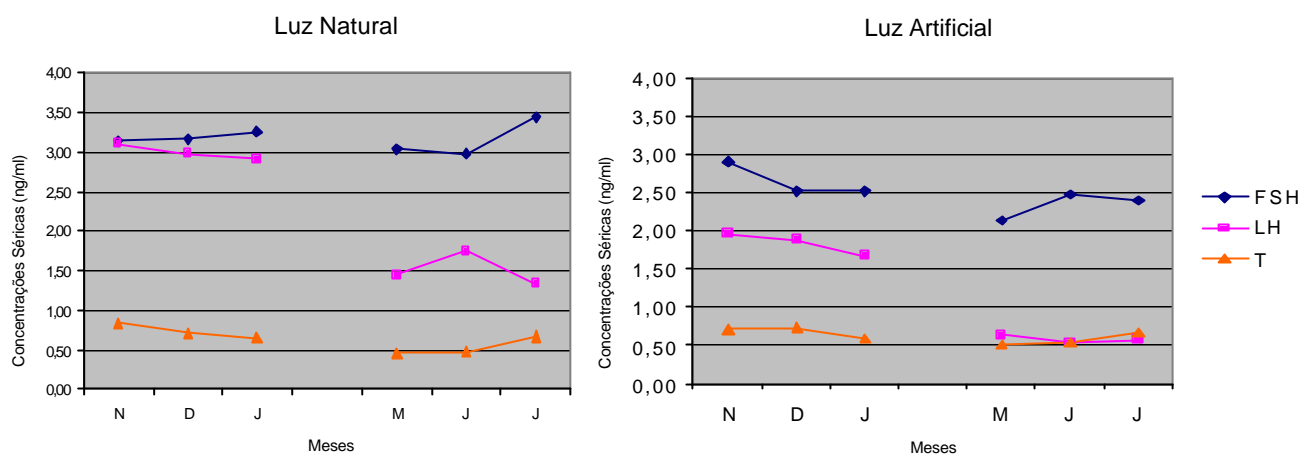


Figura 6 - Concentrações séricas de FSH, LH e testosterona (T) de garanhões sob luz natural (n=4) e com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Os coeficientes de correlação entre as concentrações dos hormônios FSH e LH foram  $r = 0,40$  ( $P=0,02$ ); entre LH e testosterona,  $r=0,15$  ( $P=0,42$ ) e entre FSH e testosterona,  $r = 0,22$  ( $P=0,23$ ); em todos os períodos observados.

Tabela 5 - Médias  $\pm$  EPM das concentrações (ng/ml) de FSH, LH e testosterona dos garanhões de Rubião Júnior (n=4) e do Lageado (n=4), sem a influência da estação do ano.

Hormônio	Grupos	
	Rubião Júnior	Lageado
FSH	3,14 $\pm$ 0,46	2,50 $\pm$ 0,46
LH	2,26 $\pm$ 0,55	1,23 $\pm$ 0,55
Testosterona	0,63 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,05

Tabela 6 - Médias  $\pm$  EPM das concentrações (ng/ml) de FSH, LH e testosterona de garanhões (n=8), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Hormônio	Estação do Ano	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
FSH	2,92 $\pm$ 0,46	2,76 $\pm$ 0,46
LH	2,43 $\pm$ 0,55	1,05 $\pm$ 0,55
Testosterona	0,72 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,53 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes representam diferença significativa (P=0,04).

Tabela 7 - Médias  $\pm$  EPM das concentrações de FSH, LH e testosterona de garanhões sob luz natural (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Hormônio	Luz Natural	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
FSH	3,17 $\pm$ 0,65	3,12 $\pm$ 0,65
LH	3,00 $\pm$ 0,77	1,52 $\pm$ 0,77
Testosterona	0,74 $\pm$ 0,07	0,51 $\pm$ 0,07

Tabela 8 - Médias  $\pm$  EPM das concentrações de FSH, LH e testosterona de garanhões com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Hormônio	Luz Artificial	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
FSH	2,68 $\pm$ 0,65	2,32 $\pm$ 0,65
LH	1,86 $\pm$ 0,77	0,59 $\pm$ 0,77
Testosterona	0,69 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,07

### 4.3. Citologia Aspirativa por Agulha Fina (Caaf)

As porcentagens e os diâmetros nucleares ( $\mu\text{m}$ ) das células testiculares em exames de Caaf dos testículos dos animais utilizados neste estudo estão apresentadas nas tabelas de 9 a 16.

Tabela 9 - Médias  $\pm$  EPM das porcentagens de células testiculares em exames de Caaf dos testículos dos garanhões de Rubião Júnior (n=4) e do Lageado (n=4), sem a influência da estação do ano.

Tipo celular	Grupos	
	Rubião Júnior	Lageado
Espermatogônia	1,43 (0,12 $\pm$ 0,01)	2,23 (0,15 $\pm$ 0,01)
Espermatócito I	4,76 (0,22 $\pm$ 0,02)	5,65 (0,24 $\pm$ 0,02)
Espermatócito II	0,49 (0,07 $\pm$ 0,01)	0,36 (0,06 $\pm$ 0,01)
Espermátide Inicial	37,59 (0,66 $\pm$ 0,05)	35,66 (0,64 $\pm$ 0,05)
Espermátide Final	26,43 (0,54 $\pm$ 0,03)	33,76 (0,62 $\pm$ 0,03)
Espermatozóide	27,41 $\pm$ 3,57	21,22 $\pm$ 3,57
Célula de Sertoli	4,76 (0,22 $\pm$ 0,01) <sup>a</sup>	7,63 (0,28 $\pm$ 0,01) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes representam diferença significativa ( $P \leq 0,007$ ).

Dados entre parênteses são dados transformados

Tabela 10 - Médias  $\pm$  EPM das porcentagens de células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões (n=8), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Tipo celular	Estação do Ano	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
Espermatogônia	1,68 (0,13 $\pm$ 0,01)	1,95 (0,14 $\pm$ 0,01)
Espermatócito I	6,12 (0,25 $\pm$ 0,02)	3,95 (0,20 $\pm$ 0,02)
Espermatócito II	0,64 (0,08 $\pm$ 0,01)	0,25 (0,05 $\pm$ 0,01)
Espermátide Inicial	38,56 (0,67 $\pm$ 0,05)	34,71 (0,63 $\pm$ 0,05)
Espermátide Final	27,32 (0,55 $\pm$ 0,03)	32,82 (0,61 $\pm$ 0,03)
Espermatozóide	24,50 $\pm$ 3,57	24,13 $\pm$ 3,57
Célula de Sertoli	3,95 (0,20 $\pm$ 0,01) <sup>a</sup>	8,73 (0,30 $\pm$ 0,01) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes representam diferença significativa (P=0,001)

