JOÃO CRISPIM LIMPO TRIGUEIROS PRADO E SOUSA

INFLUÊNCIA DA RAÇA, ALTURA DO ANO, IDADE E OVÁRIO OVULATÓRIO SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO EM ÉGUAS INSEMINADAS COM SÉMEN REFRIGERADO.

Orientador – Professor Doutor Carlos Bettencourt

Co-Orientador – Dra. Joana Matos

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

JOÃO CRISPIM LIMPO TRIGUEIROS PRADO E SOUSA

INFLUÊNCIA DA RAÇA, ALTURA DO ANO, IDADE E OVÁRIO OVULATÓRIO SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO EM ÉGUAS INSEMINADAS COM SÉMEN REFRIGERADO

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador – Professor Doutor Carlos Bettencourt

Co-Orientador – Dra. Joana Matos

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

É impossível avaliar a força que possuímos sem medir o tamanho do obstáculo que podemos vencer, nem o valor de uma acção sem sabermos o sacrifício que ela comporta...

(H. W. Beecher)

Agradecimentos

Nada disto teria sido possível sem a ajuda permanente de várias pessoas inigualáveis que me acompanharam ao longo de todo este árduo percurso académico. Por isso gostaria de agradecer:

Ao Professor Dr. Pedro Faísca, por me ter "aberto os olhos" num momento crucial, por me ter feito "ver mais à frente" e por toda a amabilidade que sempre demonstrou para comigo.

À Professora Dra. Maria Gaivão, por todos os ensinamentos transmitidos na área da reprodução de equinos, pela paciência para com todos os alunos nas várias visitas de estudo realizadas e principalmente pela orientação e preocupação para com a minha tese.

Ao Professor Dr. Manuel Pequito, pelas aulas passadas a discutir casos clínicos, e por me ter demonstrado as diferentes realidades da prática da medicina equina em diferentes países da Europa.

Ao Professor Dr. José Prazeres, pela sua acessibilidade e ensinamento prático que me transmitiu principalmente a nível hospitalar, aliado sempre ao seu bom humor.

À Professora Dra. Laurentina Pedroso, pela simpatia, proximidade e prontidão na resolução de inúmeras situações ao longo destes anos. Os meus sinceros parabéns a ela, pela forma como construiu todo o curso de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona e também pelo excelente trabalho que está a desempenhar como bastonária da Ordem dos Médicos Veterinários.

Aos meus segundos pais, Anabela Queda e ao Zé Luís, por me terem acolhido em sua casa, por todo o amor e paciência para comigo durante todos estes anos. É algo que nunca esquecerei para o resto da minha vida. Sem dúvida que ambos foram os pilares de todo o meu percurso universitário.

À minha família;

Ao meu avô João, por ser simplesmente como é, " a melhor pessoa do mundo", por me ter ajudado sempre em qualquer circunstância, pelo seu exemplo de como estar na vida. À minha avó, pela preocupação constante que demonstrou, pelos telefonemas e pelas palavras amigas e de incentivo.

À minha Mãe Madalena, por me ter educado com valores que tanto admiro, por nunca me ter falhado com nada, pelo esforço e dedicação, pelo apoio que me deu a em todas as horas. Por

ter tornado a distância de três centenas e meia de quilómetros que nos separavam, num simples descer de rua.

Ao meu pai António, porque muito provavelmente sem ele não tiraria este curso, pois foi dele que herdei toda esta paixão pelos animais, sobretudo pelos equídeos. Obrigado por me teres posto sempre os pés assentes na terra, por me alertares constantemente para todos os perigos da vida através dos teus conselhos, histórias e exemplos.

Ao tio Rui D´Orey, pai do meu melhor amigo Rui (kumbinha), por me ter telefonado aquando da abertura deste curso. Sem a sua ajuda, provavelmente a minha vida teria seguido outro rumo.

Aos meus colegas que, acima de tudo, são meus amigos.

À Maria Horta e Costa, não encontro palavras para descrever o que significa para mim, pois foi sempre uma pessoa fantástica e estará no meu coração para toda a vida.

Ao João Lança, pelo companheirismo, por todas as aventuras (e que aventuras!), passadas juntos ao longo destes anos. Foi e será um grande amigo.

À Dra. Joana Matos por todos os ensinamentos ao longo do estágio e por toda amizade demonstrada. Não poderia ter tido melhor co-orientadora de estágio.

À minha mulher Joana por toda a paciência para comigo durante este árduo percurso.

Resumo

Em Portugal o uso de técnicas de reprodução assistida aumentou exponencialmente nos últimos anos, com especial incidência para a inseminação artificial com sémen refrigerado.

O objetivo desta dissertação para além de rever alguma da bibliografia descrita sobre a inseminação artificial com sémen refrigerado, é também o de calcular a taxa de gestação, de um grupo de 56 éguas, sujeitas a um rigorosos controlo reprodutivo e inseminadas com sémen refrigerado bem como o de determinar a influência das variáveis: altura do ano, ovário ovulatório, raça e idade, sobre a taxa de gestação obtida.

Do total das 56 éguas inseminadas 43 apresentaram diagnóstico de gestação positivo demonstrando uma taxa de gestação de 77%. A análise estatística demonstrou que as variáveis: raça da égua , altura do ano de inseminação (P=0,120), ovário ovulatório (P=0,120), idade da égua (P=0,315) não tiveram influência na taxa de gestação obtida.

Abstract

In Portugal, the use of assisted reproduction techniques has increased exponentially in recent years, with particular emphasis on artificial insemination with cooled semen.

The aim of this thesis was to review the state of the art of artificial insemination with cooled semen and also calculating the pregnancy rate of a group of 56 mares that were, subjected to rigorous reproductive control reproductive and that were inseminated with cooled semen. The aim of this study was also to determine the influence of: insemination season , ovulatory ovarian, breed, and age on the pregnancy rate. Of the total of 56 mares inseminated 43 showed positive pregnancy diagnosis showing a pregnancy rate of 77%. Statistical analysis proved that the variables: age, time of insemination (P = 0.120), ovulatory ovarian (P = 0.120), age (P = 0.315) did not influence the pregnancy rate.

Índice Geral

Agradecimentos v
Resumo vii
Abstract viii
Índice Geral ix
Índice de Figuras xii
Índice de Gráficos, Tabelas e Anexos xiii
Lista de Siglas e Abreviaturas xiv
Introdução 1
1. Anatomia do tracto reprodutivo da égua 2
1.1. Vulva 2
1.2. Períneo 3
1.3. Vagina 3
1.4. Cérvix 4
1.5. Útero 4
1.6. Oviductos 5
1.7. Ovários 6
2.Anatomia do tracto reprodutivo do garanhão. 7
2.1.Pénis 7
2.2.Escroto 8
2.3.Testículos 9
2.3.1. Regulação da temperatura testicular 10
2.4.Epidídimo 10
2.5.Glândulas acessórias 11
2.5.1.Vesícula seminal 11
2.5.2.Próstata 12
2.5.3.Glândulas bulbouretrais 12
2.5.4. Âmpola 12
3.Fisiologia da reprodução 13
3.1.Ciclo reprodutivo da égua 13
3.2. Controlo endócrino da reprodução 14
3.3. Comportamento reprodutivo da égua 16

3.4.Alterações do tracto reprodutivo durante o ciclo éstrico 17
4. Inseminação artificial 18
4.1. História 18
4.2. Vantagens da inseminação artificial 20
4.3. Desvantagens da inseminação artificial 20
4.4.Controlo reprodutivo 21
4.4.1. Avaliação reprodutiva do garanhão 21
4.4.1.1. Exame de estado geral 22
4.4.1.2. Exame do sistema reprodutivo 22
4.4.1.2.1. Exame da genitália externa 22
4.4.1.2.2. Exame da genitália interna 24
4.4.1.3.Critério para passar um garanhão num exame andrológico 24
4.4.1.4. Recolha de sémen 24
4.4.1.5. Avaliação do sémen 25
4.4.1.6. Processamento e armazenamento do sémen refrigerado 26
4.4.2. Avaliação reprodutiva da égua 27
4.4.2.1.Exame de estado geral 27
4.4.2.2. Exame reprodutivo 28
4.4.3. Manipulação do ciclo éstrico 29
4.4.3.1. Encurtamento da fase destro 29
4.4.3.2. Indução da ovulação 29
4.4.4. Timing de inseminação 30
4.4.5. Técnica de inseminação artificial 30
4.4.6. Confirmação da ovulação 31
4.4.7. Diagnóstico de gestação 31
5. Material e métodos 33
5.1. Características da amostra 33
5.2. Metodologia 34
5.2.1. Exame de estado geral 34
5.2.2. Exame reprodutivo 34
5.2.3. Sincronização do ciclo éstrico 35

5.2.3.1. Indução do estro 35

5.2.3.2. Indução da ovulação 36

5.2.4. Inseminação artificial com sémen refrigerado. 37

5.2.5. Avaliação do sémen pós IA 38

5.2.6. Confirmação da ovulação 38

5.2.7. Diagnóstico de gestação 38

6. Resultados 39

6.1. Taxas de Gestação Obtidas 39

6.2. Análise Estatística dos Resultados 41

6.2.1. Influência da época de inseminação 42

6.2.2. Influência do ovário ovulatório 43

6.2.3. Influência da raça 44

6.2.4. Influência da idade 45

7. Discussão e Conclusões 46

Conclusão 49

Bibliografia 49

Anexo 1 57

Índice de Figuras

Figura 1 – Vulva e períneo de uma égua 2

Figura 2 - Vagina e entrada do cérvix de uma égua. 3

Figura 3 -Útero de uma égua 5

Figura 4 -Ovários de uma égua em anéstro (esquerda) e durante a época reprodutiva (direita). 6

Figura 5 -Pénis equino erecto (esquerda), glande do pénis e orifício uretral (centro) e prepúcio (direita). 7

Figura 6 -Testículos de um equino (1), epidídimo (2) e plexo pampiniforme (3)..... 10

Figura 7 -Sazonalidade reprodutiva das éguas no hemisfério norte. 13

Figura 8 -Regulação hormonal durante o ciclo éstrico da égua. Interacção entre a glândula pineal, o hipotálamo, hipófise e ovários 15

Figura 9 -Variações hormonais durante o ciclo éstrico da égua 16

Figura 10 -Égua exibindo reflexo de "Flehmen" (direita) e outra égua com comportamento característico de estro, com a cauda levantada, inversão do clítoris. 17

Figura 11 - Recolha de sémen utilizando um manequim 25

Figura 12 – Entrada da égua na manga de contenção. 35

Figura 13 -Ecografía transrectal 35

Figura 14 -Ecografia de um ovário que apresenta um folículo dominante e pré-ovulatório... 36

Figura 15 -Observação das amostras de sémen ao microscópio óptico. 38

Figura 16 - Diagnóstico de gestação positivo..... 39

Índice de Gráficos, Tabelas e Anexos

Gráfico 1 – Proporção das diferentes raças submetidas a inseminação artificial.. 33

Gráfico 2 - Distribuição das éguas inseminadas por idade. 33

Gráfico 3 -Proporção de éguas inseminadas nas duas épocas do ano (inicio e meio da época reprodutiva). 34

Gráfico 4 - Percentagem de éguas gestantes e não gestantes do total da amostra. 39

Gráfico 5 - Percentagem de as éguas gestantes e não gestantes da raça PSL. 40

Gráfico 6 - Percentagem de éguas gestantes e não gestantes da raça CP. 40

Gráfico 7 - Percentagem de gestantes e não gestantes das éguas que ovularam do ovário esquerdo. 41

