UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL
CAMPUS DESCALVADO

JOYCE AUGUSTO MACEDO

COMPORTAMENTO DE GARANHÕES DURANTE A COLETA DE SÊMEN PRÉ E PÓS-SUPLEMENTAÇÃO COM COMPOSTOS NATURAIS E ANTIOXIDANTE

STALLIONS BEHAVIOR DURING SEMEN COLLECTION PRE AND POST-SUPPLEMENTATION WITH NATURAL COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT

Descalvado – SP
2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL

JOYCE AUGUSTO MACEDO

COMPORTAMENTO DE GARANHÕES DURANTE A COLETA DE SÊMEN PRÉ E PÓS-SUPLEMENTAÇÃO COM COMPOSTOS NATURAIS E ANTIOXIDANTE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Profa. Dra. Cynthia Pieri Zeferino
Orientadora

Profa. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi
Coorientadora

Descalvado – SP
2022

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).**

Macedo, Joyce Augusto
M121c Comportamento de garanhões durante a coleta de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidante / Joyce Augusto Macedo. -- Descalvado: Universidade Brasil, 2022.
70f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.
Orientadora: Profa. Dra. Cynthia Pieri Zeferino.
Coorientadora: Profa. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi.

1. Equino. 2. Etologia. 3. Nutracêutico. 4.Performance. 5. Reprodução. I. Título.

CDD 636.108926

UNIVERSIDADE BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

JOYCE AUGUSTO MACEDO

"COMPORTAMENTO DE GARANHÕES DURANTE A COLETA DE SÊMEN PRÉ E PÓS-SUPLEMENTAÇÃO COM COMPOSTOS NATURAIS E ANTIOXIDANTE"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Mestrado em Produção Animal** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Cynthia Pieri Zeferino

Profa. Dra. Cynthia Pieri Zeferino (presidente-orientadora)

Profa. Dra. Käthery Brennecke (UNIVERSIDADE BRASIL)

Profa. Dra. Cely Marini Melo e Oña (UFMT)

Descalvado/SP, 28 de novembro de 2022

Presidente da Banca Profa. Dra. Cynthia Pieri Zeferino

Houve alteração do Título: sim ( ) não (X):

UNIVERSIDADE BRASIL

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site http://www.universidadebrasil.edu.br, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site http://bancodeteses.capes.gov.br, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **"COMPORTAMENTO DE GARANHÕES DURANTE A COLETA DE SÊMEN PRÉ E PÓS-SUPLEMENTAÇÃO COM COMPOSTOS NATURAIS E ANTIOXIDANTE"**

Houve alteração do Título: sim ( ) não (X):

Autor(es):

Discente: **Joyce Augusto Macedo**
Assinatura: Joyce Augusto Macedo

Orientador(a): **Profa. Dra. Cynthia Pieri Zeferino**
Assinatura: Cynthia Pieri Zeferino

Coorientador(a): **Profa. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi**
Assinatura:

Data: 28/11/2022

DEDICATÓRIA

Dedicado a Arthur e Zoe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por colocar em minha vida, cada pessoa que fez parte desse processo.

À minha mãe e meu pai, meu alicerce, meu esteio e exemplos, que me fazem crer que sou capaz.

Ao meu esposo, que é meu maior incentivador, obrigada por acreditar em mim.

Aos meus filhos, que sempre serão o melhor de mim.

Às professoras Cássia e minha orientadora Cynthia pelo apoio incondicional.

Ao Médico Veterinário Gian Zanon, por possibilitar a realização do experimento no Centro de Reprodução Equina Gian Zanon/Araraquara-SP.

Ao Médico Veterinário da Empresa NovEq Saúde e Nutrição Animal Ltda, Gerson Carlos Schalch Franceschini, por fornecer o suplemento alimentar.

À Profa. Dra. Cely Marini, pela contribuição e sugestão de melhorias durante a realização do experimento.

Aos profs. do Departamento de Produção Animal, Käthery Brennecke, pelo apoio durante a realização experimental e Vando Edésio Soares, pela realização das análises estatísticas.

À discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Brasil, Bárbara Martins Duarte, pelo auxílio em todas as etapas.

Aos amigos do trabalho, aos colaboradores e a todos que de certa forma contribuíram para que eu evoluísse durante essa jornada, e a tornaram mais prazerosa e enriquecedora.

A todos os envolvidos em minha vida, o meu sincero obrigada.

“A persistência realiza o impossível.”

“O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência.”

RESUMO

O desempenho de garanhões no processamento de sêmen fora da estação reprodutiva é essencial para a otimização do período disponível dentro da gestão de uma central reprodutiva. O estudo descreveu o comportamento de garanhões durante a coleta de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes. Foram utilizados quatro garanhões adultos da raça Quarto de Milha, com pesos entre 416 a 505 kg com maturidade sexual (6 a 24 anos), durante a rotina de coleta de sêmen em central de reprodução equina privada, localizada na cidade de Araraquara, SP. O período pré e pós-suplementação consistiram em oito coletas de sêmen sucessivas, com intervalo de 48 horas. Entre o período inicial e final de suplementação (75 dias), os animais receberam 6 kg/dia de ração comercial peletizada, com suplementação (45 g do produto/dia) à base de L-carnitina (334g/kg), beta caroteno (44,5 g/kg), ácido fólico (1200 mg/kg), vitamina C (22,3 g/kg) e vitamina E (27800 UI/kg), água *ad libitum* e sal mineral a vontade. O repertório comportamental (intervalo e número) foi registrado por meio de avaliação dos vídeos gravados durante a coleta, considerando variáveis desde o manejo da higienização, monta, coleta de sêmen e término do procedimento. O modelo “quase experimento” foi utilizado no delineamento e foram realizadas comparações entre os parâmetros do repertório comportamental pré e pós-suplementação. Os dados do repertório comportamental foram avaliados por meio da comparação entre os tratamentos nos diferentes momentos e as médias das variáveis foram submetidas ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis, ao nível de 5% ($P<0,05$) de probabilidade. As repostas comportamentais foram individuais para cada garanhão e revelaram mudanças no período pós-suplementação durante o processo de coleta de sêmen, as quais estão diretamente relacionadas à performance reprodutiva e foram influenciadas pelo condicionamento dos animais conjuntamente à suplementação.

Palavras-chave: Equino. Etologia. Nutracêutico. Performance. Reprodução

ABSTRACT

The stallion performance and semen processing out of the breeding season period is essential for optimizing reproductive service and management. The study described the reproductive behavior of stallions during semen collection pre and post-supplementation with natural compounds and antioxidants. Four adult Quarter Horse stallions weighing between 416 and 505 kg and active sexual maturity (6 to 24 years) were used during the routine of semen collection in a breeding center. The experiment performed in a commercial stud farm, located in the city of Araraquara, SP. The pre and post-supplementation period consisted of eight successive semen collections, with an interval of 48 hours. Between the initial and final period (75 days), the animals received 6 kg/day of commercial pelleted feed, with supplementation (45 g of the product/day) based on L-carnitine (334g/kg), beta carotene (44, 5 g/kg), folic acid (1200 mg/kg), vitamin C (22.3 g/kg) and vitamin E (27800 IU/kg), water and mineral salt *ad libitum*. The behavioral repertoire (interval and number) was registered by evaluating the videos recorded during the collection, considering variables since hygiene management, mounting, semen collection and completion of the procedure. The study used an “Quasi- Experimental Design” and stallion behavior pre and post supplementation was compared. The behavior repertoire data was evaluated by comparing treatment in different moments and the variable means were submitted to non-parametric Kruskal-Wallis test, at the level of 5% ($P<0.05$) of probability. The individual responses of each stallion revealed changes in the post-supplementation period considering the behavior repertory during semen collection, which are related to reproductive performance and they could be influenced by conditioning and supplementation.

Keywords: Equine. Ethology. Nutraceutical. Performance. Reproduction.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Para a realização de biotecnologias reprodutivas em equinos, a coleta de sêmen é fundamental e depende do condicionamento dos garanhões, harmonia com o ambiente e equipe a qual executa o procedimento. Além disso, o desempenho de cada animal pode ser melhorado pela suplementação da dieta, a qual pode contribuir para o comportamento e, consequentemente, para o procedimento de coleta de sêmen em centrais de reprodução. No presente estudo foram observados dois períodos de coleta de sêmen em quatro garanhões dentro de uma Central privada, visando verificar mudanças no comportamento destes animais após a suplementação da dieta com e compostos naturais e antioxidantes. As repostas individuais de cada garanhão revelaram mudanças positivas no período pós-suplementação considerando comportamentos específicos (intervalo de tempo para monta, intervalo de tempo de ereção peniana e intervalo de tempo para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento) os quais são relevantes para a performance reprodutiva. Após o período de suplementação, nota-se regularidade comportamental dos garanhões, caracterizado por condicionamento do animal ao ambiente, à equipe e aos procedimentos, os quais envolveram intervenção humana e equipamentos (vagina artificial e manequim para a monta). Portanto, o período pós-suplementação revelou mudanças favoráveis no comportamento dos garanhões durante a coleta de sêmen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de coletas de sêmen nos garanhões e período de suplementação com compostos naturais e antioxidantes.....37
Figura 2 – Boxplot A) V5: intervalo de tempo (seg) para monta; B) V8: Intervalo de tempo (seg) para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento do garanhão 1..... 42
Figura 3 – Boxplot A) V5: Intervalo de tempo (seg) para monta; B) V7: Intervalo de tempo (seg) para recolhimento peniano do garanhão 2..... 46
Figura 4 – Boxplot do intervalo de tempo (seg) para recolhimento peniano (V7) do garanhão 3..... 48
Figura 5 – Boxplots A à D) V4: Intervalo de tempo (seg) para ereção peniana para os quatro garanhões..... 51
Figura 6 – Boxplot de variáveis comportamentais e dos procedimentos preparatórios precedendo a monta dos garanhões no manequim..... 53
Figura 7 – Boxplot de variáveis comportamentais e dos procedimentos durante a monta e coleta de sêmen no manequim..... 56
Figura 8 – Boxplot de variáveis comportamentais da ejaculação durante a monta e coleta de sêmen no manequim..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Repertório comportamental (média, desvio-padrão e intervalo de confiança) do garanhão 1 durante as coletas de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes.....41
Tabela 2 – Repertório comportamental (média, desvio-padrão e intervalo de confiança) do garanhão 2 durante as coletas de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes..... 44
Tabela 3 – Repertório comportamental (média, desvio-padrão e intervalo de confiança) do garanhão 3 durante as coletas de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes..... 46
Tabela 4 – Repertório comportamental (média, desvio-padrão e intervalo de confiança) do garanhão 4 durante as coletas de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes..... 49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABQM	Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de Milha
AQHA	*American Quarter Horse Association*
CL	Corpo Lúteo
COA	Coenzima A
CPTI	*Carnitine Palmitoyltransferase 1*
CPTII	*Carnitine Palmitoyltransferase 2*
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
ICSI	Injeção Intracitoplasmatica de Espermatozoides
LH	Hormônio Luteinizante
Mg	Miligrama
ROS	*Reactive Oxygen Species* (Especies Reativas ao Oxigênio)
VO	Via Oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 OBJETIVOS 19

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **19**

3 REVISÃO DA LITERATURA 20

3.1 IMPORTÂNCIA DA EQUIDEOCULTURA NA PRODUÇÃO ANIMAL 20

3.2 ASPECTOS FISIOLOGICOS E ENDOCRINOS NO GARANHÃO 20

3.3 COMPORTAMENTO SEXUAL NO GARANHÃO 23

3.3.1 Puberdade e Maturidade Sexual no Garanhão 24

3.3.2 Comportamento na Monta Natural 25

3.3.3 Comportamento na Coleta de Sêmen 27

3.4 MANEJO NUTRICIONAL E SUPLEMENTAÇÃO EM GARANHÕES 29

3.4.1 L-Carnitina 31

3.4.2 Vitamina E 32

3.4.3 Vitamina C 32

3.4.4 Beta-caroteno 33

3.4.5 Ácido Fólico 34

4 MATERIAL E MÉTODOS 36

4.1 LOCAL, ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 36

4.2 MANEJO NUTRICIONAL E SUPLEMENTAÇÃO 36

4.3 PERÍODO EXPERIMENTAL E COLETA DE SÊMEN 37

4.4 AVALIAÇÃO DO REPERTÓRIO COMPORTAMENTAL 39

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 40

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 40

6.1 REPERTÓRIO COMPORTAMENTAL INDIVIDUAL PARA OS GARANHÕES 40

6.2 REPERTÓRIO COMPORTAMENTAL REPRESENTADO POR CADA VARIÁVEL PARA OS QUATRO GARANHÕES 52

6.2.1 Comportamento dos Garanhões (n=4) e Procedimentos Preparatórios Precedendo a Monta no Manequim 52

6.2.2 Comportamento dos Garanhões (n=4) e Procedimentos Durante a Monta e Coleta de Sêmen no Manequim 54

7 CONCLUSÃO 58

REFERÊNCIAS 59

1 INTRODUÇÃO

O comportamento reprodutivo dos equinos representa a interação sócio- sexual influenciada por fatores genéticos, ambientais, nutricionais, hormonais, sensoriais, frequência de acasalamentos, receptividade, acuidade sensorial, idade, experiência prévia do indivíduo e ordem de dominância social.

De acordo com Rezende et al. (2006), em relação a ambiência, o cavalo responde a ambientes que são estressantes por meio de alterações comportamentais, além disto, a resposta fisiológica pode aumentar, quando o mesmo não consegue alterar as circunstancias, passando a expressar um comportamento estereotipado.

Estímulos visuais, táteis e circunstanciais são importantes no acasalamento (BURGER et al., 2015; SOUZA et al., 2011). Tais estímulos e comportamentos sofrem variações de acordo com manejo dos garanhões, ambiência, estação do ano e o fotoperíodo, o qual é fundamental para controle neuroendócrino na reprodução equina (SENGER, 1997; SULIMAN et al., 2020). Entretanto, alguns autores consideram os efeitos do fotoperiodo menos expressivos nos machos quando comparados aos às fêmeas (AURICH, 2011; JOHANNISSON et al., 2020).

Deste modo, garanhões são utilizados para coleta de sêmen, processamento e congelação durante períodos aleatórios do ano, não especificamente dentro da estação reprodutiva, o que proporciona otimização da biotecnologia reprodutiva em machos nesta espécie. Esta estratégia de atuação fora da estação reprodutiva, não necessariamente afetada pelo fotoperíodo, otimiza a possibilidadde de prestação de serviços nas centrais de reprodução assistida.

A coleta de sêmen, a refrigeração e a congelação têm sido cada vez mais utilizadas nas rotinas de reprodução equina, visando aumentar o rendimento dos ejaculados, os quais podem ser multiplicados pela técnica e armazenados para posterior utilização.

O uso deste material armazenado para inseminação artificial, e atualmente na realização da Injeção Intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) resulta em inúmeras vantagens para criadores de equinos, quanto a possibilidade de conservação e uso do material genético. Deste modo, machos caracterizados por alta performance reconhecida podem perpetuar sua genética nos plantéis.

Para uso da biotecnologia acima descrita, a coleta de sêmen em garanhões com uso de vagina artificial e manequim constituem etapas fundamentais para obtenção do material biológico a ser processado.

Portanto, o condicionamento desses animais às intervenções de manejo, iniciação dos mesmos nas coletas e práticas constantes, necessitam de metodologias eficientes e cautelosas quanto a abordagem dos garanhões e suas consequências em relação ao repertório comportamental.