Dados entre parênteses são dados transformados

Tabela 11 - Médias  $\pm$  EPM das porcentagens de células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões sob luz natural (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Tipo celular	Luz Natural	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
Espermatogônia	1,20 (0,11 $\pm$ 0,02)	1,68 (0,13 $\pm$ 0,02)
Espermatócito I	5,65 (0,24 $\pm$ 0,04)	3,95 (0,20 $\pm$ 0,04)
Espermatócito II	0,64 (0,08 $\pm$ 0,02)	0,36 (0,06 $\pm$ 0,02)
Espermátide Inicial	39,54 (0,68 $\pm$ 0,07)	35,66 (0,64 $\pm$ 0,07)
Espermátide Final	22,98 (0,50 $\pm$ 0,05)	30,03 (0,58 $\pm$ 0,05)
Espermatozóide	26,94 $\pm$ 5,05	27,88 $\pm$ 5,05
Célula de Sertoli	3,20 (0,18 $\pm$ 0,02) <sup>a</sup>	6,61 (0,26 $\pm$ 0,02) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes representam diferença significativa (P $\leq$ 0,01)

Dados entre parênteses são dados transformados

Tabela 12 - Médias  $\pm$  EPM das porcentagens de células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Tipo celular	Luz Artificial	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
Espermatogônia	2,54 (0,16 $\pm$ 0,02)	1,98 (0,14 $\pm$ 0,02)
Espermatócito I	6,61 (0,26 $\pm$ 0,04)	4,35 (0,21 $\pm$ 0,04)
Espermatócito II	0,49 (0,07 $\pm$ 0,02)	0,25 (0,05 $\pm$ 0,02)
Espermátide Inicial	37,59 (0,66 $\pm$ 0,07)	34,71 (0,63 $\pm$ 0,07)
Espermátide Final	30,95 (0,59 $\pm$ 0,05)	36,63 (0,65 $\pm$ 0,05)
Espermatozóide	21,13 $\pm$ 5,05	21,31 $\pm$ 5,05
Célula de Sertoli	5,20 (0,23 $\pm$ 0,02) <sup>a</sup>	11,12 (0,34 $\pm$ 0,02) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes representam diferença significativa ( $P \leq 0,003$ )

Dados entre parênteses são dados transformados

Tabela 13 - Médias  $\pm$  EPM dos diâmetros nucleares ( $\mu\text{m}$ ) das células testiculares em exames de Caaf dos testículos dos garanhões de Rubião Júnior (n=4) e do Lageado (n=4), sem a influência da estação do ano.

Tipo celular	Grupos	
	Rubião Júnior	Lageado
Espermatogônia	15,28 $\pm$ 0,32	15,41 $\pm$ 0,32
Espermatócito I	16,32 $\pm$ 0,39	16,58 $\pm$ 0,39
Espermatócito II	11,02 $\pm$ 0,18	10,93 $\pm$ 0,18
Espermátide Inicial	9,16 $\pm$ 0,21	9,67 $\pm$ 0,21
Espermátide Final	7,79 $\pm$ 0,28	8,17 $\pm$ 0,28
Espermatozóide	6,08 $\pm$ 0,11	6,05 $\pm$ 0,11
Célula de Sertoli	16,29 $\pm$ 0,49	17,19 $\pm$ 0,49

Tabela 14 - Médias  $\pm$  EPM dos diâmetros nucleares ( $\mu\text{m}$ ) das células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões (n=8), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Tipo celular	Estação do Ano	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
Espermatogônia	15,16 $\pm$ 0,32	15,53 $\pm$ 0,32
Espermatócito I	16,04 $\pm$ 0,39	16,86 $\pm$ 0,39
Espermatócito II	10,72 $\pm$ 0,18	11,22 $\pm$ 0,18
Espermátide Inicial	9,18 $\pm$ 0,21	9,65 $\pm$ 0,21
Espermátide Final	7,87 $\pm$ 0,28	8,09 $\pm$ 0,28
Espermatozóide	6,04 $\pm$ 0,11	6,10 $\pm$ 0,11
Célula de Sertoli	16,96 $\pm$ 0,49	16,53 $\pm$ 0,49

Tabela 15 - Médias  $\pm$  EPM dos diâmetros nucleares ( $\mu\text{m}$ ) das células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões sob luz natural (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Tipo celular	Luz Natural	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
Espermatogônia	14,98 $\pm$ 0,46	15,58 $\pm$ 0,46
Espermatócito I	16,21 $\pm$ 0,58	16,43 $\pm$ 0,58
Espermatócito II	10,89 $\pm$ 0,30	11,15 $\pm$ 0,30
Espermátide Inicial	9,02 $\pm$ 0,30	9,31 $\pm$ 0,30
Espermátide Final	7,55 $\pm$ 0,40	8,02 $\pm$ 0,40
Espermatozóide	5,98 $\pm$ 0,16	6,19 $\pm$ 0,16
Célula de Sertoli	16,82 $\pm$ 0,67	15,77 $\pm$ 0,67

Tabela 16 - Médias  $\pm$  EPM dos diâmetros nucleares ( $\mu\text{m}$ ) das células testiculares em exames de Caaf dos testículos de garanhões com luz artificial durante à noite nas baias (n=4), observadas durante a transição das estações primavera-verão e outono-inverno.

Tipo celular	Luz Artificial	
	Primavera-Verão	Outono-Inverno
Espermatogônia	15,33 $\pm$ 0,46	15,48 $\pm$ 0,46
Espermatócito I	15,88 $\pm$ 0,58	17,22 $\pm$ 0,58
Espermatócito II	10,55 $\pm$ 0,30	11,30 $\pm$ 0,30
Espermátide Inicial	9,34 $\pm$ 0,30	10,00 $\pm$ 0,30
Espermátide Final	8,18 $\pm$ 0,40	8,15 $\pm$ 0,40
Espermatozóide	6,10 $\pm$ 0,16	6,00 $\pm$ 0,16
Célula de Sertoli	17,10 $\pm$ 0,67	17,29 $\pm$ 0,67

## **5. Discussão**

A influência da estação nas características reprodutivas de garranhões tem sido caracterizada pelo aumento do tamanho dos testículos, produção e liberação de espermatozoides, libido e aumento das concentrações séricas de FSH, LH e testosterona (Clay e Clay, 1992, Roser, 2001). Entretanto, esta influência não tem sido clara nos garranhões que vivem em regiões de clima tropical.

Acredita-se que nos trópicos seja menos provável que os animais utilizem o fotoperíodo como sinalizador para a reprodução sazonal (Bronson e Heideman, 1994) e, mesmo na ausência da variação do fotoperíodo, os garranhões devem apresentar um ciclo reprodutivo anual, como resultado de um ciclo circanual endógeno da função testicular (Clay e Clay, 1992, Roser, 2000).

Por analogia, assumiu-se por muitos anos que as respostas às variações sazonais das características reprodutivas de garranhões que vivem nos trópicos fossem semelhantes ao que ocorre nas regiões de clima temperado. Em um estudo recente, Zahn et al. (2001) não observaram alterações sazonais nas características do sêmen de garranhões que vivem na região de Botucatu. Agora, porém, este estudo trás outros resultados que poderão iniciar um conceito próprio sobre a capacidade reprodutiva de garranhões que vivem nas regiões tropicais.

### **5.1 Efeitos da estação do ano nas características testiculares, seminais e endócrinas**

O volume testicular e as características seminais dos garranhões mantidos sob luz natural diferiram de forma significativa daqueles dos garranhões sob luz contínua. Este fato mostra uma

superioridade da função reprodutiva dos garanhões que permaneceram sob luz natural.