Gráfico 8 - Percentagens de gestantes e não gestantes das éguas que ovularam do ovário direito. 41

Gráfico 9 - Comparação entre o número de éguas do grupo 1 e grupo 2 que obtiveram diagnóstico de gestação positivo e negativo. 42

Gráfico 10 -Comparação entre os diagnósticos de gestação positivo e negativo relativamente aos diferentes ovários ovulatórios 43

Gráfico 11 - Comparação dos diagnósticos de gestação entre as diferentes raças. 44

Gráfico 12 -Percentagens de diagnósticos positivos por idade 45

Tabela 1- Protocolo de inseminação artificial…….....37

Anexo 1- Fórmulas usadas no estudo……..57

Lista de Siglas e Abreviaturas

CL - Corpo lúteo

cm - centímetros

CP- Cruzado Português

eCG - Gonodotrofina coriónica equina

FSH - Hormona Folículo-Estimulante

g - grama

GnRH - Hormona Libertadora de Gonadotrofinas

hCG- Gonodotrofina coriónica humana

IA - Inseminação Artificial

IV - administração intra-venosa

LH - Hormona Luteinizante

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetros

ºC- Grau Celsius

PGF2α - Prostaglandina-F-2-alfa

PSI -Puro Sangue Inglês

PSL - Puro Sangue Lusitano

UI - Unidades Internacionais

VA- Vagina artificial

Introdução

A presente dissertação de mestrado tem como objetivo, principal, determinar a influência das diferentes variáveis, raça, altura do ano em que ocorreu a inseminação, idade das éguas e ovário ovulatório sobre a taxa de gestação de um grupo de 56 éguas inseminadas com sémen refrigerado. Todos os dados recolhidos para este estudo advêm das épocas reprodutivas de 2011 e 2012**.**

Para uma melhor compreensão, nesta dissertação também é revista alguma da bibliografia sobre reprodução equina, tentando sempre focar apenas os temas mais importantes ligados à inseminação artificial com sémen refrigerado.

1. Anatomia do tracto reprodutivo da égua

O tracto reprodutivo da égua caracteriza-se por uma estrutura em forma de "y" constituído por vulva, períneo, vagina, cérvix, útero, oviductos e ovários (Getty, 1986).

1.1. Vulva

A Vulva (Figura 1) é a estrutura mais externa do tracto reprodutivo da égua (Getty, 1986; Morel, 2005; Brinsko *et al.*, 2011). Está alinhada pelo plano sagital com o esfíncter anal, e localiza-se aproximadamente 7 centímetros (cm) ventralmente ao ânus, mede cerca de 14 cm (Blanchard *et al*., 2003). A sua porção mais externa é pigmentada e contem glândulas sebáceas, enquanto que a sua porção mais interna é constituída por uma membrana mucosa que se prolonga pela vagina (McKinnon *et al*., 2011). A vulva é formada por dois lábios localizados lateralmente, que se tocam, e que formam uma barreira protectora à entrada da vagina. Na comissura ventral (porção ventral da vulva) localiza-se o clítoris (Getty, 1986; Morel, 2005; Brinsko *et al*., 2011). A região clitórica é bastante propícia ao crescimento e à proliferação de bactérias. Os microorganismos: *Taylorella equigenitalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* são frequentemente encontrados, podendo causar infecções e, por consequência, infertilidade (McAllister e Sack,1990). Nas paredes vulvares localiza-se o músculo constritor da vulva, que permite o encerramento e abertura dos lábios e assim, desempenha uma função protectora. Durante o estro são realizados movimentos vulvares característicos que permitem a exteriorização do clítoris (Ashdown & Done, 2011; brinsko *et al.*, 2011; McKinnon *et al*., 2011).



Figura 1 – Vulva e períneo de uma égua
(Brinsko *et al*., 2011)

1.2. Períneo

O períneo é a área que circunda a vulva e o ânus (Getty, 1986; Morel, 2003; Samper 2007; Brinsko *et al.*, 2011). Uma boa conformação do períneo é essencial para proteger o tracto reprodutivo (Morel, 2003). A má conformação desta área leva à formação de pneumovagina, patologia que se caracteriza pela passagem de ar pela vagina de fora para dentro e vice-versa e que leva ao arrastamento de bactérias juntamente com o ar, expondo o cérvix a um elevado nível de contaminação que, muitas vezes, resulta em infecções que comprometem o sucesso da fertilização (Samper, 2007; McKinnon *et al*., 2011).

1.3. Vagina

A vagina (Figura 2) é um órgão de forma tubular (Englan, 2005; Brinsko *et al.*, 2011) que se estende na horizontal e se localiza entre a vulva e o cérvix. Tem entre 15 e 23cm de comprimento e 10 a 15 cm de diâmetro (Getty, 1986; Morel, 2003; Brinsko *et al*, 2011). É sustentada pela pélvis e a sua porção ventral assenta dorsalmente ao isquio (Morel, 2003). As suas paredes encontram-se, normalmente, colapsadas formando uma barreira estanque (barreira vestibular). O hímen, se presente, divide a vagina numa porção mais craneal (anterior) e outra mais caudal (posterior). O lúmen da vagina é revestido por epitélio estratificado escamoso. Contrariamente a outras estruturas como o cérvix, vestíbulo e útero, a vagina não contém glândulas (Blanchard *et al.*, 2003). No entanto, possui elevada capacidade de dilatação, de forma a facilitar a passagem do neonato durante o parto (Brinsko *et al.*, 2011).

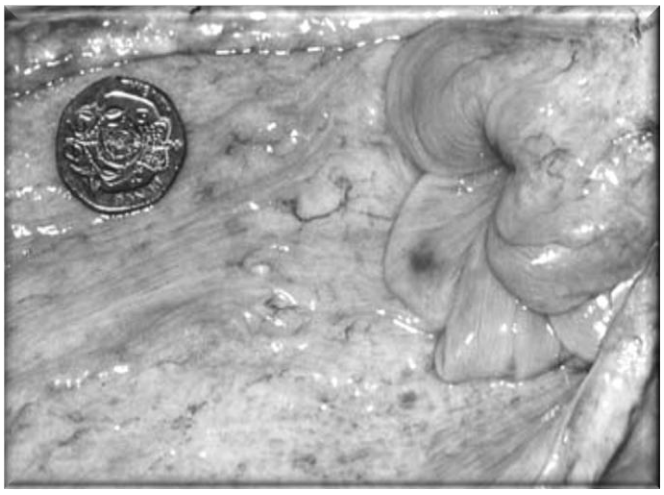


Figura 2 - Vagina e entrada do cérvix de uma égua.
(Morel, 2005)

1.4. Cérvix

O cérvix é um órgão fibroso, composto por tecido conjuntivo e pequenas porções de tecido muscular liso (Hafez & Hafez, 2004). Possui uma mucosa mais pálida que a mucosa uterina (Ley, 2006). Estende-se da vagina até ao corpo do útero, tem o comprimento médio de 6 cm e o diâmetro de 3 cm. (Brinsko *et al.*, 2011; Carleton & Nie, 2011). O lúmen do cérvix permanece fechado, excepto durante o estro, altura em que relaxa de forma a permitir a passagem dos espermatozóides para o útero. (Hafez & Hafez, 2004).

O seu epitélio possui glândulas secretoras de muco, que é menos espesso durante o estro ,de forma a lubrificar e facilitar a passagem de espermatozóides para o útero, ou mais espesso durante o diestro e durante a gestação , facilitando a oclusão cervical de modo a prevenir a entrada de bactérias (Brinsko *et al.*, 2011).É considerado a barreira final da contaminação uterina e o seu tónus altera-se durante as várias fases do ciclo éstrico(Hafez & Hafez, 2004; England, 2005; Morel, 2005; Brinsko *et al.*, 2011). Contrariamente a outras espécies, o cérvix das éguas é constituido unicamente por pregas longitudionais (Morel, 2005).

1.5. Útero

O útero é um orgão em forma de "t" ou "y" (England, 2005). Liga-se caudalmente ao cérvix e cranealmente aos oviductos (Morel, 2003) . É constituido por um corpo que cranealmente se bifurca em dois cornos (Figura 3). O comprimento do corpo uterino varia entre 12 e 20 cm. Inicia-se na cavidade pélvica e termina na cavidade abdominal (Getty, 1986; Morel, 2003; Carleton & Nie, 2011). Os cornos uterinos estão totalmente incorporados na cavidade abdominal e o seu comprimento pode variar entre 15 e 30 cm (Getty, 1986; Morel, 2003; England, 2005; Carleton & Nie, 2011) e à medida que eles se aproximam dos oviductos vão ficando mais estreitos . O tamanho do útero tende a variar consoante a idade e/ou o número de gestações prévias, sendo que éguas multíparas tendem a ter um útero de maior dimensão (Morel, 2005; Brinsko *et al.*, 2011). O ligamento largo liga o corpo e os cornos uterinos à parede abdominais e pélvica (Ley, 2006). Quanto á vascularização, o útero é irrigado pelo ramo uterino da artéria vaginal, pela artéria uterina e pelo ramo uterino da artéria ovárica. A drenagem venosa é efectuada pelo ramo uterino da veia ovárica (Ley, 2006; Carleton & Nie , 2011).

O interior do útero é muito vascularizado e a sua parede é constituída por 3 camadas distintas: perimétrio (serosa), miométrio (muscular) e endométrio (mucosa). A camada mais externa é o perimétrio, que é composto por mesotélio e tecido conjuntivo; contudo, em algumas porções

do órgão, o perimétrio é constituído unicamente por tecido conjuntivo, adventícia (Junqueira & Carneiro, 2004). O miométrio é a camada intermédia e é constituído por fibras musculares que conferem ao útero capacidade de expansão durante a gestação, bem como a força necessária para a expulsão do neonato durante o parto. O endométrio é a camada mais interna do útero e é constituído por epitélio de revestimento, estroma e glândulas endometríais (Cantuaria *et al*., 1998). A actividade e a aparência deste variam consoante as alterações hormonais que vão ocorrendo durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo da égua. (England, 2005; Morel, 2005; Ashdown & Done, 2011).O exame histológico do endométrio é extremamente importante para a avaliação da função reprodutora (Morel, 2003; Brinsko *et al.*, 2011; Carleton & Nie, 2011).



Figura 3 -Útero de uma égua
(Carleton & Nie, 2011)

A composição bioquímica e o volume do fluido uterino apresentam variações durante o ciclo éstrico. Estas variações ocorrem devido às alterações morfológicas das glândulas endometriais durante o referido ciclo. A principal causa destas alterações é o aumento dos níveis de progesterona produzida pelo corpo lúteo (Hafez & Hafez, 2004).

1.6. Oviductos

Os oviductos ou trompas de Falópio são estruturas tortuosas que ligam ambos os cornos uterinos aos respectivos ovários e transportam o óocito e os espermatozóides. O seu comprimento varia entre 20 a 30cm (Getty, 1986; England, 2005; Carleton & Nie, 2011). O seu diâmetro vai aumentando cranealmente, sendo que, junto aos cornos uterinos, os oviductos apresentam 2 a 5mm e, junto aos ovários, o seu diâmetro atinge entre 5 a 10mm (Morel, 2003). Estão ligados à parede abdominal pela mesosalpinge. São divididos em três porções: istmo, ampola e infundíbulo. O infundíbulo liga-se cranealmente à face lateral do ovário e durante a ovulação, envolve a fossa de ovulação de forma a facilitar a entrada do óocito no oviducto. Na ampola é onde ocorre a fertilização do óocito. O óocito fertilizado é

transportado através do istmo para o útero por leves contracções musculares (Getty, 1986; Morel, 2005).