Durante o processamento do sêmen, injúrias inevitáveis podem comprometer a qualidade do mesmo, resultando em índices de fertilidade insatisfatórios. No entanto, ferramentas voltadas a suplementação dos meios de conservação do sêmen, assim como a suplementação nutricional dos garanhões têm sido disponibilizadas pela indústria. Neste sentido, o uso de nutracêuticos na dieta otimizam a absorção dos nutrientes, os quais podem influenciar nas respostas comportamentais de garanhões (ARRUDA et al., 2010).

Tais repostas necessitam de investigação, desde a introdução dos animais nas rotinas de coleta, quando os mesmos iniciam treinamento e condicionamento ao manejo, assim como na superação de dificuldades quanto à adaptação em determinadas circunstâncias.

No entanto, estudos sobre o repertório comportamental de garanhões da raça Quarto de Milha em coleta de sêmen nas condições tropicais do hemisfério Sul fora da estação reprodutiva são necessários, sendo a literatura escassa, principalmente envolvendo o uso de compostos naturais e antioxidantes na dieta (FREITAS, 2015).

2 OBJETIVOS

O estudo observou o repertório comportamental reprodutivo de garanhões durante a coleta de sêmen em dois períodos distintos: pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes (L-carnitina, beta caroteno, ácido fólico, vitamina C e vitamina E).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do comportamento sexual de garanhões em monta dirigida durante o período que antecede a suplementação (pré-suplementação) e o período posterior a suplementação (pós-suplementação).
- Avaliação de variáveis comportamentais representadas por “intervalos de tempo” e, excepcionalmente, “frequência de movimentos” realizados pelos garanhões pré e pós-suplementação.
- Registro das variáveis comportamentais observadas nos momentos de preparação dos garanhões (higienização e condução ao manequim) e eventos pertinentes a coleta de sêmen (monta, vagina artificial e desmonta do manequim).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA DA EQUIDEOCULTURA NA PRODUÇÃO ANIMAL

Em 2020, o rebanho brasileiro de equinos foi de, aproximadamente, 5.962.126 cabeças, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor, com um rebanho de 828.296 cabeças, seguido dos estados de Mato Grosso (547.839 cabeças), Rio Grande do Sul (520.371 cabeças) e Pará (458.145 cabeças), de acordo com dados do IBGE (2022).

A indústria de cavalos se tornou extremamente diversificada e integra várias atividades divididas em: segmento rural (criação, treinamento, manutenção, lida e equitação) e segmento urbano (esportes, shows e apresentações, vendas públicas e terapia), formando assim o complexo do agronegócio, um empreendimento multimilionário (MAPA, 2016; MIRANDA et al., 2020).

A raça Quarto de Milha foi a primeira a ser desenvolvida na América, a mesma surgiu nos Estados Unidos entre o século XVII e XVIII, originários de cavalos trazidos pelos espanhóis. Estes animais foram cruzados com éguas oriundas da Inglaterra, produzindo cavalos fortes, compactos musculados, capazes de cobrir curtas distâncias, sendo mais rápidos em relação às outras raças. Atualmente, a raça é muito utilizada em esporte e competições de diversas modalidades compondo a maior associação de criadores de cavalos do mundo, a *American Quarter Horse Association* (AQHA) em conjunto com a Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de Milha (ABQM) (ABQM, 2016; SENAR, 2015).

Os cavalos desta raça são adaptáveis a inúmeras situações, transformando-se em instrumentos de força, transporte e de alta performance; caracterizados por dificuldade de superação nas provas equestres, além de melhoradores de plantel equino. Considerado o cavalo mais versátil do mundo, o Quarto de Milha é utilizado nas modalidades de conformação, trabalho e corrida (ABQM, 2016).

3.2 ASPECTOS FISIOLOGICOS E ENDOCRINOS NO GARANHÃO

A espermatogênese é o processo no qual ocorre o surgimento do gameta do sexo masculino, ocorrendo na região dos testículos, especificamente nos túbulos seminíferos. Tal processo deverá transcorrer em harmonia, de acordo com a função desempenhada pelos sistemas situados dentro do organismo, conforme a

temperatura e a proteção da barreira hemato-testicular; pois este epitélio germinativo apresenta sensibilidade (SENGER, 1997).

A sensibilidade pode ser afetada por variáveis, às quais resultam em alterações nos órgãos encarregados do processo de reprodução e, especificamente, da espermatogênese, com duração de cerca de 60 dias em equinos. Caso haja comprometimento sistêmico do animal durante este período, haverá consequências na produção espermática oriunda do ciclo afetado. Neste sentido, os órgãos do sistema reprodutivo podem sofrer degeneração e alguns distúrbios, sendo apresentados em diferentes níveis, momentâneos ou duradouros; intervindo na fertilidade do animal. Da mesma forma, a adoção de manejo nutricional suplementar com tal longevidade (período de espermatogênese) deve ser considerada, a fim de suficientemente favorecer ou não a performance reprodutiva (ARRUDA et al., 2010).

Para que os garanhões estejam aptos a apresentar bons resultados durante a coleta de sêmen, deve haver supervisão criteriosa acerca dos estímulos ambientais, como a exposição do reprodutor às éguas na fase de estro. Tal fator pode ser determinante para a performance reprodutiva e afetar parâmetros relacionados a qualidade do sêmen (JEANNERAT et al., 2017; LEMASSON et al., 2015).

A função dos órgãos reprodutivos é controlada pelo sistema neuroendócrino, incluindo grupos especializados de corpos celulares e tecidos endócrinos que secretam os mensageiros químicos e os hormônios. O sistema nervoso autônomo tem o papel de controle de função dos órgãos reprodutores, transporte de espermatozoides, ereção, emissão e ejaculação (SENGER, 1997).

O hipotálamo faz parte do diencéfalo do cérebro. Em estudos com outras espécies animais, o hipotálamo parece estar envolvido na regulação do apetite, sede, temperatura corpórea, atividade vasomotora, emoção, uso de reservas de nutrientes corporais, atividades do trato intestinal e da bexiga, estado de sono, vigília e atividade sexual; também estando relacionado ao comportamento e liberação de hormônios trópicos, sendo os mesmos essenciais para o controle da função reprodutiva. Por sua vez, a hipófise está conectada e se estende para região ventral ao hipotálamo e a adeno-hipófise, especificamente, sintetiza e libera hormônios que controlam os processos reprodutivos, tanto no garanhão, quanto na égua (MCKINNON et al., 2011; AGARWAL et al., 2014).

O hipotálamo sintetiza e libera hormônios como o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), sendo disponibilizado em rajadas curtas e pulsáteis, resultando em estimulação pulsátil das células secretoras na adeno-hipófise. A adeno-

hipófise, por sua vez, produz pelo menos seis hormônios tróficos, mas apenas alguns têm papel direto na reprodução do macho, como o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH); em resposta direta à estimulação pelo GnRH, resultando em diferentes padrões de liberação das gonadotrofinas e culminando com episódios de liberação massiva de LH (SENGER, 1997).

Nos testículos, a testosterona produzida pelas células de Leydig entram no sangue venoso, atingindo a vascularização do testículo, passando para a circulação geral e, então, se direcionando para o hipotálamo e a adeno-hipófise, que por sua vez modula a descarga de GnRH e, consequentemente, do LH (MCKINNON et al., 2011; CLAY & CLAY,1992).

Deste modo, se a concentração de testosterona que atinge o hipotálamo e a adeno-hipófise for alta, a descarga de GnRH pelo hipotálamo é suprimida e a resposta da adeno-hipófise ao GnRH disponível também é suprimida (MCKINNON et al., 2011; KEFER et al., 2009).

As interações entre os diferentes hormônios envolvidos no controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal no garanhão podem sofrer alterações de acordo com fatores de ordem ambiental, comportamental e nutricional, os quais potencialmente influenciam na harmonia do controle fisiológico e endócrino nos machos equinos (ROSER, 1995).

A harmonia deste controle é fundamental para o processo de ejaculação, constituído por três fases. Na fase da ereção, ocorre o processo de alongamento peniano e enrijecimento, quando o membro é preenchido com sangue proveniente do corpo cavernoso peniano, sendo preenchido também pelo corpo esponjoso peniano. A fase da emissão caracteriza-se por movimentação e deslocamento dos espermatozoides, por meio de fluídos no ducto deferente, na região da uretra (MCKINNON et al., 2011).

O resultado final esperado durante o processo de emissão é a ejaculação, à qual configura-se como liberação do sêmen pela região da uretra, sendo o ato de ereção do pênis, iniciado por meio dos estímulos sensoriais provenientes da glande e, também proveniente dos estímulos psíquicos, vindos do córtex cerebral (CLAY & CLAY, 1992)

O controle parassimpático ultrapassa a região sacral, localizada na coluna vertebral. Este estímulo vai da medula até os nervos esplênicos, chegando na região do pênis, superando o estímulo simpático e, consequentemente, mantém as arteríolas penianas contraídas, ocasionando dilatação das mesmas. Este mecanismo é

caracterizado pela entrada do aporte sanguíneo no pênis, especificamente na região central do corpo cavernoso e no corpo esponjoso (MCKINNON et al., 2011).

A partir desse momento os músculos extrínsecos da região peniana são contraídos e comprimidos, por meio das áreas dorsais penianas contra o arco isquiático, o que impede a volta do sangue dos corpos cavernosos situados no pênis, formando a ereção do pênis (MCKINNON et al., 2011).

O débito cardíaco prolonga-se no transcorrer do mecanismo de ejaculação, especificamente no trans e pós período ejaculatório, o que fará com que o pênis retorne ao seu formato flácido no momento em que as artérias forem contraídas devido aos impulsos simpáticos. Neste momento final, a pressão diminui por causa do efeito relaxante ocorrido na região do músculo isquiocavernoso e bulbo esponjoso (MCKINNON et al., 2011).

No processo ejaculatório, as contrações pulsáteis dos músculos, ocorridas de maneira extremamente forte, acarretam uma sequência de jatos de plasma seminal, composto por porções distintas, caracterizado por consistência gelatinosa e aquosa, e de aspecto, coloração e volume distinto (MCKINNON et al., 2011).

3.3 COMPORTAMENTO SEXUAL NO GARANHÃO

Com algumas semanas de vida, os potros apresentam comportamentos relacionados à monta, mas dificilmente estes são caracterizados por movimentos na região da pelve. Em alguns potros com três meses de vida foi observado tal comportamento, porém isto não representa algo muito significante, já os animais com certa maturidade apresentam dominância quando expostos às fêmeas, principalmente aquelas portadoras das características comportamentais do estro (MCGREEVY, 2004; FREITAS, 2005).

O animal só apresentará fertilidade eficaz e comprovada pelo menos em dois anos de vida, fase na qual ocorre a transição histológica da pré-puberdade para a fase pós-puberal, a qual ocorre em média aos 27,8 meses de idade (MCGREEVY, 2004).

Grande parte dos animais em condições livres e selvagens pode abandonar seu grupo de origem e se unir aos demais potros, os quais já passaram pela fase de maturidade. Quando houver falta de recursos em determinado lugar, o grupo também pode vir a se dividir. Em condições selvagens e naturais, os animais jovens poderão ser obrigados a se retirarem do território pelo macho dominante, em função de sua

agressividade durante períodos de reprodução da espécie (MCGREEVY, 2004; FREITAS, 2005)

3.3.1 Puberdade e maturidade sexual no garanhão

No testículo, as espermatogônias, células germinativas, assim como as células de Leydig fazem parte da espermatogênese e são estruturas importantes, embora pouco ativas no período infantil na vida do cavalo, o qual tem uma duração média de seis meses. Esta fase termina com as primeiras mudanças, prolongadas até o início do período pré-púbere, e subsequentemente com a puberdade propriamente dita. Esse período poderá ser variável nos garanhões, considerando as diferenças raciais e as datas de nascimento (MCKINNON et al., 2011; FREITAS, 2015).

Depois desta fase de puberdade, o animal dá continuidade ao seu desenvolvimento, principalmente à capacidade reprodutiva, aproximadamente entre dois a quatro anos de idade, quando o garanhão alcança a maturação sexual (MCKINNON et al., 2011).

Conforme McDonnell (2000), os garanhões que ultrapassam os 20 anos de idade diminuem libido, sendo raros os casos nos quais o garanhão exerce suas funções reprodutivas com alta performance, diminuindo a partir dos dez anos.

A posição dominante do garanhão é relacionada aos parâmetros verificados por avaliações andrológicas e mensurações séricas, dentre as quais, a testosterona pode se encontrar em altas concentrações de acordo com a idade do animal, habitat e contato com as fêmeas. A produção do plasma seminal, oriundo das glândulas acessórias, pode ser influenciada pela excitação e afetar a qualidade do sêmen. Normalmente, o animal maduro e dominante pode apresentar comportamento de agressividade por estar em atividade sexual, enquanto os demais animais em fase madura poderão desenvolver comportamento apático ou até mesmo depressivo, quando não estiverem na mesma posição do macho dominante (MCKINNON et al., 2011).

Garanhões submetidos à doma em condições de vida plantel poderão apresentar elevação da libido ao observarem outro animal de sua espécie em reprodução. Neste sentido, equinos jovens são capazes de ter seus índices de excitação elevados ao verem outros machos maduros durante o ato reprodutivo, os quais uma vez em grupo, poderão apresentar como principais características a forma

agonística de agir e as brigas dentro do mesmo habitat (MCDONNELL, 2000; FREITAS, 2015).

3.3.2 Comportamento na monta natural

As longas relações pré e trans-cortejo demonstram ser uma das características do estilo de vida dos equídeos não domesticados; as fêmeas podem ser rejeitadas pelo macho dominante, conforme o tempo permanecido em seu habitat, ou de acordo com o seu tempo de vida, idade e condições de exposição. Os estímulos transmitidos pelo olfato proporcionam alertas acerca da localização da fêmea, com a mesma fornecendo sinais auditivos e visuais para o macho (MCKINNON et al., 2011).

Os machos em liberdade entram em interação com as fêmeas em atividade sexual, por meio de substâncias de seus excrementos, durante alguns dias anteriores ao coito. Quando o macho encontra uma fêmea em estro, ele busca a atrair por meio de seu relinchar à distância, tocando o solo e demonstrando relaxamento ao se aproximar da fêmea. A égua retorna normalmente o interesse ao macho, demonstrando comportamento receptivo, o qual deve anteceder o coito. Estudos indicam que 88% das relações sexuais (montas) nas quais a fêmea aproximou-se inicialmente ao macho, o coito configurou-se como eficaz (MCKINNON et al., 2011).

Para Freitas (2005), um importante incentivo na atividade sexual efetivada pelo garanhão se dá quando a égua e o garanhão se buscam no mesmo movimento, um direcionando a cabeça para o outro, enquanto se aproximam, seguido no movimento de quadril da fêmea em direção à cabeça do cavalo.

De acordo com McDonnell (1992), algumas éguas permanecem próximas umas às outras, ou acompanham o macho, sendo que elas também seguem outras fêmeas em fase de estro. Caso a fêmea fique próxima ao macho, ela apresenta comportamento de levantar de cauda, expondo os membros posteriores, e muitas vezes abrindo os lábios vulvares em movimentos frequentes, culminando com o ato de urinar e exposição do clítoris.

As éguas que iniciam a fase do estro demonstram-se atentas ao macho, porém este comportamento muda com a aproximação do macho, podendo ser caracterizado por agressividade (FREITAS, 2005). Nos períodos em que fêmea ovula, sua receptividade muitas vezes é demonstrada de forma mais evidente, a fim de que o macho perceba o interesse. O garanhão normalmente aproxima-se da égua e realiza atos de carícias, empurrando seus membros posteriores, garupa e demonstrando de

tal forma a fase pré- copulatória. Nesta fase, o garanhão pode cheirar, lamber e dar algumas mordidas na fêmea, comportamento o qual instiga a fêmea quando direcionado à região perineal (MCDONNELL, 2000).