De acordo com Squires et al. (1981) e Clay e Clay (1992), existe um aumento evidente do tamanho dos testículos de garanhões nos meses de primavera e verão. Em ambos os grupos deste estudo, o volume testicular dos garanhões apresentou um pequeno aumento nos meses de primavera-verão, porém sem uma diferença significativa entre os períodos observados.

Segundo Blanchard e Varner (1996) e Pickett e Voss (1998), o tamanho dos testículos pode ser usado para uma estimativa do número de espermatozoides disponíveis no ejaculado (DSO), após a estabilização da reserva extragonadal e, portanto, serve indiretamente para estimar a produção diária de espermatozoides (DSP), que é uma indicação da quantidade de tecido testicular funcional que o garanhão tem disponível para produzir espermatozoides. Logo, o aumento de volume dos testículos deve ser acompanhado por um aumento do número de espermatozoides no ejaculado, como foi constatado por Clay e Clay (1992), quando o maior tamanho testicular coincidiu com o maior número de espermatozoides ejaculados, fato que ocorreu no mês de junho (correspondente ao mês de dezembro no Hemisfério Sul). O pH, o volume seminal total e o total de espermatozoides com motilidade progressiva também sofrem a influência da estação do ano (Roser e Hughes, 1992). Segundo Pickett (1993), o aumento do volume seminal pode chegar a 40% nos meses da estação reprodutiva, assim como o número de espermatozoides no ejaculado pode ficar 50% maior no mesmo período. Entretanto, para a Pickett et al. (1998), a motilidade progressiva não parece sofrer influência da estação do ano.

Neste estudo, os garanhões sob luz natural apresentaram uma melhor qualidade do sêmen em relação aos garanhões sob luz contínua, pois os dois grupos diferiram significativamente quanto a maioria dos parâmetros seminais observados, exceto pelo pH e a osmolaridade. Entretanto, os dois grupos não apresentaram diferenças significativas de nenhum parâmetro seminal em relação à estação do ano. Porém, pôde-se notar um comportamento diferente entre os dois grupos. Enquanto os garanhões sob luz contínua tiveram uma clara diminuição do número de espermatozóides ejaculados no período outono-inverno, um comportamento inverso, menos evidente e tampouco significativa deste mesmo parâmetro foi observado nos garanhões sob luz natural. A esse respeito, fica bastante confuso o fato de como a atividade espermatogênica estaria sendo refletida nessas características.

Pelos exames de Caaf testicular, pôde-se avaliar a atividade espermatogênica dos garanhões nos diferentes períodos observados. Nos dois grupos, a distribuição das porcentagens dos diferentes tipos celulares foi normal, de acordo com Leme e Papa (2000). A porcentagem crescente desde espermatogônia até espermátide inicial mostrou claramente a evolução normal da espermatogênese, exceto pela baixa porcentagem de espermátocitos secundários; que são células de curta duração na divisão meiótica, raramente encontrados em exames de Caaf testicular (Pàpic et al, 1988, Foresta et al, 1993).

Segundo Johnson (1985), por exames histológicos, foi possível verificar que durante a estação reprodutiva existe um leve aumento do número de espermatogônias A1 associado a uma diminuição da sua degeneração. Entretanto, cerca de 34% da degeneração das células germinativas ao final da espermatocitogênese ocorrem durante a estação reprodutiva, contra menos de 5% fora deste período. Já a degeneração das espermátides ocorrem principalmente fora da estação

reprodutiva. Em conjunto, esses fatores seriam os responsáveis pela maior produção espermática durante a estação reprodutiva. Nenhuma destas informações puderam ser obtidas pela avaliação quantitativa das células germinativas nos exames de Caaf testicular, em nenhum dos grupos estudados; principalmente pela grande variação dos valores normais que pode existir neste tipo de exame (Leme e Papa, 2000). Além disso, a avaliação do tamanho do núcleo das células germinativas não evidenciou nenhuma diferença ou alteração destas células entre as estações do ano, nos dois grupos estudados; como também foi observado por Johnson (1985), que não encontrou diferença no volume nuclear das células germinativas entre as estações do ano.

A porcentagem de espermátides iniciais, espermátides finais e espermatozóides deveriam ser semelhantes, uma vez que não existem divisões durante a espermiogênese. Entretanto, nos dois grupos, observou-se uma diminuição da porcentagem de espermatozóides em relação às espermátides iniciais. Normalmente, os espermatozóides são menos numerosos (Schenk e Schill, 1988). Os fatores que podem colaborar para este fato são: (1) em exames citológicos, os últimos passos de desenvolvimento das espermátides podem ser confundidos com os espermatozóides (Leme, 1998); (2) a coloração fraca do acrossoma neste tipo de exame pode fazer com que os espermatozóides sejam confundidos com o fundo da lâmina e (3) os espermatozóides, depois de formados, são liberados pelo epitélio semíferos para serem armazenados no epidídimo (Johnson, 1995), e portanto não devem permanecer por muito tempo nos testículos.

A diferença significativa observada entre as porcentagens de células de Sertoli nos dois grupos colabora com a afirmativa de que existe uma superioridade prévia dos ganhões sob luz natural em relação àqueles sob luz contínua, pois de acordo com Blanchard e Johnson

(1997), geralmente, o menor número de células de Sertoli está associado com uma maior capacidade de acomodação de células germinativas.

Contudo, o fato mais importante da avaliação citológica diz respeito às diferenças significativas da diminuição das porcentagens de células de Sertoli nos períodos primavera-verão em relação ao outono-inverno, nos dois grupos. Aplicando-se o mesmo conceito de Blanchard e Johnson (1997), onde o menor número de células de Sertoli está associado com uma maior capacidade de acomodação de células germinativas, estes resultados mostram que os dois grupos apresentaram uma maior atividade espermatogênica no período primavera-verão. Nos ganhões sob luz contínua, pudemos notar que a diminuição do volume testicular associada a aumento significativo da porcentagem de células de Sertoli nos meses de outono-inverno, resultou em uma clara diminuição do DSO. Porém, nos ganhões sob luz natural, a diminuição do volume testicular associada a um aumento significativo da porcentagem de células de Sertoli, nos meses outono-inverno, não resultou em uma diminuição do DSO. Se voltarmos ao conceito de DSO, veremos que ele só poderá ser determinado após a estabilização da reserva extragonadal, o que pode não ter sido efetivo no caso dos ganhões sob luz natural, pois o DSO deste grupo foi o único parâmetro não compatível com os demais resultados.

Considerando os ganhões de Rubião Júnior (luz natural) como animais de alta produção espermática e os da Fazenda Lageado (luz contínua), animais de baixa produção espermática, poderemos estabelecer outro ponto de comparação entre os grupos, além daquele referente ao regime de luz.

A diferença das porcentagens de células de Sertoli em relação à estação foi semelhante entre os dois grupos, o que está de

acordo com Blanchard e Johnson (1997) que não notaram diferença entre a taxa de degeneração de células germinativas entre garanhões com baixa e alta produção espermática; entretanto, esses autores acreditam que garanhões de baixa produção espermática sejam mais sensíveis às variações sazonais que garanhões de alta produção, o que pode ter feito com que pudéssemos perceber as variações sazonais nos garanhões do grupo que permaneceu na Fazenda Lageado (luz contínua) e não naqueles de Rubião Júnior (luz natural).