1.7. Ovários

Os ovários são as estruturas mais anteriores do tracto reprodutivo da égua não gestante (Blanchard *et al.*, 2003). São em número par, bilaterais, localizam-se caudalmente aos rins e ventralmente à quarta ou quinta vértebra lombar (Getty, 1986). O ovário esquerdo é cerca de 2 cm mais caudal que o ovário direito (Getty, 1986; Morel, 2003; Brinsko et al., 2011). Estruturalmente, assemelham-se a um feijão e são maiores que na maioria das espécies domésticas (Carleton & Nie, 2011).Têm duas faces, dois bordos e duas extremidades. As faces medial e lateral são lisas e arredondadas. O bordo anterior (convexo) encontra-se ligado à parede abdominal por uma prega de peritoneu chamada mesovário que é parte constituinte do ligamento largo, enquanto que o bordo posterior é livre (Getty, 1986). A extremidade craneal está coberta pelas fímbrias e relacionada com o ligamento suspensor do ovário. A extremidade caudal encontra-se ligada ao útero pelo ligamento ovárico (Getty, 1986; Hafez & Hafez, 2004).

Tanto o tamanho como a forma dos ovários podem variar, de acordo com a actividade ovárica. Apresentam maiores dimensões durante a época reprodutiva e menores durante o periodo de anestro (Hafez & Hafez, 2004; Morel, 2005) (Figura 4). As artérias que irrigam os ovários derivam da artéria ovárica que penetra no ovário pelo seu bordo anterior. A drenagem venosa é efectuada pela veia ovárica, que conjuntamente com os seus ramos formam um grande plexo venoso similar ao do cordão espermático (Getty, 1986).

Os ovários apresentam tanto funções exócrinas (formação de gâmetas) como endócrinas (produção de hormonas) (Morel, 2003; Hafez & Hafez, 2004; Brinsko *et al.*, 2011).



Figura 4 -Ovários de uma égua em anestro (esquerda) e durante a época reprodutiva (direita). (Morel, 2005)

2.Anatomia do tracto reprodutivo do garanhão.

2.1.Pénis

O pénis equino é um órgão de forma cilíndrica, composto maioritariamente por tecido eréctil. Estende-se desde o arco isquiático até à região umbilical, ventralmente à parede abdominal (Getty, 1986; Hafez & Hafez, 2004). Quando não erecto, mede cerca de 50 cm de comprimento e 3 a 5 cm de diâmetro e quando erecto, pode duplicar o seu tamanho (Getty, 1986; Hafez & Hafez, 2004). É constituído por raiz, corpo e glande. A raiz está unida às faces laterais do arco isquiático (Getty, 1986). O corpo tem origem na sínfise isquiática onde é suportado pelos dois ligamentos suspensores do pénis. Apresenta quatro superfícies: duas superfícies laterais, cobertas por um grande plexo venoso; a superfície uretral (ventral), onde passa a uretra; e o dorso do pénis, onde estão inseridas as artérias dorsais, bem como um rico plexo venoso (Getty, 1986; Hafez& Hafez, 2004; Brinsko *et al.*, 2011). Quando o pénis não está erecto a glande está protegida por uma espessa camada de pele que se dobra sobre si mesma , o prepúcio. A glande é a porção livre do pénis. A sua superfície craneal é convexa e no seu centro encontra-se uma depressão profunda denominada óstio ou orifício ureteral, que mede cerca de 5 mm. Neste último reside a saída da uretra (Getty, 1986; Hafez & Hafez , 2004) (Figura 5).



Figura 5 -pénis equino erecto (esquerda), glande do pénis e orifício uretral (centro) e prepúcio (direita). (Brinsko, 2011)

Estruturalmente o pénis é formado por dois corpos erécteis: o corpo cavernoso (maioria) e o corpo esponjoso. (Getty, 1986; Hafez & Hafez, 2004; Morel, 2005): O corpo cavernosos é

uma estrutura cilíndrica formada por numerosas trabéculas localizado na porção dorso-lateral, e quando se enche de sangue ocorre a erecção.

Corpo esponjoso: localiza-se ventralmente envolvendo a uretra. Estruturalmente é idêntico ao corpo cavernoso embora as trabéculas sejam mais finas. Dilata-se na sua extremidade distal, formando a glande do pénis (Getty, 1986; Junqueira & Carneiro, 2004).

O pénis possui 2 músculos principais:

- O músculo isquiocavernoso, em número par. Tem origem na tuberosidade isquiática e insere-se no corpo do pénis. A sua função é a de manter a erecção por compressão das veias penianas dorsais (Getty, 1986).
- O músculo retractor do pénis tem origem nas primeiras vértebras caudais, passa ventralmente ao recto e prolonga-se até à superfície ventral do pénis, onde se liga. Tem como função retrair o pénis para dentro do prepúcio, após a erecção (Getty, 1986).

O pénis é irrigado por 3 artérias: a pudenda interna, a obturadora e a pudenda externa. A drenagem venosa é efectuada pelas respectivas veias, que formam um rico plexo venoso que se localiza na superfície dorsal e lateral do pénis (Getty, 1986).

2.2.Escroto

O escroto apresenta uma forma globular e é ligeiramente pendular (característica que se vai acentuando ao longo da vida do garanhão) (Getty; 1986; Hafez & Hafez 2004; Carleton & Nie, 2011). É onde estão contidos os testículos e as suas estruturas adjacentes (Figura 6). A forma e a aparência escrotal variam de acordo com a condição do tecido muscular subcutâneo. O músculo subcutâneo contrai, quando o animal é exposto ao frio, de forma a que o escroto se retraia e fique mais grosso e enrugado. Pelo contrário, quando o animal está sujeito ao calor e/ou apresenta fadiga, a musculatura relaxa tornando o escroto mais pendular (Getty, 1986; Hafez & Hafez, 2004). O escroto é constituído por 4 camadas distintas: pele, túnica dartus, *fascia* escrotal e camada parietal da túnica vaginal. A pele do escroto contém inúmeras glândulas sudoríparas e sebácias, apresentando uma rafe mediana (Getty, 1986; Hafez & Hafez & Hafez, 2004; Morel, 2005). A túnica dartus é formada por tecido fibroelástico e tecido muscular liso e adere á pele, excepto dorsalmente. Ao longo da rafe mediana forma um septoque divide o escroto em dois compartimentos (Getty, 1986; Carleton & Nie, 2011). A *fascia* escrotal deriva do músculo oblíquo abdominal e é costituida por 3 camadas distintas: (1) a *fascia* espermática externa; (2) a *fascia* cremastérica externa; e (3) a *fascia* espermática

interna. A camada parietal da túnica vaginal é a camada mais profunda do escroto (Getty, 1986).

2.3.Testículos

Os testículos têm duas funções principais: a espermatogénese e a esteroidogénese (Cunningham & Klein, 2007). Como referido anteriormente, estão inseridos nas bolsas escrotais e localizam-se na região pré-púbica (Getty, 1986; Carleton & Nie, 2011). Estruturalmente apresentam duas faces, dois bordos e duas extremidades (craneal e caudal). Tanto a face lateral como a medial são convexas. Contudo, esta última é ligeiramente mais plana e contacta com o septo escrotal. O bordo livre ou ventral é convexo, enquanto que o bordo epidídimal ou dorsal é mais aplanado. É no bordo epidídimal do testículo que se liga o cordão espermático (Getty, 1986; Hafez & Hafez, 2004).

Os testículos medem entre 4 a 7 cm de largura, 5 a 6 cm de altura e 6 a 12 cm de comprimento (Getty, 1986; Morel, 2003). O tamanho testicular aumenta até aos 5 anos de idade, altura em que, por norma, os equinos param de crescer (Morel, 2003). O tamanho dos testículos varia consideravelmente de animal para animal e normalmente o esquerdo é maior que o direito (Getty, 1986). O peso dos dois testículos pode variar, embora o peso normal esteja compreendido entre 250 a 350 grama (g) (Getty, 1986; Morel, 2003; Hafez & Hafez, 2004). A maior parte da superfície testicular é coberta pela túnica vaginal que, por sua vez, é encapsulada pela túnica albugínea que envia trabéculas para dentro do parênquima testicular, formando lóbulos (Hafez & Hafez, 2004; Reece, 2009). O parênquima testicular é composto por tecido intersticial e pelos tubos seminíforos. O tecido intersticial tem como principais componentes os fibroblastos e as células de Leydig que são responsáveis pela produção de testosterona (Getty, 1986; Hafez & Hafez, 2004; Junqueira & Carneiro, 2004; Morel, 2005; Reece, 2009). As células de Sertoli, conjuntamente com as células germinativas, localizam-se no epitélio que reveste os tubos seminíforos e são fundamentais à espermatogénese (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os testículos são irrigados pela artéria testicular (ramo da aorta abdominal), que desce cranealmente ao cordão espermático até se inserir no testículo pelo bordo epidídimal. A drenagem venosa é efectuada pelo plexo pampiniforme, que conflui dando origem á veia testicular que, no lado esquerdo, se une á veia renal esquerda e, no lado direito, á veia cava caudal (Getty, 1986 ; Morel, 2003; Hafez & Hafez, 2004).

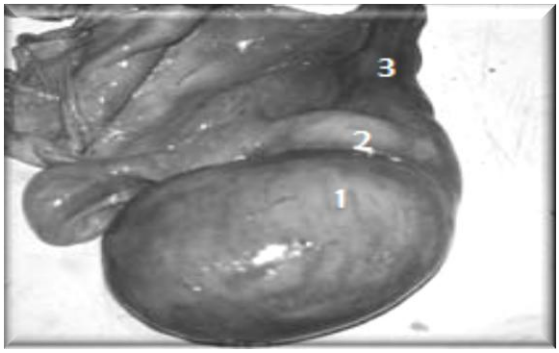


Figura 6 -testículos de um equino (1), epidídimo (2) e plexo panpiniforme (3).
(Morel, 2005)

2.3.1. Regulação da temperatura testicular

A temperatura testícular varia entre 33 e 36 graus Celsius (ºC). Os testículos devem-se manter entre 2 a 6ºC abaixo da temperatura corporal, de forma a não afectar a espermatogénese e a esteroidogénese (Hafez & Hafez, 2004)

A manutenção da temperatura testicular depende de vários factores, como por exemplo: a temperatura ambiente e corporal, a postura do animal, as alterações anatómicas na forma e integridade do escroto e a condição corporal (Morel, 2003).

A termoregulação é efectuada por diversos mecanismos. O músculo cremáster e a túnica dartus, relaxam ou contraem, consoante a temperatura ambiente, afastando ou aproximando os testículos do corpo. Quanto mais pendular estiver o escroto e quanto maior for a distância ao corpo, maior será a superfície exposta ao meio ambiente o que promove o arrefecimento testicular (Blanchard *et al.*, 2003; Morel, 2003). O escroto possui uma pele pouco espessa, contém pouca camada adiposa e possui inúmeras glândulas sudoríparas (Getty, 1986) ajudando à menor temperatura testicular. O facto de o plexo pampiníforme envolver a artéria espermática leva, ainda, a um mecanismo de contra-corrente, onde ocorre perda de calor por irradiação (Getty, 1986; Hafez & Hafez, 2004; Samper, 2009).