Estes atos pré-copulatórios são realizados durante um determinado período, fazendo com que a fêmea se posicione de modo que o macho possa montá-la. O macho, após montá-la, posiciona-se corretamente, na porção posterior da égua pelas cristas ilíacas com os membros dianteiros, enquanto sua cabeça se inclina contra o pescoço da fêmea, momento no qual normalmente o garanhão pode muitas vezes beliscar ou acessar a crina com os dentes. A monta é realizada após um ou mais impulsos de procura, os quais são marcados pelo encontro do garanhão acoplando-se à égua e firmando seus membros posteriores para garantir que estejam em uma superfície firme (FREITAS, 2005; MCDONNELL, 2000).

Estima-se que há mais ou menos sete impulsos da pelve do animal antes que o mesmo entre em estado de ejaculação, sendo que antes disso, o macho movimenta sua cauda, sinalizando que esta movimentação é responsável pela redução do lúmen uretral, durante a qual, seis a nove jatos ou emissões de ejaculação são efetuados. As movimentações sincronizadas dos membros posteriores do animal evidenciam certa elevação na respiração, seguida do inclinar da cabeça e dos arranhões efetuados na crina da fêmea. Este tempo em que a ejaculação ocorre pode durar entre 10 a 15 segundos e os machos jovens podem ejacular em menor intervalo de tempo (MCGREEVY, 2004).

Quando o ato de ejaculação cessa, o animal estará mais calmo, com sua face aparentemente relaxada, com suas orelhas inclinadas para baixo, relaxando sob a fêmea, tempo em que o pênis do animal volta ao seu estado normal sem ereção. Do momento em que o macho ejacula até sua desmontagem da fêmea, passam-se em média oito segundos. O ato de desmontagem acontece em cerca de 03 a 15 segundos, quando a fêmea se afasta do macho (MCGREEVY, 2004).

Após a cópula, o animal apresenta certos comportamentos, como cheirar a vulva da fêmea, podendo se observar o fluido da ejaculação disperso, assim como secreções provenientes da vagina da fêmea, evidências que apontam o acontecimento do coito, o qual ocorre normalmente subsequente ao reflexo de flehmen. As fêmeas e os machos se dispersam, em geral, da equipe da qual faziam parte, durante o período de acasalamento. A fase de pré-cópula, pode levar dias, porém a cópula poderá durar menos de um minuto (MCGREEVY, 2004).

O período de reprodução equina é correspondente ao fotoperíodo positivo, durante o qual fêmeas são mais incentivadas à cópula, este ocorre durante a primavera e permanece até o início do outono. Este período influencia na produção de testosterona do macho, qualidade do sêmen, desempenho da monta e frequência de introdução do pênis no genital da fêmea. As ereções do animal poderão ser prolongadas, ainda, quando o dia se demonstrar extenso (MCDONNELL, 2000).

Existem algumas variáveis, vivências pré-concebidas e alguns estímulos capazes de instigar, de forma potencial, o resultado e a qualidade da atividade sexual de um garanhão. Alguns garanhões possuem a capacidade de predileção individual, como o garanhão demonstrar interesse por éguas de pequeno porte, e também garanhões que preferem determinadas éguas pela tonalidade da pelagem (FREITAS, 2005).

Garanhões reconhecem e demarcam em média 43% das micções e defecções das éguas sexualmente ativas. Há também o comportamento do macho ao sentir o cheiro da urina da fêmea e, logo em seguida, efetuar o flehmen, reflexo efetuado com as vias aéreas nasais e deslocamento do pescoço para cima. Para McDonnell & Haviland (1995), tal comportamento poderá trazer vantagens para a passagem dos fluidos até a região do órgão vômero-nasal, o que estimula o desempenho do olfato. Estudos demonstram que a demarcação fecal e a micção podem ser importantes aos aspectos visuais e olfativos para a relação de dominância, à qual se estabelece no período de ciclicidade, ou seja, na estação reprodutiva (FREITAS, 2015).

3.3.3 Comportamento na coleta de sêmen

Os machos, por apresentarem valores financeiros consideráveis e grandes possibilidades de sofrerem lesões, têm suas interações, com a ordem de seus condutores de maneira limitada e muitas vezes reduzida, visando eliminar riscos desnecessários. Os machos reprodutores, em geral, são colocados em áreas exclusivas, isolados fisicamente ou colocados em baias individuais (MCKINNON et al., 2011; FREITAS, 2015).

De acordo com McDonnell (2000), a condição de isolamento, a qual mantêm o macho em maior quietude poderá ser anulada quando o macho for alojado em local no qual estiverem fêmeas ou próximo ao piquete de éguas, não importando a fase da estação reprodutiva, ou o nível de libido, mesmo as concentrações séricas de testosterona.

Garanhões, quando mantidos em sistemas de monta dirigida, podem apresentar maior incidência de disfunções relacionadas com baixa fertilidade e vigor reprodutivo, considerando aqueles mantidos em sistema de monta a campo (FREITAS, 2005; MCDONNELL, 2000).

Isso pode ocorrer em função da seleção dos animais reprodutores, no sentido de adotar critérios que talvez não favoreçam o alcance do status de um garanhão alocado em área com outras fêmeas constituindo um verdadeiro harém em ambiente natural. Além disto, durante a coleta de sêmen, garanhões condicionados à coleta com vagina artificial podem não exibir todas as variáveis, as quais os garanhões apresentam comumente em ambiente natural (MCDONNELL & DIEHL, 1990)

O treinamento adequado de garanhões para a monta em manequim e ejaculação em vagina artificial é parte do processo de coleta de sêmen, considerando todos os equipamentos, infraestrutura e profissionais envolvidos. Além disto, requer paciência e toda atenção voltada à segurança, tanto dos tratadores, bem como com os garanhões. A preparação dos animais, a escolha das instalações e o fornecimento de ambiente adequado são extremamente importantes para todo o processo (BRINSKO et al., 2011).

Assim, o estudo do comportamento em coleta, por meio da utilização do manequim, é importante para tornar o manejo próximo ao natural, tendo vista que o manejo inadequado da vagina artificial por parte do técnico, bem como a escolha de locais impróprios para a coleta podem provocar acidentes capazes de afetar o comportamento sexual dos garanhões e/ou lesões, limitando assim sua fertilidade (SOUZA et al., 2011).

De acordo com o repertório comportamental dos garanhões condicionados, ao adentrarem no recinto são colocados em contato com as éguas, momento no qual a exposição peniana é evidente, observando-se comportamentos típicos de aproximação, com vocalização e investigação olfatória de fezes, urina e seguidos de flehmen (MCDONNELL & DIEHL, 1990).

O garanhão deve ser conduzido de forma tranquila até a égua, afim de não a assustar e após chegar ao seu lado, o tratador deve permitir que o garanhão se aconchegue, cheire ou lamba a égua à vontade. Alguns garanhões chegarão à área de coleta desenvolvendo ereção completa. Após a ereção, é realizada a lavagem peniana constituída pela glande e pelo corpo peniano. É importante salientar que a água deve ser morna, a 37ºC, para a retirada de sujidades, sendo a secagem peniana

a etapa subsequente à qual, por meio de papel toalha, é retirado o excesso de umidade da região (MCKINNON et al., 2011).

Segundo McDonnell (2000), grande parte dos garanhões apresenta o repertório comportamental que compreende os movimentos de contração glútea, movimento de cauda e sapateamento, seguido da ejaculação entre 10 a 15 segundos, após o sexto a oitavo impulso contínuo. Também considera que, da mesma forma padronizada, tanto o ritmo, número e vigor dos movimentos durante a monta estão intimamente relacionados ao padrão ejaculatório, envolvendo o número e a sequência rítmica da contração uretral.

Najjar et al. (2010) avaliaram garanhões da raça Árabe para seleção em programas de inseminação artificial com sêmen fresco, refrigerado e criopreservado, considerando o fator maturidade sexual e a idade. Os autores observaram maior valor médio para o número de monta (1,6 *vs*. 1,2), maior intervalo de preparação para coleta de sêmen (107 *vs.* 89 segundos) e maior intervalo durante a coleta (136 *vs.* 117 segundos) ($P<0,05$) para indivíduos jovens em relação aos maiores de 15 anos. No entanto, as médias para o intervalo durante a coleta foram abaixo de 200 segundos em ambas as faixas etárias consideradas, corroborando com o estudo de NOUE et al. (1999).

Quanto ao repertório comportamental de garanhões da raça Manga Larga Marchador, Oliveira (2014) avaliou o comportamento pré-cópula em diferentes faixas etárias. O tempo de reação, tempo de latência, tempo de monta, duração total da coleta de sêmen e número de reflexos de flehmen foram analisados durante duas coletas, com intervalos de 1 hora. Foram consideradas quatro faixas etárias (2-3 anos, 4-6 anos, 7-14 anos e superiores a 15 anos), no entanto o autor não observou diferenças nas características comportamentais para as diferentes idades.

3.4 MANEJO NUTRICIONAL E SUPLEMENTAÇÃO EM GARANHÕES

A performance em garanhões é importante para o desempenho das funções específicas inerentes à aptidão em diferentes raças, assim como para a reprodução. Equídeos, envolvendo categorias desde muares, potros até garanhões, são inseridos em trabalhos e treinamentos de alta intensidade. Esses animais normalmente são também submetidos à coleta de sêmen ou monta natural, o que ocasiona exigência crescente de boas práticas nutricionais, visando atingir performance satisfatória no trabalho, esporte e reprodução (FRANCESCHINI, 2003).

Neste sentido, as biotecnologias estão atreladas diretamente às condições nutricionais as quais são oferecidas para o plantel. Dentre as biotecnologias, a preservação de gametas (espermatozoides) é uma técnica bastante utilizada na indústria equina e de grande impacto para a perpetuação de características genéticas desejadas em equinos.

A criopreservação de sêmen possibilita a conservação do germoplasma por tempo indeterminado, com possibilidade de armazenamento e uso futuro. Entretanto, a técnica promove alterações na qualidade seminal, como danos na cromatina, nas membranas e nas proteínas, afetando negativamente a funcionalidade e a sobrevivência dos espermatozoides (BARROS et al., 2016).

A criopreservação e a refrigeração levam às injúrias celulares no espermatozoide, gameta responsável pela fertilização e perpetuação do material genético. Tais alterações podem ocorrer quando as membranas lipídicas são rompidas, trazendo como consequência a deficiência nas atividades desempenhadas pela mitocôndria (AGARWAL et al., 2014).

O processo de criopreservação leva também ao aumento de espécie reativas ao oxigênio (*ROS*), o que influencia negativamente na viabilidade espermática em várias espécies, assim como nos equinos. Neste sentido, a escassez de antioxidantes durante o processo de criopreservação é caracterizada por maior vulnerabilidade celular e presença de lesões celulares peroxidativas, uma vez que os espermatozoides possuem ácidos graxos poli-insaturados em abundância, o que resulta em apoptose, rápida perda de motilidade e morte celular (BERLINGUER et al., 2017).

Para a superação dessas injúrias celulares, estratégias nutricionais vêm sendo utilizadas como alternativas para amenizar as alterações inevitáveis no processamento do sêmen, atendendo as demandas das biotécnicas da reprodução. Dentre tais estratégias nutricionais, a indústria tem disponibilizado os nutracêuticos, que são suplementos alimentares os quais visam otimizar o uso de nutrientes por vias metabólicas, com o objetivo de promover o desempenho reprodutivo dos animais (ARRUDA et al., 2010).

Estudos acerca da inserção de aditivos alimentares, em especial os nutracêuticos, na rotina dos equinos são abordados na literatura há décadas, considerando o potencial dos mesmos com relação à aspectos como, amenização do comprometimento do espermatozoide, desde alterações na membrana celular até anormalidades encontradas no DNA dessas células (STRADAIOLI et al., 2004).

Nutracêuticos incluem alimentos de origem vegetal e seus subprodutos, minerais e vitaminas (KO & SABANEGH, 2014) e, dentre os principais utilizados na reprodução dos machos, encontra-se a L-carnitina (FREITAS, 2015).

3.4.1 L- Carnitina

A L-carnitina é sintetizada no fígado, rim e cérebro por meio da conversão dos aminoácidos essenciais lisina e metionina (HULSE et al., 1978; JEULIN et al., 1994). Esta atua no metabolismo do espermatozoide, fornecendo energia para motilidade, maturação e espermatogênese completa. Além disso, as carnitinas também exercem propriedades antioxidantes, por meio da proteção contra a produção de espécies reativas ao oxigênio (*ROS*), além de reparação (AGAWAL & SAID, 2004).

A L-carnitina tem como função, dentro do metabolismo do espermatozoide, prover a quantidade necessária de energia, agindo positivamente na motilidade, em que ocorre a maturação dos espermatozoides e o processo de espermatogênese. Reconhece-se que a carnitina é uma composição essencial na ocorrência dos processos de geração energética, este composto age como modulador da oxidação dos ácidos graxos presentes nas mitocôndrias. Neste processo de geração de energia, a carnitina deve agir junto de acetiltransferases de cadeias longas que dependem do composto carnitina, sendo eles intitulados também como palmitotransferases (*Carnitine Palmitoyltransferase 1; CPTI* e *Carnitine Palmitoyltransferase 2;* CPTII) (ARRUDA et al., 2010).

A levocarnitina também atuará no transporte de ácidos graxos de cadeia longa, passando pela membrana, chegando até a região interior em que está situada a matriz da mitocôndria. No andamento deste processo, a beta oxidação irá ocorrer na molécula de gordura, gerando picos de energia que serão repassadas para o organismo. A levocarnitina ainda induz a retirada dos grupos formados pelo acil da mitocôndria, o que pode ocasionar em melhora na compatibilidade entre a coenzima A (CoA) livre/acetilCoA; elevando ainda os efeitos metabólicos da gordura e reduzindo a prevalência das reações tóxicas provocadas pela concentração da substância no organismo (AGARWAL & SAID, 2004).

A dose de 10 a 15 g de L-carnitina /dia, administrada via oral (VO) foi sugerida pela literatura, sendo escassas as informações recentes sobre doses eficientes quanto ao sistema reprodutivo (LIMA, 2003).

Estudos apresentaram como resultados relevantes que a levocarnitina provoca melhorias na motilidade dos espermatozoides avaliados *in vitro*, também apresentando função crioprotetora (AGARWAL & SAID, 2004).

3.4.2 Vitamina E

A vitamina E (ý-tocoferol) desenvolve papel essencial no desempenho metabólico, ativando ações antioxidantes, de modo que a degradação peroxidativa lipídica nas membranas das células e a origem de radicais livres que afetam sua estrutura poderão ser prevenidos, além de otimizar a atividade de outros antioxidantes. Diante disto, o uso da vitamina E possibilita a diminuição das consequências causadas pela toxicidade ocasionada pela presença de radicais livres dentro das células. Os efeitos da vitamina E também se voltam para a proteção dos lipídios situados na região da membrana eritrocitária, na qual ocorre a reação da peroxidação, impedindo que a membrana seja destruída (YONEZAWA et al., 2015).

Para que lesões oxidativas sejam prevenidas, a vitamina E constitui-se como importante objeto de estudo, protegendo o sistema cardíaco do animal contra as situações deletérias decorrentes do exercício físico agudo (YONEZAWA et al., 2015).

A ocorrência de algumas lesões pode estar relacionada com o estado da membrana plasmática, quanto aos dados referentes à complexos, os quais contém as propriedades da hidrólise com a vitamina E, assim como com ácidos graxos livres situados na membrana plasmática. Há efetividade quando os radicais peroxil são removidos, pois os efeitos em cadeia são bloqueados, impedindo a presença dos radicais livres dentro da membrana plasmática (VIRGINI et al., 2011).