Embora tenha sido avaliada de forma subjetiva, a libido dos animais foi diferente entre as estações do ano. Esta diferença foi ainda mais evidente nos garanhões da Fazenda Lageado (luz contínua), que parecem ter sofrido mais a influência das baixas temperaturas do que os animais de Rubião Júnior (sob condições naturais de luz). Os animais de Rubião Júnior, embora tivessem apresentado demora para efetuar a cobertura nos dias mais frios, não desistiam da monta. Ao contrário, os animais da Fazenda Lageado, muitas vezes desistiram da monta, obrigando a mudança de hora ou dia da colheita de sêmen. Thompson et al. (1986) descreveram que a libido é bem mais ligada à estação que as outras características reprodutivas, e assim também pudemos notar neste estudo. Provavelmente, os animais da Fazenda Lageado tenham sido mais afetados não por estarem sob luz contínua, mas por serem inferiores aos de Rubião Júnior, quanto às características reprodutivas.

Blanchard e Johnson (1997) descreveram que animais com alta produção espermática apresentam maiores concentrações séricas de testosterona que os garanhões com baixa produção espermática. Comparando garanhões férteis e subférteis, Roser e Hughes (1992) encontraram diferenças significativas entre as concentrações de FSH e LH, mas não de testosterona. Neste estudo, não houve diferença significativa das concentrações hormonais entre os dois grupos. Acredita-

se que a diferença da função testicular encontrada entre garanhões não esteja relacionada com a função hipotálamo-pituitária, mas sim com uma maior ou menor capacidade da comunicação intercelular de um sistema local de fatores parácrinos-autócrinos (Roser, 2001). Além disso, as concentrações de testosterona no sangue venoso periférico não refletem precisamente a quantidade de testosterona que é produzida dentro do testículo (Sharpe, 1994).

Em garanhões normais, as concentrações hormonais de FSH, LH e testosterona aumentam nos períodos da estação reprodutiva (Clay et al., 1988, Roser e Hughes, 1991 e 1992, Clay e Clay, 1992). Pelos resultados deste estudo, pôde-se notar que, embora não apresentassem diferenças significativas, as concentrações de LH foram aproximadamente duas vezes mais altas no período primavera-verão, nos dois grupos. Este fato também foi observado por Irvine e Alexander (1982) e Johnson e Thompson (1983). Entretanto, os valores das concentrações de FSH nos dois grupos apresentaram-se próximos, comparando-se os dois períodos do ano; entretanto, houve um pequeno aumento no período primavera-verão, o que também foi observado por Thompson et al. (1986). Quanto às variações das concentrações de testosterona, houve uma diminuição significativa no período outono-inverno, quando os dois grupos foram considerados juntos. Esta diminuição foi mantida nos dois grupos, quando avaliados separadamente. O aumento de testosterona durante a estação reprodutiva foi notificado por Thompson et al. (1978); Byers et al. (1983); Roser e Hughes (1991 e 1992); Clay e Clay (1992).

Uma maior correlação era esperada entre as concentrações de LH e testosterona, como foi observada por Thompson et al. (1978) e Clay e Clay (1992), porém isto não ocorreu neste estudo. Muito provavelmente, esta correlação não tenha sido maior pela grande

variação individual das concentrações de testosterona, LH e também de FSH.

É presumível que as variações sazonais do tamanho testicular, da produção espermática e da libido de garanhões sejam dirigidas pelas flutuações sazonais das concentrações de LH (Thompson et al., 1977), testosterona (Berndtson et al., 1974) e, talvez, pelo FSH no sangue (Clay et al., 1988). Neste estudo, as maiores concentrações de LH e testosterona, nos dois grupos, foram acompanhadas por um aumento do volume testicular e uma significativa melhora da atividade espermatogênica, refletida pela diminuição da porcentagem de células de Sertoli, no período primavera-verão. Estes resultados podem ser suficientes para mostrar que houve uma variação sazonal nos garanhões deste estudo, seja ela mais ou menos evidente.

Na maioria das vezes, as variáveis analisadas dentro ou entre os grupos deste estudo apresentaram valores de diferentes magnitude, mas não significativamente diferentes. É bem sabido que ocorrem muitas variações entre diferentes avaliações feitos no mesmo animal. A combinação entre a variabilidade individual associada ao limitado número de animais utilizados neste estudo contribuiu para uma sensibilidade insuficiente dos resultados. Embora os dados tenham sido interpretados com uma devida precaução, acredita-se que se um maior número de animais fossem avaliados, as diferenças observadas teriam sido significativas.

As transições dos estados reprodutivos sazonais são, geralmente, cronometradas pelo fotoperíodo que, via melatonina, sincroniza um ritmo circanual endógeno com as estações do ano. As variações no fotoperíodo induzem correspondentes alterações no padrão circadiano da secreção de melatonina, que por sua vez age como um

sinal endócrino do comprimento do dia (Arendt, 1998). Não se sabe exatamente como funcionaria o mecanismo de regulação endócrina da reprodução na provável ausência da secreção de melatonina; como por exemplo nos garanhões deste estudo que, mesmo sob luz contínua por aproximadamente um ano, apresentaram uma variação sazonal das características reprodutivas.

Em um tipo de roedores (*Dicrostonyx groelandicus*), a aplicação de luz contínua (24h), num regime que não permite a secreção de melatonina, não impediu a regressão testicular. Nesses roedores, a luz exerce um efeito estimulante para a função testicular, mas quando aplicada continuamente por um longo período, passa a não exercer mais esse efeito e a regressão testicular ocorre graças a um estado de refratariedade atingido pelos animais (Gower et al., 1998). Neste estudo, mesmo sob luz contínua, ou seja, sem a influência da variação do fotoperíodo, os garanhões da Fazenda Lageado mostraram uma diminuição da capacidade reprodutiva no período outono-inverno, tanto dos parâmetros seminais, de citologia testicular e da avaliação das concentrações hormonais. Estes dados foram contrários aos resultados obtidos por Van der Holst (1975), que forneceu luz contínua nas baias aos garanhões fora da estação reprodutiva e obteve uma melhora da capacidade espermatogênica neste mesmo período. Neste estudo, como as colheitas de dados foram iniciadas antes da estação reprodutiva, o provável efeito estimulante do fotoperíodo também deveria ser prolongado, mas assim como ocorreu com os animais estudados por Clay e Clay (1992), a máxima capacidade reprodutiva apresentou um declínio, a despeito do fotoperíodo, devido provavelmente a um estado de refratariedade desses animais.

Em condições normais, as flutuações hormonais estão sincronizadas com as variações ambientais pelo fotoperíodo (Clay e Clay,

1992, Turek e Van Cauter, 1994). Entretanto, sem um agente regulador do tempo, deveria ocorrer uma falha na sincronização da atividade reprodutiva com o meio externo, o que determinaria um curso livre para o ciclo circanual endógeno (Clay e Clay, 1992). Infelizmente, não foram feitas colheitas de dados durante todo o ano, o que seria imprescindível para verificar se os garanhões apresentaram um ciclo circanual equivalente a 12 meses, mas houve uma certa concordância das variações observadas no grupo sob luz natural com as variações do grupo sob luz contínua, em relação à época do ano.