2.4.Epidídimo

É uma estrutura tubular. Localiza-se ao longo do bordo dorsal dos testículos extendendo-se até as extremidades. É constituído por tecido conjuntivo e tecido muscular. Subdivide-se em

cabeça, corpo e cauda (Getty, 1986; Morel, 2003; Brinsko *et al.*, 2011). A cabeça do epidídimo encontra-se ligada à rede testis por inúmeros túbulos, que se prolongam pelo corpo do epidídimo, anastomosando-se sucessivamente até confluírem num único túbulo, na cauda do epididimo, o ducto deferente (Getty, 1986; Carleton & Nie, 2011).

O epidídimo tem como função armazenar e maturar os espermatozóides oriundos dos testículos e é lá que os espermatozóides adquirem mobilidade e a capacidade de fecundação (Samper, 2009).

2.5.Glândulas acessórias

A próstata, as glândulas bulbouretrais, as vesículas seminais e ampola são consideradas as quatro glândulas acessórias. Estas localizam-se entre o término do ducto deferente e a raiz do pénis (Getty, 1986; Morel, 2003; Hafez & Hafez, 2004; Carleton & Nie, 2011). As quatro glândulas juntas excretam a parte líquida do sémen (plasma seminal). O plasma seminal fornece a energia e os nutrientes necessários para a sobrevivência dos espermatozóides e ajuda no seu transporte ao longo do tracto reprodutivo da égua (Morel, 2003; Hafez & Hafez, 2004).

2.5.1.Vesícula seminal

É uma glândula parque se localiza em ambos os lados da bexiga. Tem um comprimento de 8 a 20 cm e um diâmetro de 2 a 5 (Getty, 1986; Carleton & Nie, 2011) .Apresenta uma forma lobada e é a principal glândula excretora de plasma seminal. A quantidade excretada de plasma seminal é directamente proporcional à concentração de testosterona em circulação. Fora da época reprodutiva a sua actividade é reduzida (Morel, 2005; Thompson & Marke, 2006).

2.5.2.Próstata

A próstata é uma glândula bilobada que se conecta com a uretra e se localiza entre as glândulas bulbouretrais e a ampola. Produz secreções que contribuem significativamente para a constituição do pré-ejaculado (Cunningham & Klein, 2007).

2.5.3.Glândulas bulbouretrais

As glândulas bulbouretrais, também denominadas por glândulas de Cowper, são glândulas acessórias, pares, que se localizam em ambos os lados da uretra, perto do arco isquiático (Brinsko *et al*., 2011). Possuem ductos por onde se conectam à uretra. Medem entre 2 a 3 cm e apresentam uma forma oval. Produzem o pré-ejeculado, que tem como função a lubrificação da uretra, bem como eliminar vestígios de urina e quaisquer matérias estranhas, facilitando assim a passagem de espermatozóides antes da ejaculação (Carleton & Nie, 2011).

2.5.4. Âmpola

A âmpola é uma dilatação da porção final do ducto deferente, antes de este se conectar à uretra. As secreções produzidas na âmpola compõem uma fracção do pré-ejaculado. São ricas num agente antioxidante, que previne a oxidação de alguns compostos químicos do sémen (Morel, 2005).

3.Fisiologia da reprodução

3.1.Ciclo reprodutivo da égua

A égua é um animal poliéstrico sazonal, pois apresenta ciclos éstricos consecutivos dentro de uma determinada época do ano. O ciclo reprodutivo anual é dividido em duas fases: ovulatória e anovulatória (anestro), interligadas por 2 períodos denominados por período de transição de Primavera e Outono (Figura 7) (Nagy *et al.*, 2000; Morel, 2005; Brinsko *et al.*, 2011).

No hemisfério Norte, a época ovulatória da égua situa-se entre a Primavera e o Outono (Morel, 2005; Brinsko *et al.*, 2011). No início da primavera, devido ao aumento do fotoperíodo e à consequente diminuição da concentração de melatonina, os ovários iniciam a sua actividade. Contudo, o crescimento folicular tende a ser irregular. A este período chama-se transição de primavera (Hansen, 1985; Morel, 2005).

A época reprodutiva/ovulatória inicia-se, assim, quando o desenvolvimento de um folículo culmina na primeira ovulação. A partir daí, as éguas tendem a manifestar ciclos éstricos consecutivos (England, 2005). No início do Outono a actividade sexual das éguas diminui. Estas, tendem a desenvolver folículos de tamanho pré ovulatório, que contudo, não se traduzem em ovulação. Este período (transição de Outono) culmina com o início do anestro. O anestro é um período de inactividade sexual, sendo que no dia 21 de Dezembro (dia mais curto do ano) a maioria das éguas encontram-se em anéstro profundo. A sua duração varia entre 2 e 6 meses. Em anestro, as éguas apresentam folículos pequenos com um diâmetro inferior a 20 milímetros (mm) (Morel, 2005; Brinsko *et al.*, 2011).

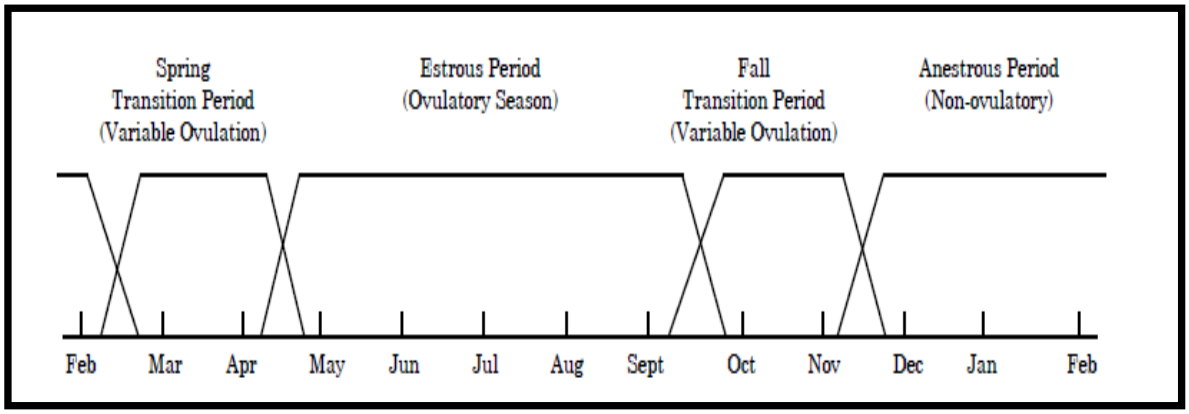


Figura 7 -Sazonalidade reprodutiva das éguas no hemisfério norte. (Anderson, 2011)

O ciclo éstrico é o período correspondente ao intervalo entre uma ovulação e a ovulação subsequente. É dividido em duas fases distintas; fase folicular ou estro e fase lútea ou diestro (Blanchard *et al.*, 2003). Já Daels e Hughes (1993) definem o ciclo éstrico como a sequência repetitiva de eventos que preparam a égua para a concepção (McKinnon et al., 2011). O estro é definido como o período de tempo em que a égua apresenta receptividade sexual. Durante este período, o aparelho reprodutor da égua encontra-se preparado, tanto anatómica como fisiologicamente, para transportar o sémen do útero até aos oviductos. Entre as 24 e 36 horas do final do estro ocorre a ovulação. O diestro é caracterizado por um período onde já não há receptividade sexual por parte da égua. O aparelho reprodutor nesta fase encontra-se preparado para o desenvolvimento embrionário, caso ocorra a fertilização. O diestro termina com a regressão do corpo lúteo (Brinsko *et al.*, 2011).

O ciclo éstrico dura em média 21 dias. A duração deste período pode variar entre indivíduos e depende de vários factores como a sazonalidade, a idade da égua e o número de partos (Blanchard *et al.*, 2003).

Os ciclos éstricos tendem a ser mais longos no início da época reprodutiva em éguas mais velhas. De uma maneira geral, estas variações acontecem durante a fase de estro e não na de diestro, que tende a ser mais constante. Assim, se a duração de um ciclo for de 20 dias, normalmente apresenta 5 dias de estro e 15 de diestro; se for de 26 dias, apresenta 15 dias de diestro e 11 de estro (Ginther, 1992).

3.2. Controlo endócrino da reprodução

As hormonas responsáveis pelo controlo do ciclo éstrico são produzidas pelo hipotálamo, pela hipófise, pelos ovários e pelo útero (Cunningham & Klein , 2007).

À interacção entre o hipotálamo, a hipófise e os ovários chama-se de eixo hipotalâmico-pituitária-gonodal. Por sua vez, o eixo hipotalamico-pituitária-gonodal é controlado pelo fotoperíodo (Figura 8). O tempo de luz diário é inversamente proporcional à produção de melatonina por parte da glândula pineal. A melatonina, que é produzida em maior quantidade durante a noite, inibe a produção hipotalâmica da hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH) (Morel, 2003). Assim, quando os dias são mais curtos, há maior produção de melatonina o que inibe o eixo hipotalâmico-pituitária-gonodal. Pelo contrário, em dias mais longos, há menor secreção de melatonina o que leva á activação do eixo e ao consequente aumento da produção e secreção de GnRH por parte do hipotálamo (Ginther, 1992).

A GnRH, quando em circulação, estimula a hipófise anterior a produzir a hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH) (Ginther, 1992; England, 2005; Brinsko *et al.*, 2011).

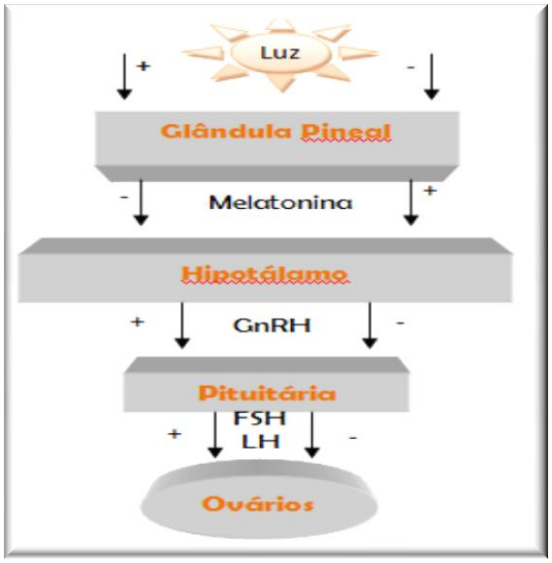


Figura 8 -Regulação hormonal durante o ciclo éstrico da égua. Interacção entre a glândula pineal, o hipotálamo, hipófise e ovários

A FSH é responsável pelo desenvolvimento dos folículos ováricos e é libertada em circulação de forma bifásica, levando a que ocorram dois picos de concentração ao longo do ciclo éstrico (Evans & Irvine, 1975). O primeiro pico, com menor concentração de FSH, ocorre entre os dias 9-12, enquanto que o segundo, e com maiores concentrações, ocorre durante a ovulação. Os folículos ováricos desenvolvem-se ao longo dos 21 dias do ciclo éstrico. O seu desenvolvimento inicia-se após a ovulação (dia 0), é impulsionado pelo primeiro pico de FSH entre o dia 9 e 12 e culmina com o segundo pico de FSH na ovulação. À medida que os folículos se vão desenvolvendo, produzem estrogénio que é responsável pelos comportamentos sexuais das éguas (Morel, 2005).

O aumento da concentração de estrogénio ocorre no início do estro. Quanto maior o tamanho dos folículos, maior a produção de estrogénio, consequentemente, a sua máxima concentração é atingida antes da ovulação (24 a 48 horas antes) (Morel, 2003).

A concentração de LH começa a aumentar logo após o aumento dos níveis de estrogénio (Figura 9). O aumento da concentração de LH leva a que o folículo de maiores dimensões, (folículo dominante), acabe por ovular (Mckinnon, 2011).