De acordo com Zeyner et al. (1999), os tocoferóis são solúveis em gordura e solventes lipofílicos, sendo sua absorção aumentada com alimentação enriquecida com gordura. Cavalos suplementados com óleo de soja recebendo 1000 mg/dia, por meio de mistura mineral mostraram resultados de aumento na concentração de vitamina E no sangue. Cavalos suplementados com 1725 mg/dia de vitamina E apresentaram concentrações elevadas no plasma, enquanto a alimentação basal foi à base de forragem.

3.4.3 Vitamina C

A vitamina C, ou ácido ascórbico, se constitui em importante antioxidante extracelular. Por ser hidrossolúvel, apresenta capacidade de se dissolver na água, e também atua na remoção dos radicais hidróxilo, superóxido e peróxido de hidrogênio. Esta vitamina tem ainda ação no processo de reciclagem da vitamina E, com relevante característica oxidativa (KEFER et al., 2009).

Quando a vitamina C está presente no organismo de coelhos ou de seres humanos, as propriedades do sêmen e seus respectivos índices de testosterona podem apresentar resultados mais satisfatórios, em termos de espermatozoides com estruturas morfologicamente aceitáveis e satisfatórias. Isto porque a vitamina C, em função de sua ação antioxidante, age no epidídimo, de forma a conferir proteção às membranas celulares. Equinos, assim como outros mamíferos, sintetizam a vitamina C no fígado, a partir de glicose. Em equinos a dose recomendada é de aproximadamente 72 g/dia (ALAWAD et al., 1994).

De acordo com o estudo de Sonmez et al. (2005), equinos suplementados com vitamina C na dieta não apresentaram maiores índices relativos ao peso corporal, além do peso dos testículos, epidídimo, vesículas seminais e próstata. Entretanto, as concentrações de vitamina C nas áreas teciduais e no plasma do sangue foram maiores, o que pode ter contribuído com menores concentrações de peroxidação lipídica.

3.4.4 Beta-caroteno

O beta-caroteno atua como precursor da vitamina A, além de atuar na produção de esteroides, sendo utilizado como antioxidante. Caracteriza-se como vitamina lipossolúvel, sendo a gordura necessária ao processo de manutenção do epitélio presente nos canais, nas cavidades e nas regiões externas. Além disto, atua na manutenção das membranas gastrointestinais, mucosas, trato urinário e pele.

Tal vitamina possui particularidades quanto à atuação fisiológica e é fundamental no desempenho dos tecidos epiteliais, dos órgãos reprodutivos. Em machos, o beta-caroteno pode estar associado às vitaminas B e C, de forma a atuar positivamente na capacidade reprodutiva, agindo como protetor do epitélio testicular, além da libido e da performance sexual (maior volume e quantidade de esperma) (ARIKAN & RODWAY, 2000).

Pesquisas evidenciam que quando um animal apresenta deficiência de beta-caroteno no organismo, os túbulos seminíferos apresentam somente as células de

sertoli, espermatogônia e poucos espermatócitos. A falta dessa vitamina ocasiona a deficiência das células germinativas, necessárias ao processo de espermatogênese.

De acordo com estudos de depleção-repleção em cavalos na fase de crescimento, a ingestão mínima de 17 a 22 UI vitamina A/kg peso vivo/dia é necessária para evitar cegueira. Em ratos foi relatada a quantidade mínima de 51 a 66 UI/kg peso vivo/dia, como necessária ao armazenamento adequado nos tecidos (MCDONNELL, 2000).

3.4.5 Ácido Fólico

O ácido fólico, forma sintética do folato, é eficiente na desoxidação dos radicais livres e, assim, pode ser considerado um antioxidante. Há evidência científica de sua atuação de forma isolada, ou em associação com as vitaminas e minerais. Assim, o ácido fólico, o zinco e as cobalaminas se complementam e atuam sinergicamente nas vias metabólicas potencializando seus efeitos (BARROS et al., 2016).

Apesar de seu caráter solúvel em água, o ácido fólico inibe a peroxidação lipídica e protege a membrana celular e/ou DNA dos danos dos radicais livres (SILVA, 2011). Atua como coenzima em diversas reações de transferência de carbono e na biossíntese de nucleotídeos essenciais para síntese de DNA, RNA e produção de proteína. É importante destacar que a síntese de DNA é fundamental para a espermatogênese, o que comprova a atuação do ácido fólico nesse processo reprodutivo (MAIA, 2009).

O ácido fólico pode ser empregado no tratamento da subfertilidade, com possível efeito benéfico. Barros et al. (2016) observaram que a suplementação (5000 µM e 10000 µM) de ácido fólico diretamente no pool de sêmen foi benéfica para a motilidade espermática do sêmen de ovinos. Imhof et al. (2011) observaram que homens inférteis tratados durante três meses com micronutrientes, dentre eles, o ácido fólico, apresentaram aumento significativo na concentração, motilidade (progressiva e total) e porcentagem de morfologia normal dos espermatozoides.

Maia (2009) relatou que o uso oral diário de ácido fólico (5 mg), associado a outros micronutrientes (selênio e zinco), por um período de 90 dias não melhorou a concentração e a motilidade, apenas a morfologia dos espermatozoides. Segundo o autor, a redução do número de espermatozoides anormais poderia diminuir também a quantidade de *ROS* no sêmen. Desta maneira, sêmen composto por menor quantidade de *ROS* e maior quantidade de antioxidante reduziria os danos

provocados pelos radicais livres nas biomoléculas; no entanto a atividade mitocondrial dos espermatozoides pós-descongelados não apresentou diferença significativa, porém, observou-se maior número de mitocôndrias íntegras.

Enfim, a capacidade reprodutiva dos equinos está diretamente relacionada ao manejo nutricional. O fornecimento de dieta de qualidade associada à suplementação com compostos naturais e antioxidantes tem o potencial de favorecer respostas positivas durante as coletas de sêmen em garanhões, embora estudos a cerca desta afirmativa sejam necessários.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL, ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo é parte integrante do projeto de maior complexidade, intitulado “Ambiência, comportamento e parâmetros espermáticos em garanhões submetidos à suplementação com L-carnitina”, sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), nº 1.900.024, Universidade Brasil.

As observações do repertório comportamental dos garanhões foram realizadas no Centro de Reprodução de Garanhões Gian Zanon, haras comercial localizado na cidade de Araraquara, SP.

Os garanhões utilizados como doadores de sêmen foram da raça Quarto de Milha, com pesos entre 416 a 505 kg e idades de maturidade sexual ativa, com variações de 6 a 24 anos. Éguas em cio, alojadas na central, foram utilizadas somente para estímulo dos machos no momento da coleta do sêmen com o manequim.

Os garanhões permaneceram em baias individuais de alvenaria, com área média de 16,83 m^2, forrada com cama de serragem. Em um período de três a quatro vezes por semana, durante duas horas cada, foram soltos em piquetes de Tifton 68, de dimensões de 1500m^2.

Foi utilizado o delineamento experimental “quase experimento”, por amostras pareadas dependentes, com quatro garanhões que receberam suplementação à base de compostos naturais e antioxidantes, sendo os mesmos coletados antes e após o período de suplementação.

4.2 MANEJO NUTRICIONAL E SUPLEMENTAÇÃO

Em relação à alimentação, durante todo o período experimental cada garanhão recebeu 6 kg/dia de ração comercial peletizada, à base de milho integral moído, aveia laminada, melaço de cana e farelos de soja, trigo e gérmen de milho, distribuídos em três períodos de fornecimento. Para complementação da dieta foi oferecido feno de Tifton, além de sal mineral e água *ad libitum*.

O período de suplementação compreendeu 75 dias, e para tanto, cada garanhão recebeu na primeira refeição do dia, pela manhã, 45 g do produto (suplemento nutricional Supramax®, Noveq Ltda, Descalvado, SP) na forma de sachê

em pó colocado sobre a ração peletizada. O suplemento utilizado consiste em compostos naturais e antioxidantes: L-carnitina (334g/kg), beta caroteno (44,5 g/kg), ácido fólico (1200 mg/kg), vitamina C (22,3 g/kg) e vitamina E (27800 UI/kg).

4.3 PERÍODO EXPERIMENTAL E COLETA DE SÊMEN

O experimento foi desenvolvido durante dois períodos, com coletas de sêmen sucessivas em momentos antecedentes à estação reprodutiva, de acordo com o fotoperíodo. As atividades de coleta de sêmen iniciaram no mês de abril e foram finalizadas no mês de agosto de 2019, sendo a suplementação com compostos naturais e antioxidantes realizada durante 75 dias nos meses de junho e agosto de 2019. Durante o período de suplementação não foram realizadas coletas de sêmen, havendo o retorno às coletas após a finalização da suplementação (Figura 1).

O período pré-suplementação foi de oito dias de coleta de sêmen. Desta forma, os garanhões foram submetidos à etapa de nivelamento biológico (quatro coletas, a cada 48 horas), para o processo de esgotamento das reservas espermáticas extragonadais. Após este procedimento, foi realizada a etapa de coleta do sêmen para congelação, consistindo também em quatro coletas, a cada 48 horas. O período pós-suplementação totalizou oito dias de coleta de sêmen, seguindo os procedimentos da fase pré-suplementação (Figura 1).

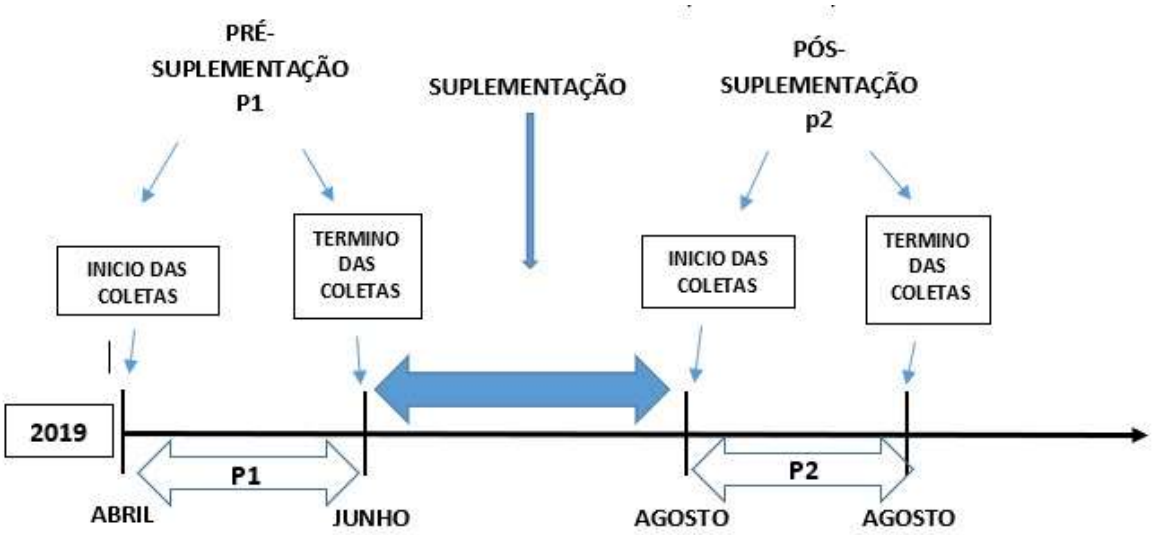


Figura 1 – Fluxograma de coletas de sêmen nos garanhões e período de suplementação com compostos naturais e antioxidantes.

P1 e P2: 8 coletas sucessivas em cada período com intervalo de 48 horas. Suplementação (75 dias): fornecimento da dieta à base de compostos naturais e antioxidantes (Supramax® Noveq Ltda, Descalvado, SP), em forma de pó (sachê), uma vez ao dia (manhã), junto à ração peletizada.

Antecedendo o momento da coleta de sêmen foi procedida a lavagem do pênis e do prepúcio com água morna 37°C e secagem (BRINSKO et al., 2011), com posterior condução do garanhão até o manequim convencional, o qual encontrava-se posicionado em área de piso emborrachado, localizado a 3 metros do laboratório, no qual as análises de sêmen foram realizadas.

A condução do garanhão até a sala de coleta foi realizada de forma sistemática por meio das etapas descritas a seguir:

1) Garanhão abordado dentro da baia para colocação do cabresto e guia, sendo removido do galpão de alojamento e direcionado até a área de coleta de sêmen.
2) Exposição do garanhão à fêmea no cio, localizada dentro da área de coleta em um tronco de contenção de equinos.
3) Observação das reações comportamentais até o momento da ereção peniana e manutenção da mesma para início dos procedimentos de higienização (lavagem e secagem).
4) Condução do garanhão até o manequim e colocação da vagina artificial ao redor do pênis, com temperatura, peso e preparação adequada (temperatura da vagina artificial variando entre 42°C à 48°C, de acordo com a demanda e condicionamento do animal) (BRINSKO et al., 2011).
5) Observação dos movimentos realizados durante a monta e desmonta, com registro cronológico do repertório comportamental por câmera acoplada a dispositivo móvel celular (Samsung, modelo SM-A107 M/DS, Galaxi A 10s).
6) O posicionamento da câmera em relação ao animal, para o registro durante a monta foi realizado com visualização do posterior para avaliação dos movimentos que sinalizaram a ejaculação, sendo os vídeos arquivados de acordo com o dia, mês e horário e identificação do animal.
7) A filmagem foi realizada desde a chegada do animal na área de coleta até após a desmonta do manequim, observando-se o momento de recolhimento peniano dentro do prepúcio e direcionamento do animal para a baia.

4.4 AVALIAÇÃO DO REPERTÓRIO COMPORTAMENTAL

As observações dos comportamentos dos garanhões, constituindo o repertório comportamental foram realizadas nos momentos pré e pós-suplementação para cada garanhão. Os momentos de coleta registrados e avaliados foram sucessivos e divididos em: período inicial de nivelamento biológico basal e período de coleta de sêmen para congelação.

O repertório comportamental considerou variáveis desde o manejo da higienização, monta, coleta de sêmen e desmonta, caracterizando o término do procedimento.

As observações do repertório comportamental (SOUZA et al., 2011) foram registradas por meio de gravações de vídeos, os quais foram posteriormente revistos e submetidos a avaliação das reações do animal de acordo com o cronômetro da gravação e registrados em minutos e posteriormente em segundos. Algumas variáveis como movimentos foram registradas e representadas por número de movimentos dentro de um determinado período de tempo.

Para o presente estudo foram registradas dez variáveis (V), referentes ao comportamento dos garanhões durante a coleta de sêmen, enumeradas abaixo:

V1: Intervalo de tempo para exposição do pênis do garanhão ao chegar na sala de coleta.

V2: Intervalo de tempo para lavagem do pênis e abordagem da glande para remoção do smegma (intervenção humana para higienização).

V3: Intervalo de tempo para secagem do pênis (intervenção humana para higienização).

V4: Intervalo de tempo para ereção do pênis, desde o início da lavagem até a desmonta do manequim.

V5: Intervalo de tempo para monta do garanhão no manequim (subida e descida).

V6: Intervalo de tempo entre a colocação e remoção da vagina artificial durante a coleta de sêmen (intervenção humana).

V7: Intervalo de tempo para recolhimento do pênis no prepúcio, após a desmonta.

V8: Intervalo de tempo para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento.

V9: Número de contração glútea, movimento de cauda e sapateamento.

V10: Intervalo de tempo de espera dos garanhões, após o término da secagem do pênis até a monta no manequim.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O presente estudo adotou o modelo “quase experimento” (DINARDO, 2010), o qual baseia-se no delineamento sem distribuição aleatória dos animais nos tratamentos e sem grupo-controle. A comparação entre as condições de pré e pós tratamento (suplementação) foi realizada nos mesmos animais.