A diferença entre os animais deste estudo, que receberam luz contínua, daqueles que são transportados de um hemisfério a outro é que aqui os animais não tiveram a influência da variação do fotoperíodo, mas sofreram todas as outras alterações ambientais próprias do local. Ao contrário, os garanhões que viajam sofrem a influência dos dois hemisférios; provavelmente, somente das estações primavera e verão. Estes animais devem realmente apresentar um curso livre do ciclo circanual endógeno, a não ser que o homem faça com que eles tenham um ciclo reprodutivo conhecido, seja simulando dias curtos ou alternando o fornecimento de melatonina e GnRH exógeno (Pickett et al., 1998).

O fato dos garanhões sob luz contínua terem apresentado uma variação sazonal pode ser explicado pelos seguintes argumentos: (1) sob efeito estimulatório constante do fotoperíodo, a regressão da função endócrina e testicular irá ocorrer devido à refratariedade (Clay e Clay, 1992); (2) existem evidências substanciais de que os ciclos reprodutivos possam ser gerados de forma endógena, sem nenhum sinal de mudança anual dos fatores ambientais (Turek e Van Cauter, 1994) e (3) nos trópicos, é menos provável que a regulação sazonal da atividade reprodutiva seja baseada na alteração do fotoperíodo em regiões abaixo de 30° de latitude (Bronson e Heideman, 1994).

Se considerarmos que os animais que permaneceram sob luz contínua apresentaram queda da capacidade reprodutiva devido à uma refratariedade ao estímulo da luz, não conseguiremos saber se estes animais, mantidos neste mesmo regime de luz, recuperariam ou não a capacidade reprodutiva no próximo período primavera-verão, pois não foram colhidos dados referentes a mais uma estação reprodutiva. Sendo assim, estes animais deveriam receber o efeito de algum agente que os tirassem do estado refratário e dessem a eles condições de continuar apresentando um ciclo circanual da atividade reprodutiva, caso contrário não se sabe como eles iriam se comportar nos próximos meses ou anos. Além disso, garanhões sob o efeito estimulatório prolongado da luz apresentaram um declínio não tão pronunciado nas concentrações de gonadotrofinas quanto aquele observado nos garanhões controle (Clay e Clay, 1992); o que não foi observado neste estudo, onde os garanhões sob luz contínua tiveram variações semelhantes quanto às concentrações de gonadotrofinas, independente da época do ano. Segundo Bronson e Heideman (1994), muito pouco se sabe sobre o comportamento sazonal de mamíferos de grande porte, por dois motivos: (1) estudos desta magnitude deveriam incluir, no mínimo, dois anos de observação, com dois ciclos circanuais completos dos mesmos animais, com o controle do fotoperíodo, da temperatura, da umidade e da disponibilidade de alimento por um período longo, o que inevitavelmente incorreria em alguns erros; (2) a maioria dos estudos feitos em grandes animais foram realizados em ambiente temperado, com animais de produção, que têm sido submetidos à intensa seleção durante a domesticação e pouco podem nos dizer a respeito de rebanhos selvagens. Isto nos deixa muito pouca opção exceto por especulações com base em dados correlacionados.

Como segunda opção ao comportamento dos garanhões sob luz contínua temos que o ciclo circanual endógeno se manifesta mesmo na ausência de mudanças dos fatores ambientais. Isto, aqui,

parece menos provável, pois só não houve mudança em relação ao fotoperíodo, pois as outras condições, como temperatura e qualidade de alimento, foram as mesmas para ambos os grupos e variaram quanto à época do ano. Neste caso, temos as seguintes explicações: ou os animais não tinham ainda modificado a periodicidade dos seus ciclos ou eles já estavam adaptados a responder a outros fatores ambientais referentes à época do ano, que não o fotoperíodo.

Quanto maior é o tempo de vida de um animal e mais alta é a latitude da região onde ele vive, é mais provável que ele use o fotoperíodo como agente sinalizador do tempo (Bronson e Heideman, 1994). A principal vantagem do fotoperíodo é que ele é o único fator inteiramente previsível da variação do meio ambiente. Porém, a utilização do fotoperíodo como um sinalizador das condições ambientais pode resultar num sistema inflexível que pode ser menos ajustável para um ambiente de condições climáticas menos previsíveis, como ocorre nas regiões de clima tropical. Vale ressaltar que a América do Sul é afetada pelas oscilações causadas pelo efeito El Niño, que tornam ainda mais diversificadas e imprevisíveis as condições climáticas da nossa realidade. É mais precisamente em Botucatu, situada a 22°52'S de latitude, temos a diferença máxima de 2h 49min de luz entre os períodos de maior e menor luminosidade do ano, o que pode ser pouco para que este fator o único a ser considerado como marcador do tempo.

Neste estudo, um fato que deve ser considerado é a possível adaptação dos animais em responder a outras variações sazonais que não seja o fotoperíodo, e sim a alterações ambientais mais representativas das regiões tropicais, como a temperatura, as concentração de chuvas e a disponibilidade e qualidade de alimentos. Embora muitos estudos tenham utilizado com sucesso a iluminação artificial em éguas nas regiões tropicais, é também bastante conhecido o

fato das éguas sob luz natural atrasarem o início da atividade reprodutiva em função da falta de chuvas e da disponibilidade de alimentos. Um conceito interessante a esse respeito é o da reprodução sazonal oportunista. Embora não tenha sido ainda descrita como estratégia reprodutiva de mamíferos de vida longa, sabe-se que as espécies que utilizam o oportunismo têm os machos sexualmente prontos a qualquer período do ano, enquanto as fêmeas podem se reproduzir de forma sazonal ou contínua dependendo somente das condições energéticas e nutricionais do momento (Bronson e Heideman, 1994). O oportunismo pode resultar em reprodução estritamente sazonal, mas a sua grande vantagem está na capacidade de resposta rápida a qualquer alteração na disponibilidade de alimentos.

Devemos também considerar as diferenças entre as características reprodutivas que existem entre os sexos (Heideman, 1989, Wood et al., 1991). Pois, é bastante evidente o fato do macho de uma espécie estar sempre, ou quase sempre, apto à reprodução, enquanto a fêmea apresenta certas restrições, o que mostra uma indiscutível vantagem evolutiva dos machos em relação às fêmeas. Por isso não é estranho que a regulação ambiental da reprodução possa diferir entre os sexos (Bronson e Heideman, 1994).

É claro que é bastante ousado afirmar que os eqüinos, mais precisamente os garanhões, possam apresentar um comportamento reprodutivo oportunista, mesmo porque o período de observação deste estudo foi pouco para se chegar a esta conclusão, mas é bem certo que deve-se ter em mente que estudos sobre a estacionalidade reprodutiva, independente da espécie, deverão ser cada vez mais complexos, considerando muitos outros elementos, além daqueles já estudados. Além disso, não se deve esquecer da inevitável influência que o homem tem

exercido sobre a vida dos animais e, principalmente, não se deve subestimar a grande capacidade de adaptação das espécies.