Após a ovulação, ocorre a formação do corpo lúteo (CL) que, por sua vez, produz progesterona, inibindo a produção de LH e FSH. A sua concentração aumenta durante os primeiros dias, atingindo o seu pico (6 a 10 ng/ml) ao 6º dia após a ovulação. Em éguas gestantes, os seus níveis mantêm-se elevados durante meses, enquanto que em éguas não

gestantes, mantêm-se até ao dia 14-16 de diestro acabando por baixar 4 a 5 dias antes da próxima ovulação (Samper, 2009).

A diminuição da concentração de progesterona em éguas não gestantes é provocada pela porstaglandina-F-2-alfa (PGF2α) que é libertada pelo útero quando não há reconhecimento materno da gestação, o que acontece por volta dos dias 14-16 de diestro, provocando a lise do corpo lúteo (England, 2005; Samper, 2009).

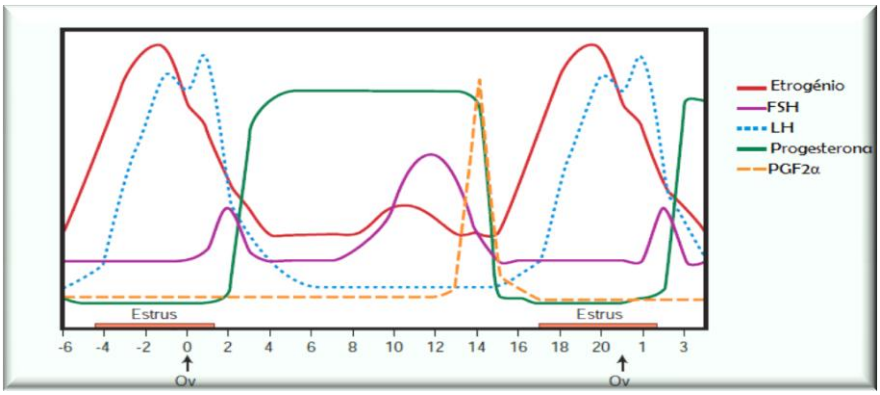


Figura 9 -Variações hormonais durante o ciclo éstrico da égua
(Brinsko *et al.*, 2011)

3.3. Comportamento reprodutivo da égua

Durante o estro, e devido à produção de estrogénio pelos folículos em desenvolvimento, a égua desencadeia uma série de comportamentos sexuais característicos. Uma égua em estro tende a procurar o garanhão e, na sua presença, a égua adquire uma postura que se caracteriza pelo ligeiro afastamento dos membros posteriores, com abaixamento da região pélvica e pela elevação dorso-lateral da cauda e, consequente, exposição da zona perineal. Movimentos vulvares ritmados de inversão do clítoris são frequentes e são denominados na gíria por movimentos de "pisca-pisca" (Crowell-Davis, 2007; Rickets, 2008). Durante esta fase, também é normal que a égua urine frequentemente. A urina resultante destas micções apresenta um odor característico, uma aparência amarelada e brilhante, resultante da elevada quantidade de muco produzida durante este período (Morel, 2005). A cabeça ligeiramente baixa, bem como, as orelhas voltadas para trás são frequentemente observadas em éguas durante a fase de estro. Podem também exibir o "reflexo de Flehmen" (Figura 10), que se caracteriza pela elevação do lábio superior (Crowell-Davis, 2007) .

Durante a fase de diestro, e devido à produção de progesterona pelo CL, o comportamento sexual é inibido. A égua adquire uma postura agressiva perante o garanhão de forma a impedir os seus avanços. É comum observar-se a égua com as orelhas voltadas para trás bem

como tensão nos seus músculos faciais. É comum que a égua relinche, desfira coices e mordidelas em direcção ao garanhão (Crowell-Davis, 2007; Rickets, 2008).



Figura 10 -Égua exibindo reflexo de "Flehmen" (direita) e outra égua com comportamento característico de estro, com a cauda levantada, inversão do clítoris.
(www.extension.org)

3.4.Alterações do tracto reprodutivo durante o ciclo éstrico

Durante o estro, o aumento da concentração de estrogénio leva a alterações anatomo-fisiológicas do tracto reprodutivo da égua. Estas alterações caracterizam-se por edema e hiperémia da vulva e da vagina bem como o relaxamento do cérvix. Este último apresenta-se com uma textura suave de cor rosácea, húmido, caído sobre o chão da vagina e com o seu lúmen aberto. Nesta mesma fase, observa-se um aumento do edema uterino que é facilmente visualizado à ultrasonografia trans-rectal (Samper, 2009). Carnevale & Cox dizem ainda que quando ocorre o pico de estrogénio, um padrão ecográfico uterino característico é observado. Este padrão é vulgarmente descrito como "gomos de laranja", dado ao facto de, ecograficamente, o edema das pregas endometriais ser semelhante a gomos de laranja (Carnevale & Cox, 2008).

Na fase de diestro, o aumento da concentração da progesterona e a diminuição da concentração de estrogénio, promovem novamente alterações anatomo-fisiológicas no tracto reprodutivo das éguas. O grau de edema da vulva e da vagina diminui. O cérvix nesta fase apresenta-se longo, firme e fechado, posicionado no centro da vagina e tem um aspecto pálido e seco. O útero adquire um tónus e uma textura firme. Ecograficamente não é visível o padrão

de "gomos de laranja" devido á diminuição do edema das pregas do endométrio (Morel, 2005).

4. Inseminação artificial

4.1. História

A inseminação artificial (IA) foi a primeira biotecnologia aplicada à reprodução animal com o intuito de melhorar os índices reprodutivos e genéticos dos animais. A aceitação mundial da IA impulsionou o desenvolvimento de outras biotecnologias: criopreservação de embriões e oócitos, sexagem de espermatozóides, transferência de embriões, clonagem, manipulação dos ciclos éstricos, etc. Já os árabes roubavam sémen de garanhões de grupos rivais para inseminar as suas próprias éguas. Em 1678, Leeuwenhoek e o seu assistente Hamm foram as primeiras pessoas a observar o sémen e a identificar os espermatozóides. Em 1784, o italiano Spallanzani, que embora tenha estudado para ser sacerdote, nutria um grande interesse por história natural e realizou a primeira IA numa cadela, que pariu três cães 62 dias depois. Em 1897, Heape, biólogo ligado à reprodução, documentou conjuntamente com outros biólogos de diferentes países o uso da IA em coelhos, cães e cavalos. Os estudos de Heape foram fundamentais para a correlação entre a sazonalidade e a reprodução, levando assim a universidade de Cambridge, onde trabalhava, a ser o centro mundial de estudos reprodutivos. O país pioneiro a esforçar-se para que a IA se tornasse num procedimento prático e corrente foi a Rússia por influência de Ivanoff. Em 1907, Ivanoff já tinha feito IA em cães, coelhos, raposas e aves. Em 1922 foi publicado um estudo em inglês que documentava as suas experiências, principalmente em IA de cavalos (Ivanoff, 1922). Ivanoff desenvolveu diluidores para preservar o sémen, bem como técnicas avançadas de selecção de garanhões de forma a obter um melhoramento genético através da IA. Em 1964 Milovanov publicou um documento onde descrevia projectos de criação de gado utilizando IA. Ele próprio projectou e concebeu instrumentos para a realização da IA, muitos desses ainda usados hoje em dia, como por exemplo a vagina artificial (VA). Milovanov e a sua vagina artificial (VA) contribuíram para uma enorme melhoria no método de recolha de sémen, que na altura era feito através de esponjas colocadas na vagina das fêmeas. Os trabalhos de Ivanoff também serviram como impulsionadores para a pesquisa fora da Rússia. O cientista japonês Nishikawa, que estudou com Ivanoff, de volta ao Japão em 1912, iniciou um programa idêntico ao implementado na Rússia em cavalos, levando assim a que se iniciasse a implementação da IA em vacas, ovelhas, cabras e suínos no país nipónico (Foote, 2002). Outros cientistas trabalharam com

Nishikawa neste grande projecto nomeadamente Ito, Niwa, Sato e Yamane. Contudo, como a maioria das pesquisas foram publicadas em japonês e dado o facto de, naquela altura poucas pessoas ocidentais dominarem a língua nipónica, pouco se soube acerca desses estudos nos países ocidentais. Os estudos desenvolvidos no Japão só se deram a conhecer ao mundo quando Niwa em 1958, e Nishikawa em 1962, 1964 e 1977, os traduziram e resumiram para inglês. O inglês Walton publicou o primeiro livro sobre IA (Foote, 2002). Este mesmo Walton realizou inúmeras experiências na área da reprodução assistida e foi o pioneiro na exportação de sémen. Walton enviou sémen ovino para a Polónia, sémen esse que viria a ser utilizado com sucesso na inseminação de uma ovelha dois dias após a sua recolha. Contudo, a comercialização e exportação de sémen no Reino Unido não evoluiu de forma rápida. Em meados de 1900, no Royal College de Copenhaga, Sorensen já tinha realizado vários estudos e experiências sobre IA, sobretudo em equinos. Familiarizado com os progressos de Ivanoff, juntamente com o seu colega Gylling-holm formou, em 1936, a primeira organização cooperativa de IA em bovinos de leite na Dinamarca. Este programa incorporava 1070 vacas leiteiras e obteve 59% de taxa de concepção logo no seu primeiro ano, valor esse superior ao obtido com monta natural. Estes resultados serviram como forte estímulo ao desenvolvimento da IA em bovinos de leite, tanto nos Estados Unidos como em outros países ocidentais. Estes veterinários dinamarqueses estabeleceram uma técnica de inseminação transcervical que permite que o sémen seja depositado profundamente no cérvix ou no corpo uterino. Este procedimento foi de enorme importância e teve uma aceitação global, pois requer uma quantidade mínima de sémen por inseminação. Outra grande invenção dinamarquesa foi o cateter de inseminação, também desenvolvido por Sorensen em 1940 (Sorensen, 1940). Posteriormente, em 1956, o cientista francês Cassou, após ter observado os cateteres de Sorensen e inspirando-se nas palhetas de celofane utilizadas pelas crianças para beber refrigerantes numa festa de aniversário de uma de suas filhas, conclui o seguinte: "encontrei a palheta ideal". Em 1964, as palhetas de Cassou já eram comercializadas e utilizadas em todo o mundo. Sendo assim, o modelo francês dos cateteres de inseminação ficou conhecido como o modelo dinamarquês modificado (Foote, 2002). Bonadonna, cientista italiano, entusiasta dos benefícios da inseminação artificial, juntamente com o sueco Lagerlof organizaram em 1948 o primeiro congresso sobre IA e reprodução animal que se realizou em Milão. Este congresso viria a repetir-se de 4 em 4 anos até aos dias de hoje. Lagerlof ficou conhecido na Suécia pelos seus estudos sobre infertilidade em touros. Ele próprio constituiu um grupo a nível mundial que visava dar formação a veterinários acerca dos vários aspectos da fertilidade e da IA. Estas formações organizadas pelos escandinavos, bem como o fluxo constante de

publicações, contribuíram para o desenvolvimento em larga escala da IA em bovinos de leite nos Estados Unidos na década de 40. A partir daí, os Estados Unidos tornou-se o país mais empenhado em desenvolver estudos acerca da IA, estudos esses que culminaram com novas técnicas e novos materiais para IA. De uma maneira geral, os procedimentos desenvolvidos nos Estados Unidos desde então são praticados pelo mundo fora (Foote, 2002).