Os dados do repertório comportamental foram avaliados por meio da comparação entre os tratamentos nos diferentes momentos, sendo submetidos às prerrogativas de normalidade, homogeneidade de variância e análise de resíduo. As médias das variáveis foram comparadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, ao nível de 5% ($P<0,05$) de probabilidade. Todas as análises foram efetuadas com o programa computacional Statistica, versão 12.0 (STATSOFT, Inc., 2014).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 REPERTÓRIO COMPORTAMENTAL INDIVIDUAL PARA OS GARANHÕES

Nas Tabelas 1 a 4, abaixo, são apresentados os resultados do repertório comportamental de cada garanhão, durante as coletas de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes. Seguem as Figuras 2 a 5 (gráficos do tipo boxplot) para os resultados significativos do repertório comportamental.

6.1.1. Garanhão 1

Para o garanhão 1 (Tabela 1) o intervalo de tempo para secagem (V3; P= 0,0037), para monta (V5; P=0,0458) e para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento (V8; P=0,0321) foram superiores no período pós-suplementação em relação ao período pré-suplementação. No entanto, o intervalo de tempo de espera dos garanhões para coleta pós-higienização (V10; P=0,0412) foi menor no período pós-suplementação. As demais variáveis descritas na Tabela 1 não diferiram ($P\geq0,05$).

TABELA 1 – Repertório comportamental (média, desvio-padrão e intervalo de confiança) do garanhão 1 durante as coletas de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes.

Variáveis[1]	Suplementação				Valor do teste	P[4]
	Pré		Pós			
	Média ±DP[2]	IC[3]	Média ±DP[2]	IC[3]		
V1	70,0±15,3[a]	36,9-103,1	79,7±16,4[a]	44,4-115,1	0,09	0,7679
V2	53,3±13,7[a]	23,6-82,9	51,6±14,7[a]	19,9-83,2	0,15	0,6964
V3	32,6±11,0[a]	8,9-56,4	101,0± 11,8[b]	75,6-126,4	8,40	0,0037
V4	91,0±17,0[a]	54,2-127,8	95,3±18,2[a]	56,0-134,6	0,29	0,5885
V5	37,1±10,2[a]	15,1-59,2	56,4±10,9[b]	32,9-80,0	3,99	0,0458
V6	31,5±12,0[a]	5,5-57,5	46,6±12,9[a]	18,8-74,3	0,60	0,4383
V7	29,8±15,6[a]	0,0-63,4	75,4±16,6[a]	39,5-111,4	3,74	0,0532
V8	26,3±12,9[a]	0,0-54,1	56,3±13,8[b]	26,5-86,1	4,59	0,0321
V9	32,5±15,3[a]	0,0-65,5	36,6±16,3[a]	1,3-71,8	0,87	0,3516
V10	153,9±47,8[b]	50,6-257,1	64,3±51,1[a]	0,0-174,7	4,17	0,0412

[1]Todas as variáveis de tempo descritas estão representadas por segundos, exceto V9 referente ao número de movimentos. Variáveis: V1=Intervalo de tempo para exposição do pênis; V2= Intervalo de tempo para lavagem do pênis; V3= Intervalo de tempo para secagem do pênis; V4=Intervalo de tempo para ereção do pênis; V5= Intervalo de tempo para monta do garanhão; V6=Intervalo de tempo de vagina artificial; V7=Intervalo de tempo para recolhimento do pênis; V8= Intervalo de tempo para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento; V9=Número de contração glútea, movimento de cauda e sapateamento; V10=Intervalo de tempo de espera dos garanhões para a monta. [2]DP=desvio-padrão. [3]IC=intervalo de confiança, a 95%. [4]P= probabilidade de significância, ao nível de 5%, pelo teste de Kruskal-Wallis. [a, b]: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis (P≥0,05).

O garanhão 1 apresentou no período pós-suplementação maiores intervalos de tempos médios de monta (Figura 2A) e de contração glútea, movimento de cauda e sapateamento (Figura 2B) em relação ao pré-suplementação.

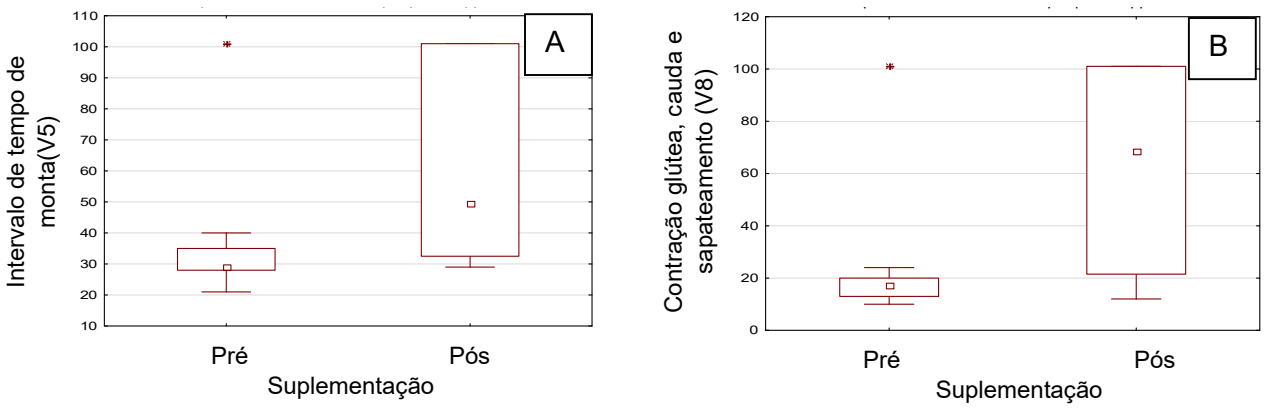


Figura 2. Boxplot A) V5: intervalo de tempo (seg) para monta; B) V8: Intervalo de tempo (seg) para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento do garanhão 1. Medianas (quadrados dentro das caixas). **outliers*

Vale salientar que o garanhão 1 foi um animal introduzido na central um mês antes do início do período experimental, com seis anos de idade e sendo condicionado durante o experimento às coletas de sêmen sucessivas. Tal fato leva a refletir sobre as reações diferenciadas deste garanhão diante das condutas adotadas e dos comportamentos registrados durante a preparação (higienização) e coleta de sêmen.

Considerando as diferenças entre as reações comportamentais de garanhões em habitat natural (MCDONNELL, 2000) e garanhões condicionados à monta dirigida no manequim, a evolução do repertório comportamental observado neste caso é justificável para o garanhão 1 em questão.

De acordo com McDonnell (2000), garanhões que cobrem a campo apresentam vocalização, cheiram, lambem, dão leves mordidas e apresentam reflexo de flehmen. Grande parte das copulas é precedida de uma ou mais montas sem ereção (TAROUCO, 2004)

No entanto em montas dirigidas, quanto maior tempo em cima da fêmea, maior o risco de danos, tanto aos animais, quanto aos manipuladores. No caso do garanhão 1, o condicionamento e a assimilação dos estímulos o deixaram mais confortável no período pós-suplementação, possivelmente associado ao fornecimento da suplementação, em conjunto ao condicionamento e familiarização, o que resultou notoriamente em maior facilidade de manipulação para coleta. Este achado pode explicar o maior tempo de monta no período pós-suplementação, assim como o maior intervalo de secagem peniana, o qual faz parte da preparação do animal com intervenção humana direta.

Geralmente garanhões são treinados sem lavagem e secagem, esse manejo acaba sendo introduzido quando o animal já está familiarizado com o ambiente, com os manipuladores e os equipamentos (MCKINNON et al., 2011).

O intervalo de tempo de espera dos garanhões para coleta pós-higienização (V10; P=0,0412) foi menor no período pós-suplementação. O que sugere que o animal estava mais rapidamente pronto a realizar a monta, sendo este aspecto possivelmente relacionado a sua maior segurança e sensibilidade à presença da fêmea e excitação suficiente, tornando possível conduzi-lo ao manequim mais rapidamente.

O garanhão permaneceu mais tempo no manequim desde o momento de subida até a descida e levou, consequentemente, maior tempo para realizar o mesmo número de movimentos. Ou seja, executou a monta e os movimentos de forma mais lenta e prolongada, após ter sido manipulado para higienização, representado pelo intervalo de tempo para secagem (V3; P=0,0037), o qual se deu de forma mais lenta, podendo sugerir maior adaptação ao procedimento, como representado pelas diferenças entre as médias pré e pós-suplementação (Tabela 1). Da mesma forma, outras variáveis mostraram-se superiores quanto ao intervalo observado no período pós-suplementação, como o intervalo de tempo para monta do garanhão (V5; P=0,0458) e o intervalo de tempo para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento (V8; P=0,0321).

No pós-suplementação, os intervalos maiores tanto para intervenção humana (secagem) quanto para o comportamento do próprio do garanhão no manequim (maior permanência) podem ter resultado de maior adaptação à coleta. Neste sentido, observou-se também neste período, tendência de maior tempo para recolhimento do pênis dentro do prepúcio (V7; 29 *vs*. 75 segundos; P=0,053), sugerindo respeito ao tempo de relaxamento e desmonta por parte dos envolvidos na coleta e segurança do animal dentro da infraestrutura utilizada.

As consequências das variações comportamentais pré e pós-suplementação nos parâmetros observados podem ter influenciado nas características do ejaculado, embora não façam parte do escopo deste estudo. O volume total do ejaculado, volume do gel, volume de sêmen e concentração podem ter sofrido variações resultantes deste comportamento adaptativo.

6.1.2 Garanhão 2

Em relação ao garanhão 2 (Tabela 2) as variáveis intervalo de tempo de ereção (V4; P=0,0123); tempo de monta (V5; P=0,0424); tempo de vagina artificial (V6; P=0,038) e tempo de recolhimento peniano (V7; P=0,0406) apresentaram diferenças entre o período pré e pós-suplementação.

O garanhão 2 apresentou no período pós-suplementação maior tempo médio de ereção, entretanto, menor intervalo de tempo de monta, de tempo de vagina artificial e de tempo de recolhimento peniano em relação ao pré-suplementação. As demais variáveis descritas na Tabela 2 não diferiram (P≥0,05).

TABELA 2 – Repertório comportamental (média, desvio-padrão e intervalo de confiança) do garanhão 2 durante as coletas de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes.

Variáveis[1]	Suplementação				Valor do teste	P[4]
	Pré		Pós			
	Média ±DP[2]	IC[3]	Média ±DP[2]	IC[3]		
V1	62,9±14,8[a]	31,1-94,6	51,3±14,8[a]	19,5-83,0	1,44	0,2303
V2	61,3±11,2[a]	37,2-85,3	22,6±11,2[a]	0,0-46,7	2,89	0,0893
V3	59,3±11,5[a]	34,6-83,9	13,5±11,5[a]	0,0-38,2	3,82	0,0506
V4	87,1±18,8[b]	46,8-127,5	165,6±18,8[a]	125,3-206,0	6,27	0,0123
V5	60,5±6,5[a]	46,6-74,4	43,3±6,5[b]	29,3-57,2	4,12	0,0424
V6	55,6±7,3[a]	39,9-71,3	30,5±7,3[b]	14,8-46,2	4,31	0,0380
V7	66,5±16,3[a]	31,6-101,4	29,1±16,3[b]	0,0-64,1	4,19	0,0406
V8	47,3±8,5[a]	28,9-65,6	22,5±8,5[a]	4,2-40,8	1,13	0,2884
V9	39,8±9,5[a]	19,5-60,0	19,8±9,5[a]	0,0-40,0	0,13	0,7209
V10	68,1±16,8[a]	32,0-104,2	43,4±16,8[a]	7,3-79,5	2,14	0,1439

[1]Todas as variáveis de tempo descritas estão representadas por segundos, exceto V9 referente ao número de movimentos. Variáveis: V1=Intervalo de tempo para exposição do pênis; V2= Intervalo de tempo para lavagem do pênis; V3= Intervalo de tempo para secagem do pênis; V4=Intervalo de tempo para ereção do pênis; V5=Intervalo de tempo para monta do garanhão; V6=Intervalo de tempo de vagina artificial; V7=Intervalo de tempo para recolhimento do pênis; V8=Intervalo de tempo para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento; V9=Número de contração glútea, movimento de cauda e sapateamento; V10=Intervalo de tempo de espera dos garanhões para a monta. [2]DP=desvio-padrão.

[3]IC=intervalo de confiança, a 95%. [4]P= probabilidade de significância, ao nível de 5%, pelo teste de Kruskal-Wallis. [a, b]: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis (P≥0,05).

No garanhão 2, as variáveis V3 (P=0,0506), V5 (P=0,0424), V6 (P=0,0380) e V7 (P=0,0406) foram representadas por menor tempo no período pós-suplementação. Este garanhão, possivelmente, melhor condicionado na central, associado ao efeito positivo da suplementação, revelou menor tempo na execução dos procedimentos, o que pode ser favorável aos parâmetros espermáticos, quanto ao volume e concentração. Ionata et al. (1991) relatam que a ejaculação mais rápida resulta, consequentemente, em menor volume de gel e volume de sêmen, o que favorece o processamento do mesmo. No caso deste garanhão, a resposta ao tratamento foi positiva quanto à obtenção de ejaculado, no que diz respeito ao processamento satisfatório. De acordo com McDonnel (2000), o volume e a composição das frações ejaculatórias variam entre garanhões.

McKinnon et al. (2011) observaram que ao adentrarem no recinto, os garanhões familiarizados e condicionados são estimulados não sexualmente, remetidos pela memória do aprendizado por experiências frequentes, permitindo manipulação tranquila e mais rápida.

A variável intervalo de tempo para ereção do pênis (V4) obteve maior tempo no período pós-suplementação, podendo este resultado ter sofrido influência, tanto da suplementação, quanto do condicionamento do garanhão 2, aumentando o conforto e a libido, resultando em mudanças favoráveis ao seu desempenho reprodutivo.

O garanhão 2 apresentou no período pós-suplementação menor intervalo de tempo para monta (Figura 3A) e menor intervalo de tempo para recolhimento peniano (Figura 3B) em relação ao período pré-suplementação e maior intervalo de tempo para ereção peniana (Figura 5B).

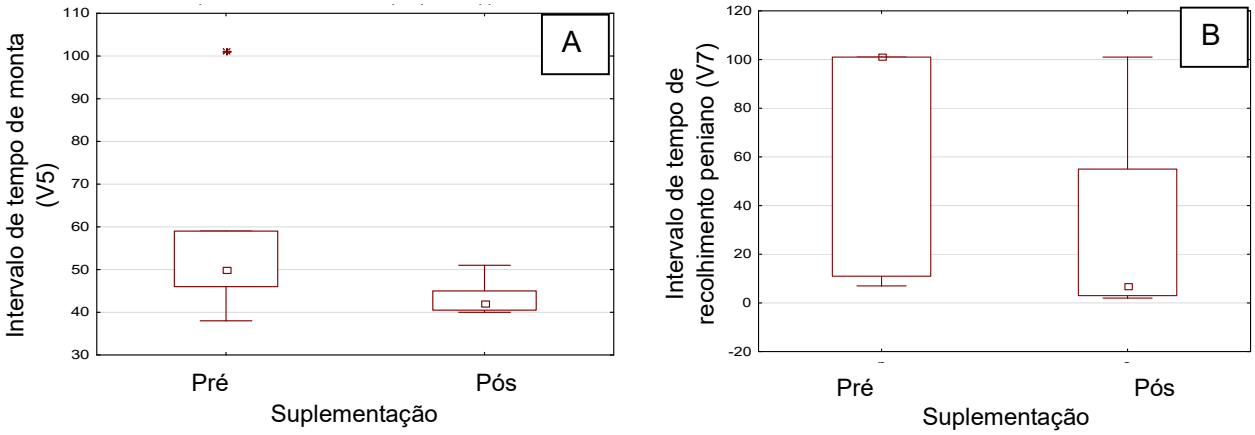


Figura 3. Boxplot A) V5: Intervalo de tempo (seg) para monta; B) V7: Intervalo de tempo (seg) para recolhimento peniano do garanhão 2. Medianas (quadrados dentro das caixas). **outliers*

6.1.3 Garanhão 3

Em relação ao garanhão 3 (Tabela 3), as variáveis tempo de lavagem (V2; P=0,0052); tempo de ereção (V4; P=0,0123) e tempo de recolhimento peniano (V7; P=0,0258) apresentaram diferenças entre o período pré e pós-suplementação.