## 6. Conclusão

A partir dos resultados deste estudo, pode-se verificar que:

- 1) As características seminais de garanhões com alta produção espermiática, mantidos sob luz natural, não foram suficientes para mostrar uma sazonalidade reprodutiva destes animais.
- 2) Os garanhões deste estudo, independente do regime de luz a que foram submetidos, seja natural ou contínua, apresentaram variações sazonais semelhantes quanto às concentrações séricas de FSH, LH e testosterona, com um aumento evidente dos níveis de LH nos meses de primavera-verão.
- 3) Garanhões mantidos sob luz natural ou contínua apresentaram semelhante variação sazonal no número de células de Sertoli presentes nos exames de Caaf testicular, com um aumento da porcentagem destas células nos meses de outono-inverno.
- 4) Garanhões com alta produção espermiática, mantidos sob luz natural, que vivem na nossa região (Botucatu, Estado de São Paulo) mostraram pouca variação sazonal das características reprodutivas entre os períodos de maior e menor luminosidade do ano.
- 5) Garanhões com baixa produção espermiática, mantidos sob luz contínua, que vivem na nossa região (Botucatu, Estado de São Paulo), apresentaram variação sazonal das características reprodutivas; com uma diminuição da capacidade reprodutiva e da libido no período outono-inverno, em relação ao período primavera-verão.

## 7. Referências Bibliográficas \*

AMANN, R.P. Physiology and endocrinology. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Eds). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1993. p.658-85.

ARENDDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Rev. Reprod.**, v.3, p.145-50, 1998.

AURICH, C., BURGMAN,, F., HOPPE, H. Opioid regulation of LH and prolactin release in the horse - identical or independent endocrine pathways ? **Anim. Reprod. Sci.**, v.44, p.127-34, 1996.

BALDWIN, D.M., ROSER, J.F., MUYAN, M., LASLEY, B., DYBDAL, N. Direct effects of free and conjugated steroids on GnRH-stimulated LH release in cultured equine pituitary cells. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.44, p.327-32, 1991.

BARRELL, G.K., THRUN, L.A., BROWN, M.E., VIGUIE, C., KARSCH, F.J. Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. **Biol. Reprod.**, v.63, p.769-74, 2000.

BEN SAAD, M.M., MAUREL, D.L. Long-day inhibition of reproduction and circadian photogonadosensitivity in zembra zsland wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Biol. Reprod.**, v.66, p.415-20, 2002.

---

\* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. Biosis. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- BERNDTSON, W.E., PICKETT, B.W., NETT, T.M. Reproductive physiology of the stallion. IV Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma. **J. Reprod. Fertil.**, v.39, p.115-21, 1974.
- BERNDTSON, W.E., SQUIRES, E.L., THOMPSON, D.L. Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by the season. **Theriogenology**, v.20, p.449-57, 1983.
- BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D. Evaluation breeding soundness in stallions –1. The basic examination. **Vet. Med.**, v.91, p.54-63, 1996.
- BLANCHARD, T.L., JOHNSON, L. Increased germ cell degeneration and reduced germ cell:Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. **Theriogenology**, v.47, p.665-77, 1997.
- BRONSON, F.H., HEIDEMAN, P.D. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: KNOBILL, E., NEILL, J.D. (Eds) **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994.p.541-84.
- BYERS, S.W, DOWSETT, K.F., GLOVER, T.D. Seasonal and circadian changes of testosterone levels in the peripheral blood plasma of stallions and their relation to semen quality. **J. Endocrinol.**, v.99, p.141-50, 1983.
- CLAY, C.M., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Influences of season and artificial photoperiod on stallions: testicular size, seminal characteristics and sexual behavior. **J. Anim. Sci.**, v.64, p.517-25, 1987.

- CLAY, C.M., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P., NETT, T.M. Influences of season and artificial photoperiod on stallions: luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone. **J. Anim. Sci.**, v.66, p.1246-55, 1988.
- CLAY, C.M., CLAY, J.N. Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod and the peri-pubertal period in stallion. In: BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D. (Eds) Stallion management. **Vet. Clin. North Amer.**, v.8, 1992. p.31-56.
- DEUTSCH, C.J., HALEY, M.P., Le BOEUF, B.J. Reproductive effort of male northern elephant seals: estimates from mass loss. **Can. J. Zool.**, v.68, p.2580-93, 1990.
- EISENHAUER, K.M., McCUE, P.M., NAYDEN, D.K., OSAWA, Y., ROSER, J.F. Localization of aromatase in equine Leydig cells. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.11, p.291-98, 1994
- EISENHAUER, K.M., ROSER, J.F. Effects of lipoproteins, eLH, eFSH, and ePrL on equine testicular steroidogenesis *in vitro*. **J. Androl.**, v.16, p.18-22, 1995.
- FONSECA, V.O., VALE FILHO, V.R., MIES FILHO, A., ABREU, J.J. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, CBRA, 1992. 79p.
- FORESTA, C., VAROTTO, A., MIONI, R., ROSSATO, M., ZORZO, M. Citologia testicolare per agoaspirazione nella diagnostica dell'infertilità maschile. Padova:Piccin Nuova Libreria, 1993, 152p.

- FOSTER, R.G., SONI, B.G. Extraretinal photoreceptors and their regulation of temporal physiology. **Rev. Reprod.**, v.3, p.145-150, 1998.
- GERLACH, T., AURICH, J.E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram, and hamster. **Anim. Reprod. Sci.**, v.58, p.197-213, 2000.
- GOWER, B.A., NAGY, T.R., STETSON, M.H. Spontaneous testicular regression in collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*) exposed to prolonged long photoperiod . **J. Reprod. Fertil.**, v.113, p.307-13, 1998.
- GROSSE, J., MAYWOOD, E.S., EBLING, F.J.P., HASTING, M.H. Testicular regression in pinealectomized Syrian Hamster following infusions of melatonin delivered on non-circadian schedules. **Biol. Reprod.**, v.49, p.666-74, 1993.
- HEIDEMAN, P.D. Delayed development in Fischer's pygmy fruit bat (*Haplonycteris fischeri*) in the Phillipines. **J. Reprod. Fertil.**, v.85, p.363-82, 1989.
- IRVINE, C.H.G., ALEXANDER, S. Importance of testis hormones in maintaining the annual pattern of LH secretion in the male horse. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.32, p.97-102, 1982.
- JACKSON, C., BERNARD, R.T.F. Short day length alone does not inhibit spermatogenesis in the seasonally breeding four-striped field mouse (*Rhabdomys pumilio*). **Biol. Reprod.**, v.60, p.1320-3, 1999.