4.2. Vantagens da inseminação artificial

- O uso da IA quebra as barreiras geográficas pois permite a disseminação de germoplasma de garanhões selecionados e o seu transporte à distância (Tischner, 1992).
- Minimiza a transmissão de doenças, tanto venéreas como sistémicas, dado o facto de não haver contacto directo entre o garanhão e a égua (Tischner, 1992).
- Permite a adição de antibióticos aos diluidores fazendo com que diminua drasticamente o potencial patogénico dos microrganismos presentes no sémen (Clement *et al*., 1993).
- Reduz o risco de lesões tanto da égua como do garanhão, bem como, dos veterinários e/ou assistentes (Morel, 2003).
- Com apenas uma ejaculação é possível inseminar várias éguas, aumentando assim a eficiência reprodutiva do garanhão (Morel, 2003).
- Aumenta os índices de fertilidade devido a um maior controlo sobre a qualidade do sémen e da sanidade reprodutiva das éguas (Morel, 2003).
- Permite o desenvolvimento de bancos genéticos que possibilitam a preservação do germoplasma do garanhão em caso de doença ou morte (Zafracas, 1994).
- Facilita a reprodução de éguas e garanhões com problemas físicos (Love, 1992).
- Permite ao proprietário escolher o sexo da descendência através do método de sexagem de espermatozóides (Johnson *et al*., 1998).

4.3. Desvantagens da inseminação artificial

O uso da IA é proibido em algumas raças, pois algumas associações de criadores exigem a cobrição natural para que a posterior descendência possa ser registada, como é o caso das associações de criadores da raça Puro Sangue Inglês. Outro dos problemas inerentes ao uso da IA é o aumento da consanguinidade, dado o facto de o sémen de um reduzido número de

garanhões poder ser usado para inseminar um grande número de éguas. A IA, comparativamente à cobrição natural, exige pessoal especializado bem como equipamento e estruturas que acarretam maiores custos (Sellnow, 2000; Morel, 2003).

4.4.Controlo reprodutivo

Para o sucesso de um programa de IA, deve-se elaborar um plano de controlo reprodutivo que englobe tanto a égua como o garanhão. Existe uma tendência evidente para os criadores de cavalos associarem os baixos índices de fertilidade unicamente às éguas, mas este problema pode ser originário do garanhão (Sousa, 2008).

4.4.1. Avaliação reprodutiva do garanhão

O garanhão deve ser submetido a uma avaliação reprodutiva completa (Sousa, 2008).
O objetivo de um exame reprodutivo é o de testar a capacidade de monta e libido do garanhão e determinar se possui as capacidades necessárias para produzir sémen viável, isto é, que contenha um número de espermatozóides necessários para a fertilização de um número razoável de éguas por época reprodutiva (Blanchard *et al.*, 2003; Morel, 2005). Este exame deve também permitir ao Médico Veterinário: detectar defeitos congénitos passíveis de serem transmitidos à descendência e/ou de diminuir a fertilidade do garanhão; identificar doenças infecciosas passíveis de transmissão venérea; e quaisquer outras lesões que possam comprometer a longevidade do garanhão como reprodutor (Blanchard *et al.*, 2003). A idade deve ser tida em conta, dado o facto de que com o avançar da mesma, aumenta a incidência de lesões que diminuem a capacidade reprodutiva do garanhão (Johnson & Thompson, 1983).
O conhecimento da história pregressa do garanhão é indispensável à avaliação reprodutiva. A informação recolhida deve incluir: o estado vacinal, frequência de desparasitações, dados sobre a performance reprodutiva incluindo resultados de fertilidade anteriores, incidência de lesões e/ou patologias e tratamentos aplicados (Allen *et al.*, 2010).

4.4.1.1. Exame de estado geral

Após a recolha de informação acerca do historial do garanhão deve-se seguir o exame de estado geral. A condição física do garanhão não pode ser ignorada e deve ser dos primeiros parâmetros a avaliar. Deve ser dada particular atenção a todos os sinais que possam comprometer a capacidade de monta do garanhão, por exemplo a claudicação, ou patologias com potencial hereditário como por exemplo, criptorquidismo e síndrome de Wobbler (Brinsko *et al.*, 2011; Hafez & Hafez, 2004).

Um exame de estado geral deve recolher informações acerca dos vários sistemas: cardiovascular, respiratório, digestivo, nervoso e urinário. Deve também incorporar um exame oftálmico e músculo-esquelético. Para determinar o estado de saúde do garanhão podem-se efectuar exames laboratoriais como: hemogramas, culturas citológicas, análises bioquímicas, coprológicas e urianálises (Morel, 2005; Samper *et al*., 2007).

4.4.1.2. Exame do sistema reprodutivo

Após o exame de estado geral, deve-se proceder a um exame do sistema reprodutivo que engloba um exame à genitália externa e interna. O conhecimento da anatomia do sistema reprodutor do garanhão é fulcral para uma correcta avaliação reprodutiva (Brinsko *et al*., 2011).

4.4.1.2.1. Exame da genitália externa

O prepúcio e o pénis devem ser inspeccionados visualmente e por palpação. Este último deve encontrar-se exteriorizado. A exteriorização manual do pénis, por retracção do prepúcio é difícil, devido à resistência normalmente exercida pelo garanhão (Brinsko *et al*., 2011). Dado este facto, o exame deve ser realizado próximo de uma égua ou durante o "duche". A vantagem de se inspeccionar o pénis do garanhão na presença de uma égua é a de permitir avaliar o comportamento sexual do garanhão, bem como, a sua capacidade de erecção (Morel, 2005). Outra das formas de exteriorização do pénis é a de induzir o animal a urinar. A colocação do animal na box em uma cama nova de palha normalmente faz com que o garanhão urine (Auer & Stick, 2006). O uso de tranquilizantes como a acepromazina ou

xilasina induzem a exteriorização peniana. Contudo, a administração indiscriminada destes fármacos deve ser evitada dado o risco de efeitos secundários (Blanchard *et al.*, 2003).

Com o prepúcio retraído e o pénis exteriorizado deve-se visualizar e palpar o processo uretral e estruturas associadas. É importante nesta fase, detectar lesões, massas, lacerações e/ou quaisquer outros tipos de anomalias que possam comprometer a saúde e capacidade reprodutiva do garanhão (Griffin, 2000).

O escroto também deve ser inspeccionado, quer visualmente, quer por palpação, durante o "duche" ou após ejaculação de forma a garantir maior segurança ao examinador (Morel, 2005).

Os testículos e os respectivos epidídimos devem ser palpados através da parede do escroto. É importante confirmar a presença testicular dentro dos respectivos sacos escrotais, bem como, determinar o seu tamanho, simetria e consistência. Ambos os testículos e os seus epidídimos devem-se mover livremente dentro do correspondente saco escrotal (Pickett *et al*. 1989). É essencial avaliar o seu posicionamento, tendo em conta que o posicionamento anormal pode ser indicativo de torções testiculares (Threlfall *et al*., 1990; Robinson & Sprayberry, 2009). O canal inguinal deve ser igualmente palpado de forma a descartar a presença de adesões ou hérnias (Morel, 2005).

O Médico Veterinário deve medir o diâmetro testicular, pois sabe-se que um maior diâmetro testicular está directamente relacionado com o aumento da produção de espermatozóides. Logo, o tamanho dos testículos é um bom indicador do potencial reprodutivo de um garanhão (Thompson *et al.*, 1979).

Ocasionalmente, o testículo esquerdo é maior que o direito. Contudo, se esta diferença de tamanho for acompanhada por um aumento de temperatura na região poderá ser indicativa de inflamação (Morel, 2005).

Cada testículo de um garanhão fértil e sexualmente maduro, deve apresentar as seguintes características: largura de 4,5 a 6 cm; altura de 5 a 6,5 cm; comprimento de 8,5 a 11 cm, sendo que a largura total do escroto deve variar entre os 9,5 e os 11,5 cm (Blanchard *et al.*, 2003; Papa *et al.*, 2008).

À palpação, a superfície testicular deve ser lisa podendo-se ocasionalmente palpar algumas veias. A presença de massas de carácter benigno ou mesmo maligno é rara. Contudo, podem ser encontradas durante o exame reprodutivo (Caron *et al*., 1985). A neoplasia testicular mais comum é o seminoma. Estes tumores podem-se expandir rapidamente e destruir todo o parênquima testicular. Outras patologias neoplásicas menos comuns são teratomas, tumores das células de Leydig, sertolinoma, carcinoma e teratocarcinoma (Schumacher, 1999).

A ultrasonografia é um meio de diagnóstico que permite avaliar com precisão a dimensão testicular, bem como a conformação do parênquima testicular e estruturas associadas, tornando-se assim indispensável num exame da genitália externa (Blanchard *et al.*, 2003)

4.4.1.2.2. Exame da genitália interna

O exame da genitália interna do garanhão deve ser efectuado de forma a tornar o exame reprodutivo mais completo. Este deve ser realizado por um Médico Veterinário com elevada experiência (Blanchard *et al*., 2003).

O acesso à genitália interna é difícil, contudo, algumas informações podem ser obtidas por palpação rectal e através de ultrasonografía trans-rectal (Rantanen & McKinnon, 1998; Morel, 2003).

Através da palpação rectal é possível aceder ao ducto deferente e a artéria espermática. O pulso arterial deve ser avaliado, pois, uma baixa pressão sanguínea pode ser indicativa de hemorragia, tumor ou inflamação (Rantanen & McKinnon, 1998). Por palpação também é possível recolher informações acerca da textura, do tamanho e forma das glândulas acessórias (Morel, 2003).

A ultrasonografia trans-rectal permite avaliar a função secretora como detectar alterações na morfologia das glândulas acessórias (Rantanen & McKinnon, 1998).

4.4.1.3.Critério para passar um garanhão num exame andrológico

De forma resumida, um garanhão para passar num exame andrológico deve: apresentar libido, demonstrar um comportamento sexual normal, apresentar 2 testículos dentro do respectivo saco escrotal, e ausência de lesões penianas, escrotais e testiculares. O diâmetro escrotal deve ter no mínimo de 8 cm. O garanhão deve estar livre de qualquer agente patogénico que possa ser transmissível à fêmea ou à descendência (Morel, 2005; Samper *et al*., 2007).

4.4.1.4. Recolha de sémen

Conforme referido anteriormente, o método de recolha de sémen mais utilizado a nível mundial é através de VA. Existem vários modelos de VA comercialmente disponíveis (Cambrige, Colorado, Missouri, Nishikawa, Hannover) e todos eles se baseiam no princípio de que a VA deve proporcionar um ambiente similar a uma vagina real (Morel, 2003).

A VA consiste numa estrutura tubular sólida, duas mangas de borrachas, uma interna e outra externa com um tubo de recolha na ponta. Entre a manga de borracha mais externa e a estrutura tubular é colocada água quente e ou ar através de uma válvula. É importante que o interior do tubo de colheita, bem como o lúmen da VA estejam á mesma temperatura (aproximadamente. 44ºC), de forma a evitar um choque térmico para os espermatozóides. A temperatura é verificada através da colocação de um termómetro no seu interior (Kayser, 1992). O interior da VA deve ser lubrificado com gel não espermicida (Amann, 1983). Para se proceder à colheita de sémen com VA pode-se utilizar um manequim (Figura 11) ou uma égua em estro para que o cavalo efectue o salto (Carleton & Nie, 2011).



Figura 11 - recolha de sémen utilizando um manequim
(Carleton & Nie, 2011)

Existem outros métodos de recolha de sémen, como por exemplo a indução farmacológica da ejaculação. A administração de xilasina associada à imipramina demonstrou provocar a ejaculação em cavalos, contudo, através deste protocolo, obtêm-se um ejaculado com uma elevada concentração de espermatozóides mas de baixo volume (McDonnell e Turner, 1994).