Desta forma, o garanhão 3 apresentou no período pós-suplementação maior tempo médio de ereção, entretanto, com menor tempo médio de lavagem e de recolhimento peniano em relação ao período pré-suplementação. As demais variáveis descritas não diferiram (P≥0,05; Tabela 3).

TABELA 3 – Repertório comportamental (média, desvio-padrão e intervalo de confiança) do garanhão 3 durante as coletas de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes.

Variáveis[1]	Suplementação				Valor do teste	P[4]
	Pré		Pós			
	Média ±DP[2]	IC[3]	Média ±DP[2]	IC[3]		
V1	73,6±12,4[a]	47,1-100,0	61,4±13,1[a]	33,4-89,4	0,41	0,5223
V2	43,4±6,6[a]	29,3-57,6	19,4±7,0[b]	4,4-34,3	7,80	0,0052
V3	20,0±7,5[a]	4,0-36,0	9,1±8,0[a]	0,0-26,1	0,28	0,5937
V4	73,2±19,4[b]	31,9-114,6	146,0±20,6[a]	102,2-189,8	6,27	0,0123
V5	39,1±3,6[a]	31,4-46,8	41,5±3,8[a]	33,3-49,7	0,24	0,6277
V6	29,9±3,6[a]	22,1-37,6	35,5±3,9[a]	27,3-43,7	0,52	0,4691
V7	20,9±7,4[a]	5,1-36,6	6,9±7,8[b]	0,0-23,6	4,97	0,0258
V8	29,3±4,3[a]	20,1-38,6	31,5±4,6[a]	21,7-41,3	0,52	0,4694
V9	16,7±2,2[a]	11,9-21,4	21,5±2,4[a]	16,5-26,5	2,09	0,1479
V10	52,2±12,8[a]	24,9-79,6	33,8±13,6[a]	4,8-62,7	0,93	0,3344

[1]Todas as variáveis de tempo descritas estão representadas por segundos, exceto V9 referente ao número de movimentos. Variáveis: V1=Intervalo de tempo para exposição do

pênis; V2= Intervalo de tempo para lavagem do pênis; V3= Intervalo de tempo para secagem do pênis; V4=Intervalo de tempo para ereção do pênis; V5=Intervalo de tempo para monta do garanhão; V6=Intervalo de tempo de vagina artificial; V7=Intervalo de tempo para recolhimento do pênis; V8=Intervalo de tempo para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento; V9=Número de contração glútea, movimento de cauda e sapateamento; V10=Intervalo de tempo de espera dos garanhões para a monta. [2]DP=desvio-padrão. [3]IC=intervalo de confiança, a 95%. [4]P= probabilidade de significância, ao nível de 5%, pelo teste de Kruskal-Wallis. [a, b]: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis (P≥0,05).

No garanhão 3 observou-se as variáveis V2 e V7, representadas por menor tempo no período pós-suplementação. Este resultado deve-se ao condicionamento e à suplementação, aumentando o conforto do animal ao manejo, onde há a intervenção humana, e maior resposta aos estímulos não sexuais, presentes no recinto, aumentando a libido, consequentemente, acelerando o processo da coleta de sêmen.

Outra variável influenciada foi a V4, intervalo de ereção, a qual apresentou maior intervalo de tempo no período pós-suplementação, possivelmente, como resultado da suplementação e condicionamento na libido. No entanto, outras variáveis são descritas como influenciadoras destes comportamentos envolvendo libido, como a ereção. Neste contexto, o início, a intensidade e a duração do cortejo são afetadas pela genética do garanhão, comportamento aprendido, experiências, variação sazonal e doenças (BRINSKO et al., 2011).

Quanto ao repertório comportamental do garanhão 3, duas variáveis se destacaram, sendo menor intervalo de tempo para recolhimento peniano (Figura 4) e maior intervalo de tempo para ereção peniana (Figura 5C).

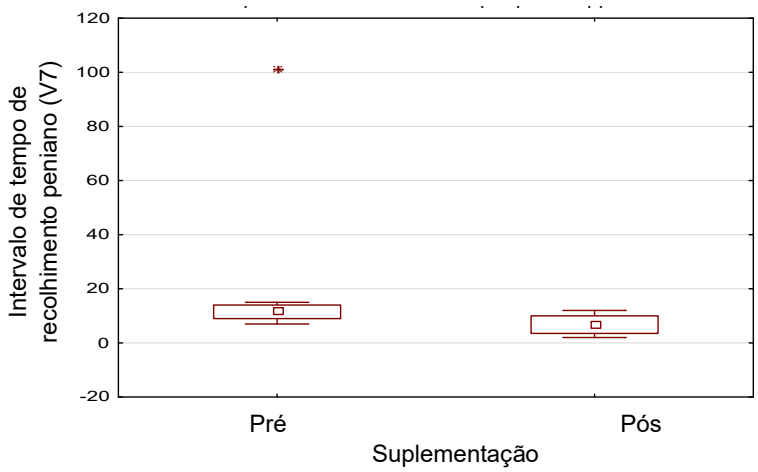


Figura 4. Boxplot do intervalo de tempo (seg) para recolhimento peniano (V7) do garanhão 3. Medianas (quadrados dentro das caixas). **outliers*

BRINSKO et al. (2011) observaram que anormalidade físicas, envolvendo a incapacidade de montar, além de claudicação e alterações articulares, podem estar associadas a lesões penianas, lesões de medula espinhal e algumas disfunções orgânicas idiopáticas, relacionadas ou não ao mal funcionamento psicológico, afetando diretamente o comportamento do garanhão. Vale salientar que o garanhão 3 teve coletas interrompidas durante o transcorrer do período pós-suplementação, por sofrer leve sangramento uretral, o qual foi rapidamente superado, retomando as coletas de maneira sucessiva dentro do intervalo de sete dias.

Oliveira (2014) observou variáveis comportamentais em garanhões no momento da coleta de sêmen por meio de identificação da faixa etária, sendo que as variáveis com maior significância foram o tempo de latência (momento entre a ereção e monta na égua) e o tempo de reação (momento entre a exposição do garanhão à égua e a ereção completa), obtendo um coeficiente elevado no período de coletas de sêmen, com tempo médio de reação de 101,1 segundos no primeiro período de coletas e 61,4 segundos no segundo período de coletas. Já a variável comportamental tempo médio de latência obteve um tempo de 28,1 segundos no primeiro período de coletas e no segundo período de coletas 32,2 segundos. O autor relata que o tempo médio de latência foi superior aos intervalos descritos na literatura e que tal fato pode ter sofrido influência direta do manejo adotado no protocolo para coleta de sêmen.

Desta forma, destaca-se que a maior parte dos funcionários conduzem os garanhões, não permitindo que os mesmos montem até que se observe ereção completa. Este manejo quanto à condução no manequim, pode levar garanhões a temer a contenção pelo cabresto, havendo demora na realização da monta.

Isso nos leva a refletir a respeito de comportamentos condicionados em garanhões submetidos ao protocolo durante a coleta, resultando em reações diretamente relacionados às imposições do manejo.

6.1.4 Garanhão 4

Em relação ao garanhão 4 todas as variáveis não diferiram (P≥0,05; Tabela 4) entre o período pré e pós-suplementação. Entretanto, o tempo de ereção (V4)

apresentou tendência (P=0,0541) de maior tempo médio no período pós, em relação ao período pré-suplementação.

TABELA 4 – Repertório comportamental (média, desvio-padrão e intervalo de confiança) do garanhão 4 durante as coletas de sêmen pré e pós-suplementação com compostos naturais e antioxidantes.

Variáveis[1]	Suplementação				Valor do teste	P[4]
	Pré		Pós			
	Média ±DP[2]	IC[3]	Média ±DP[2]	IC[3]		
V1	53,7±12,1[a]	28,0-79,4	26,5±12,8[a]	0,0-53,8	2,70	0,1002
V2	54,6±8,9[a]	35,5-73,6	29,4±9,5[a]	9,1-49,6	2,25	0,1334
V3	39,7±11,2[a]	15,7-63,6	8,3±11,9[a]	0,0-33,6	3,62	0,0571
V4	81,2±18,7[a]	41,3-121,2	143,8±19,9[a]	101,4-186,1	3,71	0,0541
V5	51,6±7,3[a]	36,1-67,0	41,8±7,7[a]	25,4-58,1	0,15	0,6996
V6	43,7±8,2[a]	26,3-61,0	29,3±8,6[a]	10,8-47,7	0,01	0,9222
V7	30,2±9,9[a]	9,2-51,2	10,3±10,5[a]	0,0-32,5	1,04	0,3081
V8	37,1±9,0[a]	17,9-56,3	21,0±9,5[a]	0,7-41,3	0,15	0,6987
V9	31,9±9,6[a]	11,5-52,3	14,6±10,1[a]	0,0-36,3	0,34	0,5598
V10	58,4±15,1[a]	26,4-90,5	44,8±16,0[a]	10,7-78,8	1,24	0,2649

[1]Todas as variáveis de tempo descritas estão representadas por segundos, exceto V9 referente ao número de movimentos. Variáveis: V1=Intervalo de tempo para exposição do pênis; V2= Intervalo de tempo para lavagem do pênis; V3= Intervalo de tempo para secagem do pênis; V4=Intervalo de tempo para ereção do pênis; V5=Intervalo de tempo para monta do garanhão; V6=Intervalo de tempo de vagina artificial; V7=Intervalo de tempo para recolhimento do pênis; V8=Intervalo de tempo para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento; V9=Número de contração glútea, movimento de cauda e sapateamento; V10=Intervalo de tempo de espera dos garanhões para a monta. [2]DP=desvio-padrão. [3]IC=intervalo de confiança, a 95%. [4]P= probabilidade de significância, ao nível de 5%, pelo teste de Kruskal-Wallis. [a, b]: Valores seguidos pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis (P≥0,05).

McDonnell (2000) afirma que garanhões que ultrapassam os 20 anos de idade diminuem libido. Neste caso, o garanhão 4 é uma exceção, pois o tempo de ereção, o qual caracteriza a resposta à excitação e libido apresentou tendência quanto maior

intervalo pós *vs.* pré-suplementação e mantendo constante as demais variáveis e compatíveis com os outros garanhões.

Um garanhão com boa libido mostra desejo imediato e intenso quando exposto a uma égua, manifestando inquietação, sapateamento, vocalização e atividade pré-copulatória íntima, como cheirar, lamber e beliscar a égua, reflexo de flehmen ao cheirar a genitália da égua e urina, além de desenvolver a ereção (BRINSKO et al., 2011).

No presente estudo, o intervalo de tempo de ereção, variável que se destaca dentro do repertório comportamental, foi maior para os garanhões 2 e 3 (P=0,0123), com tendência de superioridade para o garanhão 4 (P=0,0541), com médias superiores a 140 segundos para os três garanhões citados. Esta variável, no entanto, não diferiu para o garanhão 1 entre o período pré e pós-suplementação, mantendo-se ao redor de 90 segundos, em média nos dois períodos (Tabelas 1 a 4).

Quanto às diferenças no repertório comportamental entre garanhões abaixo e cima de 15 anos de idade, Najjar et al. (2010) ao avaliarem garanhões da raça Árabe, detectaram maiores valores médios no número de montas (1,6 *vs.* 1,2), intervalo de tempo de preparação para coleta (107 *vs.* 89 segundos) e intervalo de tempo de coleta (136 *vs.* 117 segundos) para garanhões abaixo de 15 anos de idade quando comparados aos senis acima desta idade.

O valor médio dos parâmetros reportados por Najjar et al. (2010) para a raça Árabe está acima dos intervalos encontrados no presente estudo, para a raça Quarto de Milha. No entanto, o tempo total de ereção no presente estudo revelou um intervalo estável dentro de 90 segundos para o garanhão 4 (acima de 20 anos de idade), além de médias superiores a 140 segundos nos demais garanhões (faixa etária abaixo de 15 anos). Como descrito por Najjar et al. (2010), este parâmetro comportamental observado durante a coleta de sêmen conduzida ao manequim é de caráter individual e está relacionado com a idade, o condicionamento e a maturidade sexual.

No entanto, Oliveira (2014) ao avaliar garanhões da raça Manga Larga Marchador, dentro de diferentes faixas etárias, não observou diferenças quanto aos parâmetros comportamentais pré-cópula.

Os estudos citados acima consideram aspectos e momentos distintos do repertório comportamental durante as avaliações, o que traz divergências quanto às conclusões em relação a idade dos animais e as observações de parâmetros do comportamento durante a monta.

Ainda quanto aos divergentes achados, o presente estudo com os garanhões Quarto de Milha revelou resposta estável em relação ao comportamento do garanhão 4, após a suplementação; caracterizado apenas por tendência em determinados parâmetros como diminuição do tempo de secagem durante a higienização para a monta e aumento do tempo de ereção. Entretanto, os demais garanhões responderam com diferenças significativas entre os momentos pré e pós-suplementação em determinados parâmetros (Tabelas 1 a 3).

A Figura 5 representa a variável intervalo de tempo de ereção peniana, por meio de gráficos boxplots, ilustrando o padrão seguido para os quatro garanhões (A à D).