- JOHNSON, L. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. **Biol. Reprod.**, v.32,, p.1181-90, 1985.
- JOHNSON, L. Seasonal differences in equine spermatocitogenesis. **Biol. Reprod.**, v.44, p.284-91, 1991.
- JOHNSON, L. Efficiency of spermatogenesis. **Microscop. Res. Tech.**, v.32, p.385-422, 1995.
- JOHNSON, L., NEAVES, W.B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. **Biol. Reprod.**, v.24, p.703-12, 1981.
- JOHNSON, L., THOMPSON, D.L. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population daily sperm production and serum concentration of FSH, LH and testosterone in stallions. **Biol. Reprod.**, v.29, p.777-789, 1983.
- KARRAS, W. Spermastudien 1. Mitteilung: Eine methode zur färberischen Darstellung der Kopfkapfen und des kolloidsüberzuges des spermien. Mhefte prakt. **Tierhkd**, v.2, p.162-7, 1950.
- KLEIN, S.L., NELSON, R.J. Influence of social factors on immune function and reproduction. **Rev. Reprod.**, v.4, p.168-78, 1999.
- KRAUSE, D. *Untersuchungen an Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der befunde*. Hannover, 1966. 165p. Tese – (Livre Docência) – Tierärztliche Hochschule Hannover.
- LEME, D.P. *Características seminais, citológicas, histológicas antes e depois do estresse calórico testicular induzido, em garanhões*.

- Botucatu, 1998. 129p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- LEME, D.P., PAPA, F.O. Cytologic identification and quantification of testicular cell types using fine needle aspiration in horses. **Equine Vet. J.**, v.32, p.444-46, 2000.
- LINCOLN, G.A. Seasonal aspects of testicular function. In: BURGER, H., de KRETZER, D. (Eds). **The testis**. New York:Raven Press, 1981. p.523.
- MAGISTRINI, M., CHANTELOUB, P., PALMER, E. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen from freezing. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.35, p.127-33, 1987.
- MATTERI, R.L., PAPPAS, H., MURTHY, H.M.S., ROSER, J.F., CHANG, Y.S. Comparison of the properties of highly purified equine chorionic gonadotropin isolated from commercial concentrates of pregnant mares serum and endometrial cups. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.3, p39-48, 1986.
- MUYAN, M., ROSER, J.F., DYBDAL, N., BALDWIN, D.M. Modulation of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in cultured male equine anterior pituitary cells by gonadal steroids. **Biol. Reprod.**, v.49, p.340-52, 1993.
- PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A., BICUDO, S.D., LOPES, M.D., RAMIRES, P.R.N. Coloração espermática segundo Karras modificada pelo emprego do Barbatimão (*Strypnodendrum barbatiman*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.40, p.115-23, 1988.

- PÀPIC, Z., KATONA, G., SKRABALO, Z. The citologic identification and quantification of testicular cell subtypes. **Acta Cytol.**, v.32, p.697-706, 1988.
- PICKETT, B.W. Factor affecting sperm production and output. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Eds). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1993. p.689-704.
- PICKETT, B.W., VOSS, J.L. Management of shuttle stallion for maximum reproductive efficiency – Part 1. **J. Equine Vet. Sci.**, v.18, p.214-24, 1998.
- PICKETT, B.W., VOSS, J.L., CLAY, C.M. Management of shuttle stallions for maximum reproductive efficiency –Part 2. **J. Equine Vet. Sci.**, v.18, p.280-7, 1998.
- RAESIDE, J.I. Seasonal changes in the concentration of estrogens and testosterone in the [plasma of the stallion. **Anim. Reprod. Sci.**, v.1, p.205-12, 1979.
- RANDALL, C.F., BROMAGE, N.R., DUSTON, J., SYMES, J. Photoperiod-induced phase-shifts of the endogenous clock controlling reproduction in the rainbow trout: a circannual phase-response curve. **J. Reprod. Fertil.**, v.112, p.399-405, 1998.
- ROSER, J.F. Reproductive endocrinology of the stallion. In: SAMPER, J.C. (Ed). **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000, p.41-52.
- ROSER, J.F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. **Anim. Reprod. Sci.**, v.68, p.139-51, 2001.

ROSER, J.F., HUGHES, J.P. prolonged pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) to fertile stallions. **J. Reprod. Fertil.**, v.44, p.155-68, 1991.

ROSER, J.F., HUGHES, J.P. seasonal effects on seminal quality , plasma hormone concentrations, and GnRH induced LH response in fertile and subfertile stallions. **J. Androl.**, v.3, p.214-23, 1992.

ROSER, J.F., McCUE, P., HOYE, E. Inhibin activity in the mare and stallion. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.11, p.87-100, 1994.

SAS Institute Inc. SAS user's guide statistics, version 6.12. Cary, NC, 1996.

SAUNDERS, D.S. An introduction to biological rhythms. Glasgow: Blackie and Son, 1977.

SHARP, D.C., CLEAVER, B.D., DAVIS, S.D. Photoperiod. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1993. p.179-85.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, F., NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. p.1363-434.

SCHENK, U., SCHILL, W-B. Cytology of the seminiferous epithelium. **Acta Cytol.**, v.32, p.689-96, 1988.

SPITERI-GRECH, J., NIESCHLEG, E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis: a review. **J. Reprod. Fertil.**, v.98, p.1-14, 1993.

- SQUIRES, E.L., BERNDTSON, W.E., HOYER, J.H., PICKETT, B.W., WALLACH, S.J.R. Restoration of reproductive capacity of stallions after supression with exogenous testosterone. **J. Anim. Sci.**, v.53, p.1351-59, 1981.
- THOMPSON, D.L., PICKETT, B.W., BERNDTSON, W.E., VOSS, J.L., NETT, T.M. Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behavior and concentrations of LH and testosterone in serum. **J. Anim. Sci.**, v.44, p.656-62, 1977.
- THOMPSON, D.L., PICKETT, B.W., NETT, T.M. Effect of season and artificial photopeirod on levels of stradiol-17 $\beta$  and estrone in blood serum of stallions. **J. Anim. Sci.**, v.47, p.184-92, 1978.
- THOMPSON, D.L., PICKETT, B.W., SQUIRES, E.L., NETT, T.M. Effect of testosterone and estradiol-17 $\beta$  alone and in combination on LH and FSH concentration in blood serum and pituitary of geldings and serum after administration of GnRH. **Biol. Reprod.**, v.21, p.1231-7, 1979.
- THOMPSON, D.L., PICKETT, B.W., SQUIRES, E.L. Sexual behavior, seminal pH and acessory gland weight in geldings administered testosterone and (or) estradiol-17 $\beta$ . **J. Anim. Sci.**, v.51, p.1358-45, 1980.
- THOMPSON, D.L., JOHNSON, L., ST. GEORGE, R.L., GARZA, F. Concentrations of prolactin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in pituitary and serum of horses: effect of Sex, season and reproductive state. **J. Anim. Sci.**, v.63, p.854-60, 1986.