4.4.1.5. Avaliação do sémen

É importante avaliar a qualidade do sémen de todos os garanhões previamente à sua utilização em programas de IA. Na prática, a avaliação do sémen do garanhão é feita com a recolha de

um único ejaculado no início da época reprodutiva. Contudo, existem protocolos que exigem a avaliação de vários ejaculados (Morel, 2003).

Após a recolha, é essencial separar a porção gelatinosa do ejaculado da porção rica em espermatozóides, pois esta apresenta compostos nocivos para os espermatozóides. Para esse efeito procede-se a uma filtragem. Este processo permite a separação e remoção da parte gelatinosa, bem como outros microrganismos com potencial patogénico presentes no sémen (McKinnon, 2011).

Primeiramente deve-se proceder a uma avaliação macroscópica do sémen, que engloba a análise de determinados parâmetros como: a cor, o volume, a opacidade e o pH (Samper, 2009).

Em seguida, deve-se realizar a avaliação microscópica do sémen. A avaliação microscópica do sémen deve analisar a mobilidade e morfologia dos espermatozóides e determinar a longevidade, concentração e o rácio de espermatozóides vivos/mortos. Para uma análise mais aprofundada, é comum proceder-se aos exames citológicos e bacteriológicos do sémen (Morel, 2003).

4.4.1.6. Processamento e armazenamento do sémen refrigerado

Antes da refrigeração, o sémen deve ser diluído. O sémen diluído e refrigerado provou poder ser armazenado durante várias horas sem sofrer alterações significativas que comprometam a sua viabilidade para a reprodução. Os melhores resultados são obtidos quando o sémen é diluído no rácio de 3:1 (diluidor: sémen), e a concentração final de espermatozóides se situa entre os 25×10^6 e os 50×10^6 por mililitro (Varner *et al.*, 1987; Jasko *et al.*, 1991).

O sémen deve ser arrefecido lentamente até atingir a temperatura desejada. Existe alguma controvérsia sobre qual a temperatura ideal para armazenamento do sémen, alguns trabalhos demonstram que a preservação entre 15 e 20°C é mais eficaz na conservação das características seminais e fertilidade (Province *et al.*, 1985), enquanto que outros afirmam ser preferível entre 4 e 8°C (Varner *et al.*, 1989; Loomis, 2011).

Idealmente o sémen refrigerado deve ser usado nas 24 horas seguintes à sua recolha para garantir uma boa conservação da viabilidade espermática. O armazenamento superior a 24 horas pode desencadear processos bioquímicos que comprometem a capacidade dos espermatozóides fecundarem o oócito (Squires *et al.*, 1999; Pommer *et al.*, 2002).

A temperatura deve ser mantida até à sua utilização e, para isso, o sémen deve ser armazenado em frigoríficos ou em *equitainers* podendo ser transportado a longas distancias desde que a temperatura se mantenha (Douglas, 1984; Loomis, 2011).

4.4.2. Avaliação reprodutiva da égua

De forma a aumentar a eficiência da IA, as éguas candidatas devem ser submetidas a uma avaliação clínica rigorosa. Primeiramente procede-se à identificação da égua e anamnese, seguida de um exame de estado geral e, por último, um rigoroso exame reprodutivo (Brinsko, 2011).

Antes do exame reprodutivo, o clínico deve ter acesso ao documento de identificação da égua (passaporte, livro azul ou boletim sanitário) e registar todas as informações relevantes, como por exemplo: a idade da égua e estado de vacinação e desparasitação (Samper, 2009).

Éguas com idade superior a 15 anos tendem a ser problemáticas devido à maior incidência de patologias e/ou lesões que comprometem a fertilidade (Laing *et al*., 1988; Gibbs e Davison , 1992; Morel, 2005).

É igualmente importante recolher informações acerca da história pregressa da égua como por exemplo: número de partos, incidência de lesões e/ou patologias e tratamentos prévios a que a égua tenha sido submetida (Samper, 2009).

4.4.2.1.Exame de estado geral

Apesar do objectivo final ser o de determinar o potencial reprodutivo da égua não se deve descartar uma primeira avaliação ao seu estado geral (Brinsko *et al.*, 2011).

Num exame de estado geral é importante determinar a condição corporal da égua, pois, uma boa condição corporal é essencial para garantir um maior índice de fertilidade (Henneke *et al.*, 1984). Deve também compreender uma avaliação sucinta dos diferentes sistemas (respiratório, cardiovascular, urinário, digestivo e músculo-esquelético) de forma a descartar quaisquer tipos de lesões e/ou patologias que possam interferir com a reprodução (Brinsko *et al.*, 2011).

4.4.2.2. Exame reprodutivo

No seguimento de um exame de estado geral deve-se proceder a um rigoroso exame reprodutivo. É de salientar que quanto mais completo for o exame mais fácil é para o clínico elaborar um prognóstico de fertilidade. Um exame reprodutivo de rotina engloba a avaliação dos comportamentos sexuais e a inspecção do tracto reprodutivo da égua (Morel, 2005).

O exame reprodutivo deve-se iniciar pela inspecção da região perineal, onde deve ser detectado qualquer tipo de corrimento anormal. Deve-se também avaliar a conformação vulvar e das estruturas adjacentes, como o clítoris. Um correcto posicionamento (vertical) e uma boa oclusão dos lábios da vulva é essencial, pois, uma deficiente conformação pode levar à entrada de ar, fezes e/ou urina para o interior do tracto reprodutivo, o que permite o arrastamento de microrganismos com potencial patogénico (Samper, 2009).

Durante o exame reprodutivo, o uso de um espéculo vaginal é uma mais-valia, pois facilita a inspecção e a avaliação tanto da vagina como da entrada do cérvix. As alterações que são passíveis de serem detectadas com o auxílio de um espéculo vaginal incluem: hímen persistente, vaginite ou cervicite, adesões e ou lacerações e acumulação de fluidos vaginais (Brinsko *et al.*, 2011).

A palpação rectal é indispensável num exame reprodutivo, pois possibilita ao clínico avaliar o tamanho e o tónus das várias estruturas, bem como detectar a presença de massas no útero, ovários e cérvix. Através da palpação rectal também é possível avaliar o tamanho, a forma e o número de folículos ováricos, principalmente quando realizada por um Médico Veterinário com experiência. (Morel, 2005; Brinsko *et al.*, 2011)

Por sua vez, a ultrasonografia trans-rectal permite uma visualização do interior do tracto reprodutivo. Esta possibilita detectar anomalias como por exemplo: excesso de secreções intra-uterinas, quistos e tumores, bem como, avaliar a integridade e função ovárica (Morel, 2005).

Outros meios de diagnóstico como citologia, cultura e biopsias endometriais, laparoscopia ou laparotomia exploratória podem ser usados de forma a obter mais informações sobre o estado reprodutivo da égua. Contudo, na prática clínica corrente, estas técnicas só são utilizadas para identificar possíveis causas de infertilidade em éguas de valor elevado (Morel, 2005; Samper, 2009).

4.4.3. Manipulação do ciclo éstrico

4.4.3.1. Encurtamento da fase diestro

Como descrito anteriormente, as éguas durante a época ovulatória apresentam ciclos éstricos consecutivos de 21 em 21 dias, com 3 a 7 dias de estro e 15 a 17 dias de diestro. Tendo em conta estes dados, é espectável que 2/3 das éguas, à entrada de um programa de reprodução assistida, se encontrem em diestro. Quando assim é, e de modo a optimizar a eficiência reprodutiva de uma égua, tende-se a encurtar a duração do diestro. Nestes casos é indicada a administração de análogos da PGF2α de forma a promover a luteólise. Contudo, estes só devem ser administrados na presença de um CL com mais de 5 dias. Após 3 dias da administração de PGF2α é espectável que as éguas entrem em estro (Argo, 2010).

4.4.3.2. Indução da ovulação

A administração de um fármaco ovulatório permite ao Médico Veterinário prever o momento da ovulação. Assim, o Médico Veterinário consegue determinar qual o *timing* correcto (tendo em conta o tipo de sémen) para a realização da IA. O protocolo de indução da ovulação mais utilizado na prática clínica, consiste na administração intravenosa GnRH ou gonodotrofina coriónica humana (hCG) quando ultrasonograficamente se observa a presença de um folículo maior ou igual a 35 mm e edema uterino superior a 3 (sendo que 0 é sem edema e 4 é edema elevado (Argo, 2010)). Após 36 a 48 horas da administração desta hormona é espectável que 90% das éguas ovulem (Samper, 2009; Argo, 2010).

4.4.4. *Timing* de inseminação

O correcto momento da inseminação é dependente da viabilidade do sémen dentro do tracto reprodutivo feminino, bem como, da viabilidade do óocito (máximo 12 horas). Quando se utiliza sémen refrigerado as melhores taxas de gestação são obtidas quando a inseminação é realizada entre as 12 e 24 horas antes da ovulação. Contrariamente, quando se utiliza sémen congelado e, dado á menor viabilidade deste sémen dentro do oviducto, os melhores resultados são conseguidos quando a IA é realizada mais próxima á ovulação (12 horas antes ou 6-8 horas posteriores á ovulação) (Metcalf, 1998; Brinsko *et al.*, 2000; Samper, 2009).

4.4.5. Técnica de inseminação artificial

Para a correcta realização da IA, a égua deve estar devidamente contida e o clínico deve utilizar uma metodologia de contaminação mínima (Morrow, 1986; Argo, 2010).

A cauda deve ser levantada de forma a não tocar na região perineal (Morel, 2005). Tanto o períneo como a vulva devem ser lavados com água corrente e com uma solução anti-séptica (exemplo: clorexidina), as vezes necessárias até ficarem livres de qualquer sujidade (Samper, 2009; Argo, 2010).

O inseminador começa por calçar uma luva de palpação esterilizada e pega no cateter de inseminação, também devidamente esterilizado. A mão deve ser lubrificada com um gel estéril não espermicida, de forma a facilitar a sua introdução na vagina (Samper, 2009; Argo, 2010). Com a outra mão acopla a seringa, que contém o sémen, ao cateter de inseminação, preenchendo-o. A seringa deve ser protegida das condições ambientais adversas tais como radiações ultravioleta e frio (Broussard *et a*l., 1993). De forma a facilitar a entrada do braço do inseminador e diminuir o risco de contaminação do interior do sistema reprodutivo da égua, um assistente deve traccionar em direcções opostas ambos os lábios da vulva, nunca lhes tocar (Samper, 2009). Para introduzir o braço, deve-se colocar a mão em forma de "concha" passando por entre os lábios vulvares e a vagina até à entrada do cérvix, protegendo sempre o orifício do cateter com a ponta do dedo indicador, de forma a evitar a contaminação do sémen. Em seguida, com os dedos servindo de guia, o cateter deve ser introduzido no cérvix, continuando ao longo do corpo uterino. Após esta introdução o êmbolo da seringa é propulsionado de forma a depositar o sémen dentro do útero (Argo, 2010).

Consoante o tipo de sémen utilizado (fresco, diluído ou criopreservado) e, de forma a maximizar os índices de fertilidade, podem-se realizar diferentes técnicas com diferentes locais de deposição do sémen nomeadamente: no corpo do útero, intracornual profunda e na papila útero-tubárica, sendo que a técnica de deposição do sémen no corpo uterino, quando se utiliza sémen fresco ou refrigerado, obtém bons resultados e é a mais utilizada na prática clínica (Samper, 2009).