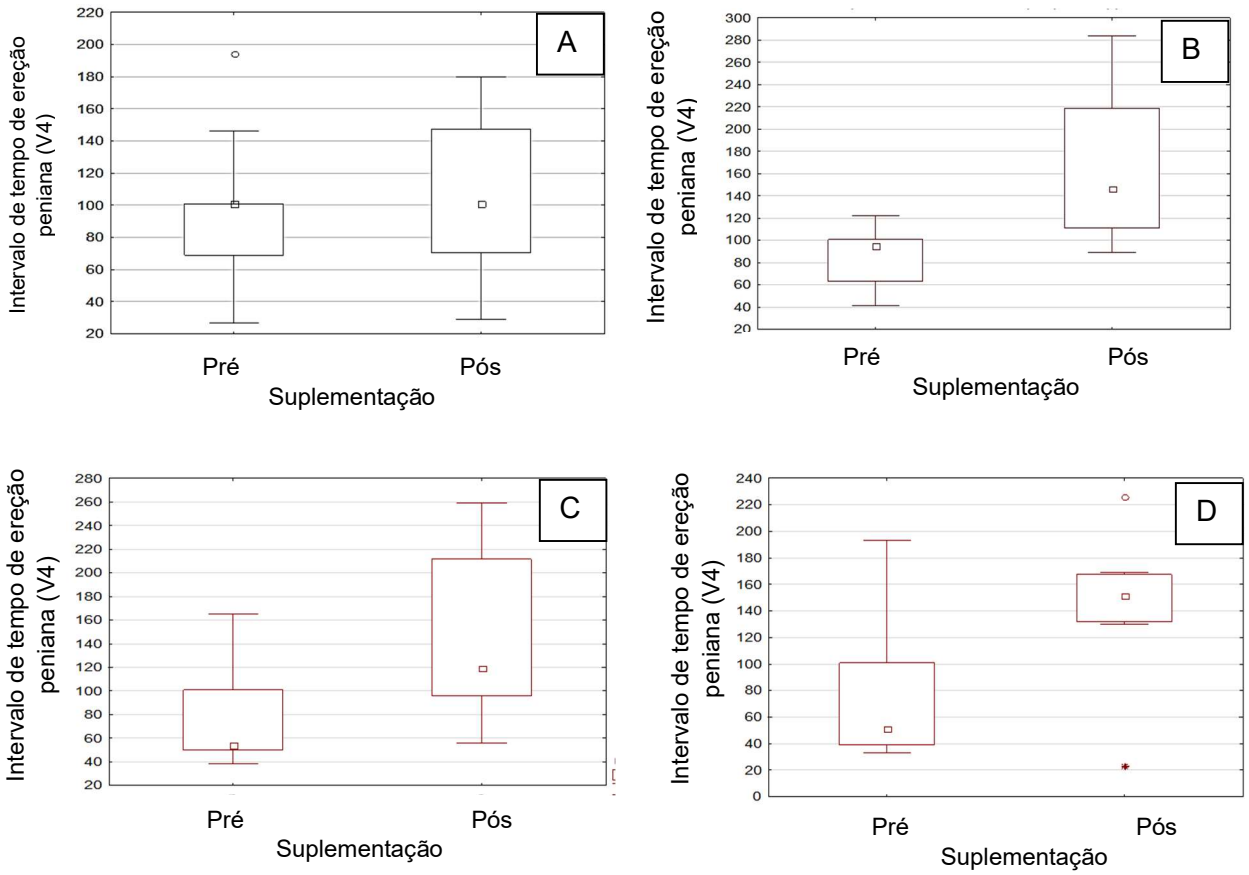


Figura 5. Boxplots A à D) V4: Intervalo de tempo (seg) de ereção peniana para os quatro garanhões. Medianas (quadrados dentro das caixas). **outliers*

6.2 REPERTÓRIO COMPORTAMENTAL REPRESENTADO POR CADA VARIÁVEL PARA OS QUATRO GARANHÕES

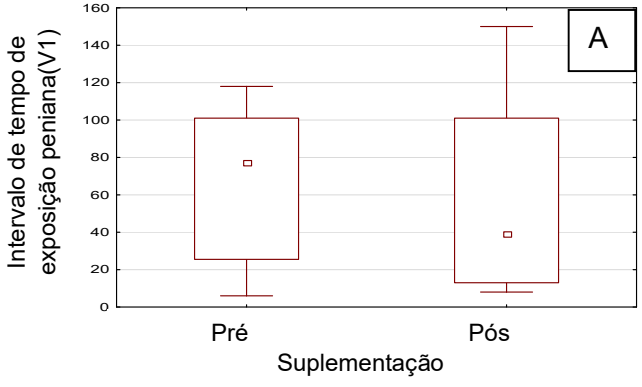
As Figuras 6 a 8, a seguir, se referem aos gráficos do tipo boxplot em relação à comparação entre as médias dos quatro garanhões durante os períodos pré *vs*. pós-suplementação para cada tipo de comportamento (variáveis V1 a V10).

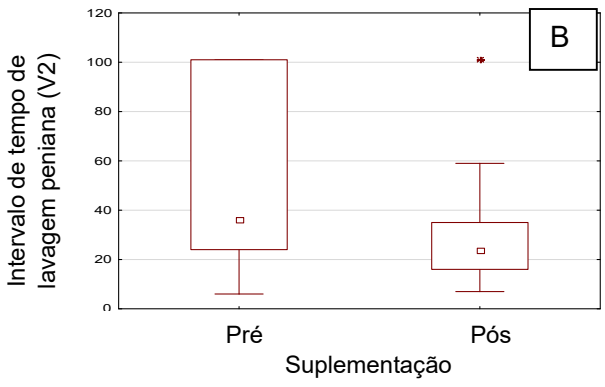
6.2.1 Comportamento dos garanhões (n=4) e procedimentos preparatórios precedendo a monta no manequim

Considerando os quatro garanhões, as medianas para cada variável não resultaram em diferenças significativas (Figura 6). No entanto, a observação do repertório comportamental e dos procedimentos revelam mudanças no período pré e pós-suplementação em certas variáveis a serem discutidas a seguir.

No período pós-suplementação, os garanhões expuseram o pênis ao chegarem na sala de coleta ou mesmo ao saírem da baia de maneira mais rápida (V1; Figura 6A). No entanto, observou-se similaridade no tempo de lavagem peniana (V2; Figura 6B) com dispersão homogênea no período pós-suplementação.

Quanto ao tempo de secagem (V3; Figura 6C), as medianas são similares com maior dispersão e menos homogeneidade para o período pós-suplementação. A mediana do intervalo de tempo de espera dos garanhões para a monta (V10; Figura 6D) no período pós-suplementação apresentou valor próximo do quartil inferior em relação a mediana do período pré-suplementação. Tal fato pode ter sido relacionado à maneira como os garanhões foram conduzidos ao manequim para a monta, de forma menos demorada durante o período pós-suplementação, inerente à adaptação do animal ao manejo de coleta ao longo do tempo.





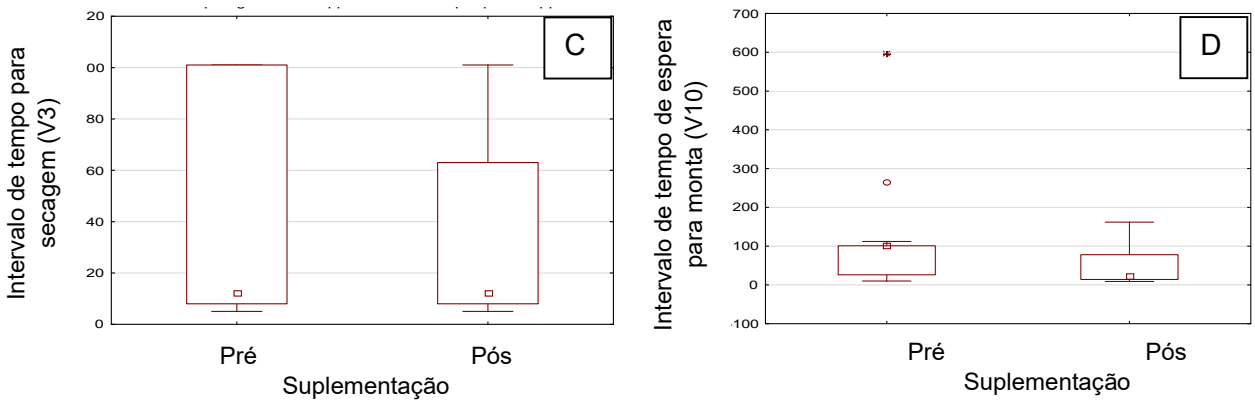


Figura 6. Boxplot de variáveis comportamentais e dos procedimentos preparatórios precedendo a monta dos garanhões no manequim.

A) V1: Intervalo de tempo (seg) para exposição do pênis; B) V2: intervalo de tempo (seg) para lavagem peniana; C) V3: intervalo de tempo (seg) para secagem; D) V10: intervalo de tempo (seg) de espera para a monta. Medianas (quadrados dentro das caixas). **outliers*

O condicionamento do comportamento dos garanhões, sabidamente, depende não somente do ambiente, assim como da frequência e regularidade na qual os procedimentos e intervenções são executadas. A maneira como o animal é conduzido ao manequim, ou seja, na presença ou ausência de fêmeas no cio dentro da sala de coleta, o respeito ao tempo necessário para que o mesmo se sinta confortável e seguro em realizar a monta e outras variáveis individuais do animal podem interferir nesse intervalo de espera (JEANNERAT et al., 2017).

Quanto as variáveis relacionadas à intervenção humana para limpeza e higienização (V2 e V3) para coleta de sêmen dos garanhões, os resultados revelam que o manejo da central privada conta com controle de qualidade, quanto à equipe que realizou os procedimentos, não havendo diferenças significativas entre o período pré e pós-suplementação para a realização dos mesmos.

Mesmo apresentando mediana similar nesta variável, observou-se dispersão e menos homogeneidade, o que pode estar relacionada com as respostas individuais dos garanhões ao procedimento de secagem (V3), especificamente.

Neste procedimento é necessária a abordagem humana caracterizada pelo contato das mãos do técnico com o pênis do animal, para finalização da limpeza iniciada com a lavagem. Tal procedimento é fundamental para a coleta, uma vez que água e umidade da extremidade da glande podem comprometer a qualidade do sêmen coletado.

O treinamento adequado de pessoas envolvidas em todo o processo de coleta de sêmen é essencial, sendo necessário treinamento adicional para acurácia a um

nível de competência, a fim de alcançar taxas de prenhez satisfatórias com técnicas de inseminação artificial utilizando baixas doses. Para tanto, os requisitos para obtenção e processamento do sêmen devem ter maior atenção e serem realizados a partir de técnicas e manuseio adequados (BRINSKO et al., 2011).

As reações de cada garanhão ao procedimento detalhado acima são individuais e, muitas vezes, não se repetem da mesma forma com o mesmo animal, dependendo da interação com o técnico, ambiente e condicionamento, como citado acima. Tal fato, ressalta a importância em se avaliar as variáveis comportamentais para compreensão do repertório comportamental dos garanhões. Obtendo um padrão de comportamentos normais, facilitando a identificação de anormalidades, para assim criar estratégias visando eficiência, viabilizando o trabalho dos veterinários e funcionários em centrais de reprodução, otimizando a rotina, promovendo conforto aos animais e eficiência do processo de coleta de sêmen.

É esperado que o tempo necessário para a realização dos procedimentos de limpeza dos garanhões nos dois períodos estudados (pré e pós-suplementação) tenha sido similar. No entanto, as características do gráfico boxplot no período pós-suplementação, quanto à secagem (V3), devem ser consideradas e, possivelmente, representam a individualidade de resposta de cada animal à suplementação, como descrito anteriormente nas Tabelas 1 a 4.

6.2.2 Comportamento dos garanhões (n=4) e procedimentos durante a monta e coleta de sêmen no manequim

O intervalo de tempo de ereção peniana (V4; Figura 7A) apresentou a mediana do período pós-suplementação acima da mediana do período pré-suplementação, considerando as observações de todos os garanhões. Apesar desta variável não ter demonstrado diferença significativa pelos resultados do gráfico (Figura 5), quando o comportamento dos quatro garanhões foi analisado conjuntamente, deve-se salientar que este intervalo de ereção médio no pós-suplementação foi alterado positivamente em três garanhões, como descrito anteriormente nas Tabelas 1 a 4.

O início e manutenção da ereção do pênis dependem do controle do sistema nervoso central e de nervos simpáticos e parassimpáticos, os quais são responsáveis pelas respostas apresentadas pelos garanhões mediante a exposição aos estímulos necessários (égua no cio, feromônios, respeito e liberdade de cortejo e demais condições ambientais favoráveis, como o silêncio) (ROSER, 1995).

No entanto, o condicionamento dos animais e a aquisição da adaptação e familiaridade com o local e a equipe devem ser considerados, uma vez que no período pós-suplementação os garanhões já haviam passado por tais experiências anteriormente; o que pode ter contribuído para o aumento deste intervalo de ereção, observado individualmente, embora não representado pela mediana dos quatro animais.

O intervalo de tempo de monta, em segundos (V5; Figura 7B) e o intervalo de tempo para vagina artificial, em segundos (V6; Figura 7C) foram similares e homogêneos em ambos os períodos pré e pós-suplementação, quanto a mediana. No entanto, é importante notar que no período pós-suplementação, os dados se comportaram de forma mais homogênea, podendo representar regularidade do comportamento quanto à monta e à coleta na vagina artificial. Este fato pode contribuir para o manejo e, possivelmente, resultar em coleta de sêmen menos variável, com maior previsibilidade das reações dos garanhões à equipe, ambiente e demais fatores, os quais possam estar interferindo com a performance reprodutiva.

Quanto ao intervalo de tempo de recolhimento peniano, em segundos (V7; Figura 7D), não houve diferença quanto à mediana entre os períodos estudados. Esta variável se comporta de maneira mais homogênea quanto a dispersão e aos intervalos observados no período pós-suplementação.

A influência de fatores ambientais e intervenções técnicas neste comportamento de recolhimento são menos previsíveis, pois podem estar relacionadas com o momento de desmonta do manequim, relaxamento dos membros pélvicos e liberação de endorfinas presentes ao final da ejaculação (ROSER, 2001). Portanto, o recolhimento do pênis no prepúcio pode ser consequência de vários fatores fisiológicos e externos.

No presente estudo, esta variável se comportou de maneira similar em ambos períodos, o que leva a inferir que os fatores externos (técnicos, ambientais e manejo), mantiveram-se estáveis durante todo o experimento.

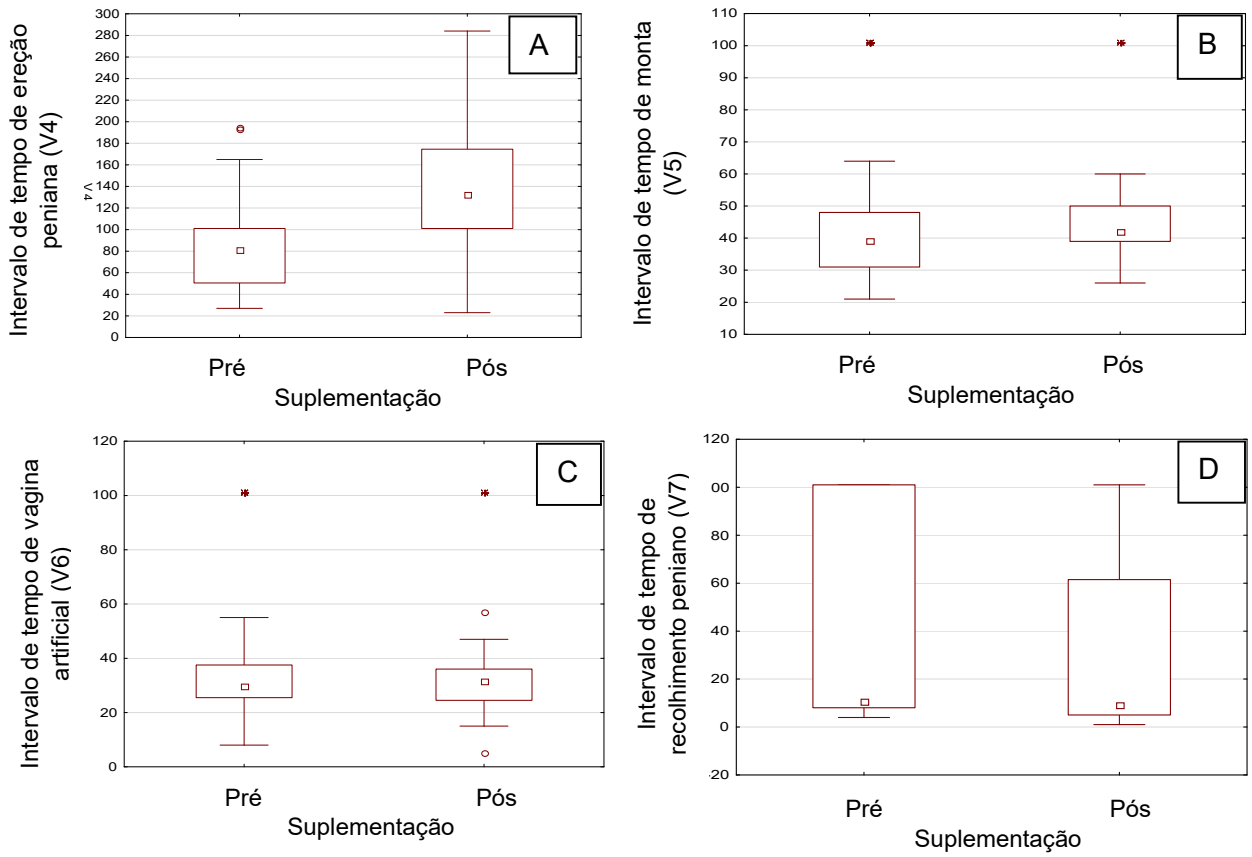


Figura 7. Boxplot de variáveis comportamentais e dos procedimentos durante a monta e coleta de sêmen no manequim.