- TILLBROOK, A.J., CLARKE, I.J. Negative feedback regulation of the secretion and action of gonadotropin-releasing hormone in males. **Biol. Reprod.**, v.64, p.735-42, 2001.
- TUREK, F.W., VAN CAUTER, E. Rhythms in reproduction. In: KNOBILL, E., NEILL, J.D. (Eds) **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994.p.519-22.
- VALE, W., BILEZIKFRAN, L.M., RIVIER, C. Reproductive and other roles of inhibins and activins. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. (Eds). **The physiology of reproduction**. 2ed. New York: Raven Press, 1994. p.1861-71.
- VAN DER HOLST, W. A study of morphology of stallion semen during the breeding and non-breeding seasons. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.23, p.87-9, 1975.
- WINGFIELD, J.C., KENAGY, G.J. Natural regulation of reproductive cycles. In: PANG, P., SCHRERBMAN, M. (Eds). **Vertebrate endocrinology: fundamental and biomedical implications**. New York: Academic Press, 1991. v.4B, p.303-42.
- WOOD, R.I., EBLING, F.J., I'ÄNSON, H., FOSTER, D.L. Timing of neuroendocrine sexual maturity in the male lamb by photoperiod. **Biol. Reprod.**, v.45, p.82-88, 1991.
- YOUNG, K.A., NELSON, R.J. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. **Reproduction**, v.122, p.677-85, 2001.
- WOODFILL, C.J.I., ROBINSON, J.E., MALPAUX, B., KARSCH, F.J. Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in

sheep: identification of season-specific time cues. **Biol. Reprod.**, v.45, p.110-121, 1991.

ZAHN, F.S., PAPA, F.O., FERREIRA, J.C.P. Avaliação da variação sazonal de volume , motilidade, vigor, concentração, número de espermatozoides, pH e osmolaridade do sêmen de garanhões, na região de Botucatu. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, p.201-3, 2001.

ZIRKIN, B.R., AWONIYI, C., GRISWOLD, M.D., RUSSEL, L.D., SHARPE, R. Is the FSH required for adult spermatogenesis ? **J. Androl.**, v.15, p.273-76, 1994.

## 8. Resumo

Leme, D.P. *Características reprodutivas de garanhões mantidos sob luz natural ou contínua, em ambiente tropical, São Paulo*. Botucatu, 2003. 85p. Tese (Doutorado em reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

A influência da estação nas características reprodutivas de garanhões tem sido bem caracterizada nas regiões temperadas; entretanto, pouco se sabe sobre a sazonalidade de garanhões nos trópicos. Este estudo avaliou os efeitos da luz natural e da luz artificial contínua sobre as características reprodutivas de garanhões que vivem na região de Botucatu, SP, Brasil, nos períodos de maior e menor luminosidade do ano. Oito garanhões de diferentes raças e idades foram mantidos semi-estabulados por 12 meses. Um grupo (n=4) permaneceu sob luz natural e o outro (n=4) recebeu luz contínua nas baias durante à noite. As seguintes características reprodutivas foram avaliadas nos períodos de transição primavera-verão e outono-inverno: volume testicular total (VTT), sêmen, libido, concentrações séricas de FSH, LH e testosterona e citologia testicular. Neste estudo, os garanhões sob luz natural apresentaram maior VTT ( $p \leq 0,05$ ), melhor qualidade do sêmen ( $p \leq 0,05$ ), maior número de espermatozoides ejaculados ( $p \leq 0,05$ ) e menor porcentagem de células de Sertoli ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos garanhões sob luz contínua, porém, não diferiram significativamente quanto às concentrações séricas de FSH, LH e testosterona. Ambos os grupos apresentaram uma diminuição do VTT, queda na libido, diminuição das concentrações de LH e aumento significativo da porcentagem de células de Sertoli ( $p \leq 0,05$ ) no período outono-inverno. Os garanhões sob luz natural não tiveram queda no número de espermatozoides ejaculados neste mesmo período, enquanto os garanhões sob luz contínua tiveram uma evidente diminuição do número de espermatozoides ejaculados. Portanto, a avaliação do sêmen dos garanhões sob luz natural não foi suficiente para mostrar sazonalidade reprodutiva nestes animais, ao contrário das demais características que mostraram diferenças sazonais. Isto ocorreu provavelmente por uma falha na estabilização das reservas extragonadais, principalmente por serem garanhões de alta produção espermática. Os garanhões sob luz artificial contínua, considerados animais de baixa produção espermática, apresentaram queda da capacidade reprodutiva no outono-inverno, a despeito do presumível efeito estimulante da luz. Este comportamento pode ser explicado de três maneiras: (1) os animais tornaram-se refratários à luz e houve uma inevitável queda da capacidade reprodutiva; (2) o ciclo circanual endógeno persistiu, mesmo sem o efeito do fotoperíodo como marcador do tempo ou (3) estes animais já estavam adaptados para responder a outras alterações ambientais, que não o fotoperíodo, principalmente porque em Botucatu a diferença entre os períodos de máxima e mínima luminosidade no ano é de apenas 2h 49min.

**Palavras – chave:** garanhões, sazonalidade, sêmen, FSH, LH, testosterona, citologia testicular

## 9. Abstract

Leme, D.P. *Reproductive characteristics in stallions under natural or continued light in a tropical environment, Brazil*. Botucatu, 2003. 85p. Tese (Doutorado em reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

The influence of season on reproductive characteristics of stallions has been well characterized in temperate zones. However, there are very few studies about seasonality of stallions in tropical zones. This study assessed the effects of natural and prolonged long photoperiod in the reproductive characteristics of stallions that live in Botucatu, Brazil during the periods of the year with the longest and shortest day lengths. Eight stallions of different age and breeds were kept in stalls just at night for a period of 12 months. These stallions were divided into two groups: natural light (n=4) and artificial light all night long (n=4). The following characteristics were assessed during the transition periods between spring-summer and autumn-winter: total testicular volume (TTV), semen, libido, serum concentrations of FSH, LH and testosterone, and testicular cytology. Although, the stallions under natural light had increased TTV ( $p \leq 0,05$ ), better semen quality ( $p \leq 0,05$ ), higher number of sperm in the ejaculates ( $p \leq 0,05$ ) and lower percentage of Sertoli cells ( $p \leq 0,05$ ) compared with these characteristics in the stallion under continued photoperiod, there were no significant differences in serum hormone concentrations between the two groups. The two groups had similar aspects in relation to the following results: decreased TTV, along with poor libido, lower serum LH levels and a significantly higher percentage of Sertoli cells ( $p \leq 0,05$ ) during autumn-winter. The stallions under natural light had no changes in the number of sperm in the ejaculates during the same period, but the stallions under continued photoperiod showed an evident decrease of the number of sperm in the ejaculates during autumn-winter. Thus, semen evaluation was not enough to show the seasonality in stallions under natural light as it was shown by the other results. This fact could be explained by the lack of efficiency in the stabilization of extragonadal sperm reserves in those stallions that were also high sperm producing stallions. For the stallions under continued photoperiod, also considered low sperm producing stallions, there were a decrease in the reproductive capacity during autumn-winter, despite continued exposure to a presumably stimulatory photoperiod. This fact could be explained by three different manners: (1) These stallions became refractory to the stimulatory effects of continued exposure to the constant light and the decrease in the reproductive capacity ensued anyway; (2) the putative endogenous reproductive circannual cycle persisted despite the absence of photoperiod changes; or (3) these animals were already adapted to synchronize their reproductive cycles along the year according to others environment changes not using the photoperiod, mainly because Botucatu has only 2h 49min longer day light in summer than in winter.

**Key-words:** stallion, season, semen, FSH, LH, testosterone, testicular cytology.