A) V4: Intervalo de tempo (seg) de ereção B) V5: intervalo de tempo (seg) de monta; C) V6: intervalo de tempo (seg) para vagina artificial; D) V7: intervalo de tempo (seg) de recolhimento peniano. Medianas (quadrados dentro das caixas). **outliers*

A variável intervalo de tempo para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento, em segundos (V8; Figura 8A) e a variável número de contração glútea, movimento de cauda e sapateamento (V9; Figura 8B) apresentaram medianas similares entre os períodos pré e pós-suplementação.

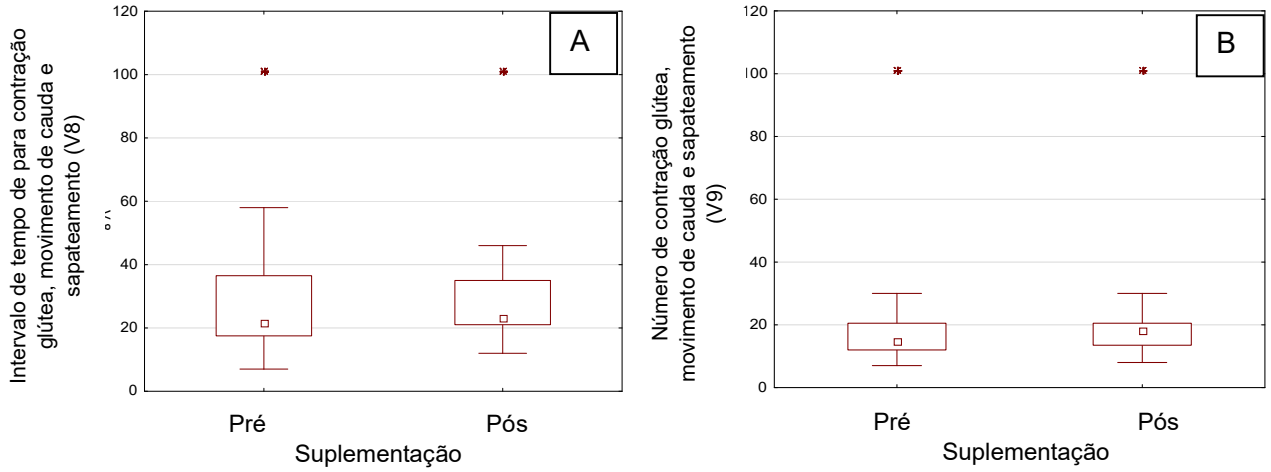


Figura 8. Boxplot de variáveis comportamentais da ejaculação durante a monta e coleta de sêmen no manequim.

A) V8: intervalo de tempo (seg) para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento; B) V9: Número de contrações glúteas, movimento de cauda e sapateamento dos garanhões durante as coletas de sêmen. Medianas (quadrados dentro das caixas). **outliers*

A variável V8, referente ao intervalo de tempo dos movimentos, foi caracterizada por maior dispersão dos dados no período pré-suplementação, comportando-se de maneira mais homogênea no período pós-suplementação; o que pode ter resultado em evolução positiva com a suplementação e condicionamento dos garanhões ao longo do tempo.

A variável V9, referente ao número de movimentos observados, apresentou menor dispersão dos dados em ambos os períodos. Os resultados sugerem que os garanhões pós-suplementados realizaram o mesmo número de movimentos em menor período de tempo durante a monta.

Apesar de não ser o foco do presente estudo, a observação deste comportamento pode levar a reflexões sobre o quanto o momento de ejaculação após a monta no manequim possa ter sido mais rápido durante o período pós-suplementação. Fato que poderia influenciar positivamente na coleta de sêmen, quanto as características do ejaculado (quantidade de gel, volume, concentração e outros parâmetros).

7 CONCLUSÃO

As repostas foram individuais para cada garanhão e revelaram mudanças no período pós-suplementação, considerando o repertório comportamental durante a coleta de sêmen (monta, vagina artificial e desmonta do manequim), os quais foram representados por intervalo de tempo para monta, para ereção peniana e para contração glútea, movimento de cauda e sapateamento. Tais comportamentos estão diretamente relacionados à performance reprodutiva e foram influenciados positivamente pelo condicionamento e suplementação. Ainda quanto à resposta individual nos momentos pré e pós-suplementação, o garanhão acima de 20 anos de idade mostrou-se estável quanto ao repertório comportamental, enquanto os demais garanhões mais jovens apresentaram mudanças nos parâmetros observados.

REFERÊNCIAS

ABQM. Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de Milha. **Quarto de Milha. O cavalo da família brasileira**. 2016. Disponível em: https://abqm.com.br/app/webroot/documentos/cartilha.pdf. Acesso em: 15 de set. 2022.

AGARWAL, A.; SAID, T. M. Carnitines and male infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 8, n. 4, p. 376-384, 2004.

AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; DU PLESSIS, S. S. Effect of oxidative stress on male reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1-17, 2014.

ALAWAD, A.; KOLB, E.; LEO, M.; SIEBERT, P. Der Gehalt an Ascorbinsaeure in 13 Geweben und die Aktivitaet der L-Gulonolacton-Oxidase in der Leber von Pferden. **Praktische Tierarzt**, v. 75, n. 1, p. 40-47, 1994.

ARIKAN, S.; RODWAY, R. G. Effect of cyclodextrin-encapsulated β-carotene on progesterone production by bovine luteal cells. **Animal Reproduction Science**, v. 64, n. 3-4, p. 149-160, 2000.

ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; ALONSO, M. A.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; GALLEGO, A. M.; MARTINS, S. M. M. K.; GRANATO, T. M. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 393-400, 2010.

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 220-228, 2011.

BARROS, F. N.; SÁ, P. N. C.; BARCANTE, F. P. S.; BRANCO, M. A. C.; FILHO M. A. C. S.; BARROS, D. A.; NETO, B. O. L.; SOUZA, J. A. T. Adição do ácido fólico na criopreservação de sêmen ovino da raça Santa Inês. Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal (VIII CONERA), 8, 2016, Teresina, PI. **Anais.** Belo Horizonte: CBRA, 2016.

BERLINGUER, F.; PASCIU, V.; SUCCU, S.; COSSU, I.; CAGGIU, S.; ADDIS, D.; CASTAGNA, A.; FONTANI, V.; RINALDI, S.; PASSINO, E. S. REAC Technology as optimizer of stallion spermatozoa liquid storage. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 15, n. 11, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Secretaria de Mobilidade Social, do Produtor Rural e do Cooperativismo. Comissão Técnica Permanente de Bem-estar Animal e Câmara Setorial de Equideocultura, Brasília, 2016.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. **Manual of Equine Reproduction**. 3rd ed. Maryland Heights: Mosby Elsevier. 2011.

BURGER, D.; DOLIVO, G.; WEDEKIND, C. Ejaculate characteristics depend on social environment in the horse (*Equus caballus*). **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, e0143185. 2015.

CLAY, C. M.; CLAY, J. N. Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod, and the peri-pubertal period in stallions, **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 31-56, 1992.

DINARDO, J. **Natural Experiments and Quasi-Natural Experiments**. 2010. In: Durlauf, S.N., Blume, L.E. (eds) Microeconometrics. The New Palgrave Economics Collection. Palgrave Macmillan, London. https://doi.org/10.1057/9780230280816_18. Acesso: 11 de novembro de 2022.

FRANCESCHINI, G. C. S. **Efeito da adição dietética de L-carnitina sobre a atividade mitocondrial dos espermatozoides crio preservados de garanhões**. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

FREITAS, C. C. **Aspectos do comportamento reprodutivo na monta natural de equinos da raça Crioula.** 2005. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2005.

FREITAS, M. L. **Qualidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado em garanhões suplementados com produto comercial composto por aminoácidos, vitaminas, antioxidantes e minerais**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2015.

HULSE, J. D.; ELLIS, S. R.; HENDERSON, L. M. Carnitine biosynthesis. Beta-hydroxylation of trimethyllysine by na alpha-ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, p. 1654-1659, 1978.

IMHOF, M.; LACKNER, J.; LIPOVAC, M.; CHEDRAUI, P. Micronutrient supplementation increases sperm quality in the subfertile male. **European Urology Review**, v. 6, n. 2, p. 120-123, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Rebanho de equinos (cavalos).** 2022. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br. Acesso em: 19 set. 2022.

IONATA, L. M.; ANDERSON, T. M.; PICKETT, B. W.; HEIRD, J. C.; SQUIRES, E. L. Effect of supplementary sexual preparation on semen characteristics of stallions, **Theriogenology**, v. 36, n. 6, p. 923-937, 1991.

JEANNERAT, E.; JANETT, F.; SIEME, H.; WEDEKIND, C.; BURGER, D. Quality of seminal fluids varies with type of stimulus at ejaculation. **Scientific Reports,** v. 7, n. 44339, 2017.

JEULIN, C.; DACHEUX, J. L.; SOUFIR, J. C. Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 263-271, 1994.

JOHANNISSON, A.; AL-ESSAWE, E. M.; AL-SAFFAR, A. K.; KARKEHABADI, S.; LIMA-VERDE, I.; WULF, M.; AURICH, C.; MORRELL, J. M. Season does not have a deleterious effect on proportions of stallion seminal plasma proteins. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 66, n. 3, p. 215-221, 2020.

KEFER, J. C.; AGARWAL, A.; SABANEGH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. **International Journal of Urology**, v. 16, p. 449-457, 2009.

KO, E. Y.; SABANEGH, E. S. The role of nutraceuticals in male fertility. **Urologic Clinics of North America**, v. 41, p. 181-193, 2014.

LEMASSON, A.; REMEUF, K.; TRABALON, M.; CUIR, F.; HAUSBERGER, M. Mares prefer the voices of highly fertile stallions. **PLoS ONE,** v. 10, n. 2, e0118468, 2015.

LIMA, M. M. **Influência da suplementação oral com L-carnitina na qualidade do sêmen criopreservado de garanhões**. 2003. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2003.

MAIA, F. A. **Avaliação dos parâmetros seminais de indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

MCDONNELL, S. M.; DIEHL, N. K. Computer-assisted recording of live and videotaped horse behavior: reliability studies. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 27, n. 1-2, p. 1-7, 1990.

MCDONNEL, S. M. Normal and abnormal sexual behavior. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 71-89, 1992.

MCDONNEL, S. M.; HAVILAND, J. C. S. Agonistic ethogram of the equid bachelor band. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 43, n. 3, p. 147-188, 1995.

MCDONNEL, S. M. Reproductive behavior of stallions and mares: comparison of free-running and domestic in-hand breeding. **Animal Reprodution Science**, v. 60-61, n. 2, p. 211-219, 2000.

MCGREEVY, P. **Equine behavior: a guide for veterinarians and equine scientists**, Elsevier Science, 2004.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. West Sussex: 304 Wiley-Blackwell, p. 1053-1084, 2011.

MIRANDA, G. S.; MOLSKA, V. M. R. M.; BUENO, R.; SILVA, A. L. Importância do melhoramento genético para os equinos da raça quarto de milha. Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária da FAEF**. Ano XVII, n. 35, 2020.

NAJJAR, A.; BENAOUN, B.; EZZAOUIA, M.; BEN MAÂTOUG, A.; MAGISTRINI, M.; BEN MRAD, M. Determination of semen and sexual behavior parameters of Arabian stallions to be selected for an artificial insemination program under Tunisian conditions. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 8, n. 2, p. 173-177, 2010.

NOUE, P. F.; CLÉMENT, M.; MAGISTRINI, E.; BARREY, O.; RAMPIN AND J. BERNABÉ. Erection and 66 cases (1987-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, p. 389-394. Erection and ejaculation in stallions during mating and semen collection. Third conference of the Europeen Society, Nov 26 -27, p. 77-78, 1999.

OLIVEIRA, R. R. **Características reprodutivas de garanhões da raça Manga Larga Marchador em diferentes faixas etárias**. 2014. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2014.

REZENDE, M. J. M.; MCMANUS, C.; MARTINS, R. D.; OLIVEIRA, L. P. G.; GARCIA, J. A. S.; LOUVANDINI, H. Comportamento de cavalos estabulados do Exército Brasileiro em Brasília. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 327-337, 2006.

ROSER, J. F. Endocrine profiles in fertile, subfertile, and infertile stallions: Testicular response to human chorionic gonadotropin in infertile stallions. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 1, p. 661-669, 1995.

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

SENAR. **Agronegócio do cavalo no estado do Pará**. Revista do Sistema FAEPA/ SENAR/ FUNDEPEC/ AMAZÔNIA RURAL. 2015. Disponível em: <http://www.faepanet.com.br/faepa-admin/anexos/para_rural_26_web.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2022.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 1997. 272pp. ISBN: 9780965764803. Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd. Pullman, WA 99163-5607. USA.

SILVA, R. O. C. **Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação do sêmen caprino**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SONMEZ, M.; TURK, G.; YUCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 2063-2072, 2005.

SOUZA, D. C.; NARDINO, T. A. C.; SCHIAVO, S. D.; LINDEN, L. S. V. D.; ROSA, C. S.; CAMPOS, N. M. F.; NEVES, A. P. **Aspectos comportamentais de equinos da raça Crioula estabulados fora da estação reprodutiva, submetidos à coleta de sêmen**, v. 3, n. 2, 2011. Disponível em: http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/3218. Acesso em: 22 ago. 2022.

STATSOFT, Inc. 2014. **STATISTICA (*Data Analysis Software System*)**, version 12. 2014.

STRADAIOLI, G.; SYLLA, L.; ZELLI, R.; CHIODI, P.; MONACI. M. Effect of L-carnitine administration on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions. **Theriogenology**, v. 62, p. 761-777, 2004.

SULIMAN, Y.; BECKER, F.; TUCHSCHERER, A.; WIMMERS, K. Seasonal variations in quantitative and qualitative sperm characteristics in fertile and subfertile stallions. **Archives Animal Breeding**, v. 63, p. 145–154, 2020.

TAROUCO, A. K. **Organização social e comportamento reprodutivo de garanhões e éguas da raça brasileira pônei**. Porto Alegre, 2004.

VIRGINI, A.; ALIDORI, A.; MONTESI, L.; RAFFAELLI, F.; NANETTI, L.; BERTOLI, E.; MAZZANTI, L. Vitamin E, diabetes and related diseases: an update. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 4, p. 3-9, 2011.

YONEZAWA, L. A.; BARBOSA, T. S.; WATANABE, M. J.; MARINHO, C. L.; KNAUT, J. L.; KOHAYAGAWA, A. Efeito da suplementação com vitamina E sobre os metabolismos oxidativo e cardíaco em equinos submetidos a exercício de alta intensidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 71-79, 2015.

ZEYNER, A.; BUCHHOLZ, I.; SCHWEIGERT, F. J. Studies on the effect of fat intake on levels of beta -carotene, vitamin A and vitamin E in blood serum of horses: soybean oil and soybean lecithin. 2. Mitteilung: Sojaöl und Sojalecithin. In: Schubert, R., Flachowsky, G., Bitsch, R., Jahreis, G. (Eds.), **Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier**, p. 358-361, 1999.