4.4.6. Confirmação da ovulação

As éguas inseminadas com sémen refrigerado devem ser submetidas a um exame de palpação rectal e ultrasonográfico trans-rectal, 24 horas após a IA, de forma a confirmar a ovulação e avaliar a presença de líquido intra-uterino. As éguas que não ovularam nas 36 horas posteriores à IA com sémen refrigerado devem ser novamente inseminadas (Argo, 2010).

4.4.7. Diagnóstico de gestação

O meio de diagnóstico ideal é aquele que é preciso, rápido, pouco dispendioso, único e fácil. Contudo, ainda não existe nenhum meio de diagnóstico que compreenda todas estas características (Collins & Buckley, 1993; Henderson, 1998).

Um Médico Veterinário com experiência é capaz de elaborar um diagnóstico de gestação por palpação rectal entre os dias 20 e 30 após a ovulação. Contudo, o diagnóstico de gestação por palpação rectal é mais preciso ao fim de 60 dias. As desvantagens do uso da palpação rectal como meio de diagnóstico de gestação são o impedir que as éguas não gestantes sejam novamente inseminadas durante o período de estro seguinte e o maneio precoce da gestação gemelar (Morel, 2005).

A medição da concentração plasmática de determinadas hormonas como: a hormona coriónica equina (eCG), a progesterona e o estrogénio pode ser usada como diagnóstico de gestação. Dado os custos elevados que acarreta e o tempo de obtenção de resultados, este tipo de análise sanguínea normalmente é usada apenas em póneis de estatura mínima ou em éguas com lesões vaginais e/ou rectais (Morel, 2005).

A medição da concentração da progesterona no leite também é usada como meio de diagnóstico de gestação. Uma elevada concentração de progesterona é observada durante o estro, a diminuição após 5 a 10 dias é indicativa de não gestação, mas níveis continuamente elevados traduzem-se em gestação (Morel, 2005).

A urianálise não é prática comum. Contudo, é efectuada em éguas não lactantes e em éguas onde seja impossível a realização da palpação rectal e colheita de sangue (Cox, 1971; Evans *et al*., 1984).

A medição da concentração de estrogénios conjugados nas fezes também provou ser um meio de diagnóstico de gestação (Sist, 1987; Raeside *et al*., 1991).

A ultrasonografia tem-se tornado no meio de diagnóstico mais comum e fiável pois possibilita o diagnóstico precoce de gestação. A partir do dia 11-12 de gestação é possível visualizar-se ecograficamente uma estrutura esférica anecogénica, correspondente á vesícula embrionária. Após o dia 17 a vesícula embrionária é mais facilmente detectável na porção posterior do corno uterino junto á bifurcação uterina e, nesta altura, obtém-se uma precisão de 98% na detecção da gestação (Ginther, 1989; Hallowell, 1989). Ao dia 20, o embrião pode ser identificado dentro da vesícula embrionária e no dia 24 é possível avaliar o batimento cardíaco fetal (Allen & Goddard, 1984; Ginther, 1984). Entre os dias 59 e 78 é possível determinar qual o sexo do embrião (Curran & Ginther, 1989).

Na prática clínica, o diagnóstico de gestação é efectuado entre os dias 14 e 18 após ovulação. Em raças onde há maior incidência de gestações gemelares tenta-se obter um diagnóstico de gestação entre o dia 11 e 12 (precocemente) permitindo assim ao clínico planear da melhor forma o maneio da gestação dupla (Morel, 2005).

5. Material e métodos

O objetivo deste estudo foi o de, primeiramente, calcular a taxa de gestação de 56 éguas consoante as diferentes variáveis, época de inseminação, ovário ovulatório, idade e raça. E em seguida, com o auxilio de testes estatísticos saber se essas variáveis influenciam ou não a taxa de gestação obtida.

Os testes estatísticos utilizados foram, o teste á diferença de proporções, teste do qui-quadrado da independência de variáveis e o teste ao coeficiente de correlação de Pearson. Os cálculos foram feitos através do software SPSS®.

Todas as fórmulas matemáticas usadas em este estudo encontram-se no Anexo 1.

5.1. Características da amostra

O presente estudo foi realizado durante as épocas reprodutivas de 2011 e 2012 no concelho da Trofa. Foram utilizadas 23 éguas em 2011 e 33 em 2012 perfazendo um total de 56 éguas (n=56) consideradas aptas para reprodução, das quais 43 eram de raça Puro Sangue Lusitano (PSL), 12 de raça Cruzado Português (CP) e 1 Puro Sangue Inglês (PSI) (Gráfico 1). As idades estavam compreendidas entre os 3 e os 19 anos (Gráfico 2), sendo que a média de idades era de 8,73 anos. O conjunto das 24 das éguas (42,85% do total da amostra) que foram inseminadas no início da época reprodutiva (entre os meses de Março e Abril), chamou-se de grupo 1 e ao conjunto das 32 éguas (57,15% do total da amostra) que foram inseminadas durante o meio da época reprodutiva (Maio, Junho e Julho) chamou-se grupo 2 (Gráfico 3).

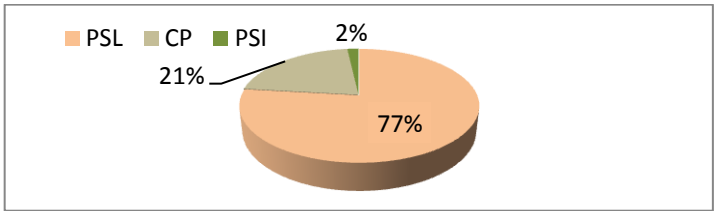


Gráfico 1 -Proporção das diferentes raças submetidas a inseminação artificial.

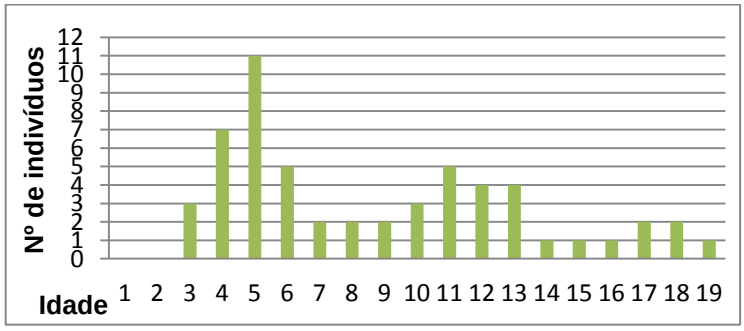


Gráfico 2 – Distribuição das éguas inseminadas por idade.

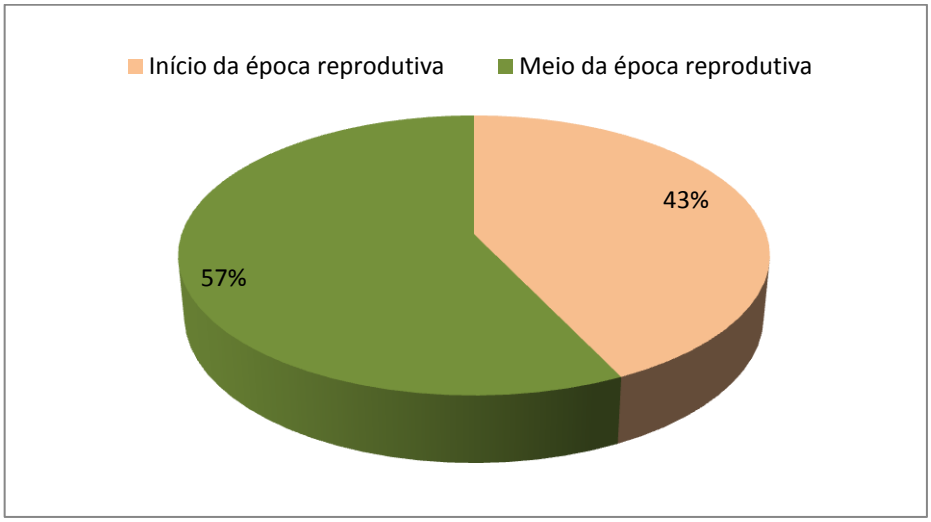


Gráfico 1 -Proporção de éguas inseminadas nas duas épocas do ano (inicio e meio da época reprodutiva).

5.2. Metodologia

Todas as éguas do estudo foram transportadas até à Coudelaria Pedro Silva no concelho da Trofa e durante o tempo de estadia foram alojadas em paddocks onde lhes foi administrado feno e ração duas vezes ao dia e água fresca *ad libitum*.

5.2.1. Exame de estado geral

No dia de chegada todas as éguas foram submetidas a um exame de estado geral, de acordo com Brinsko *et al.* (2011) que englobava o exame à distância e dinâmico onde foi avaliado/a: a condição corporal; o comportamento; a expressão facial; a postura; o tipo de respiração; os andamentos; o estado da pele, dos pêlos e faneras; a presença de feridas e ou tumefacções. Dentro do exame de estado geral procedeu-se também: à medição da temperatura corporal (*per rectum*); à auscultação (cardíaca, pulmonar e intestinal); à medição do tempo de repleção capilar e à avaliação das mucosas.

5.2.2. Exame reprodutivo

O exame reprodutivo de acordo com Morel (2005) e Brinsko *et al*. (2011) iniciou-se com a observação dos comportamentos sexuais da égua na presença de um garanhão. Em seguida, as éguas foram colocadas em mangas de contenção (Figura 12) onde se avaliou a conformação

da vulva, do períneo, do clítoris, da vagina e do cérvix. Por palpação rectal avaliou-se o tamanho e o tónus das várias estruturas, bem como a presença de massas no útero, ovários e cérvix. O tamanho, a forma e número de folículos ováricos, foram tambem avaliados utilizando o mesmo método.

Por ecografía transrectal (Figura 13) avaliaram-se ambos os ovários e os respectivos folículos, bem como a presença ou ausência do corpo lúteo. Avaliou-se também o grau de edema uterino. Este último foi classificado segundo Argo (2010) em uma escala de 0 a 4, sendo que o grau 0 era sem edema e grau 4 era elevado edema.

Todos estes procedimentos serviram para verificar e/ou descartar qualquer alteração/patologia a nível do aparelho reprodutor da égua, bem como para determinar em que fase do ciclo éstrico a égua se encontrava.



Figura 12 – Entrada da égua na manga de contenção.



Figura 13 -Ecografía transrectal

5.2.3. Sincronização do ciclo éstrico

Os métodos de sincronização do ciclo éstrico têm como objectivos: reduzir o tempo de vida do corpo lúteo e aumentar a previsibilidade do momento de ovulação.

5.2.3.1. Indução do estro

Às éguas que, á chegada, se encontravam na fase lútea (entre os dias 5 e 12) foi-lhes administrado via intramuscular 7,5 miligramas (mg) de dinoprost trometamina (dinolytic®,

Pfizer) análogo da PGF2α, com o objectivo de provocar a luteólise e por consequência induzir o estro. Três dias após a administração, as éguas foram submetidas a um exame ecográfico diário, onde se avaliou o tamanho (média de duas medições na diagonal) e a forma folicular, bem como o grau de edema uterino (todos os dados relevantes eram posteriormente registados quer de forma escrita quer de forma digital).

5.2.3.2. Indução da ovulação

Aquando da presença de um folículo dominante ≥ 35 mm (Figura 14) e edema uterino ≥ 3, contactou-se o fornecedor de sémen para que o sémen chegasse no dia seguinte. Obtida a confirmação positiva do fornecedor, foi-lhes administrado por via endovenosa a dose de 1500-3000 unidades internacionais (UI) de hCG (Chorulon®, Merk).Todas as éguas foram observadas durante um período mínimo de 10 minutos, após a administração de hCG, dado ao historial de reacções anafiláticas posteriores à sua administração.

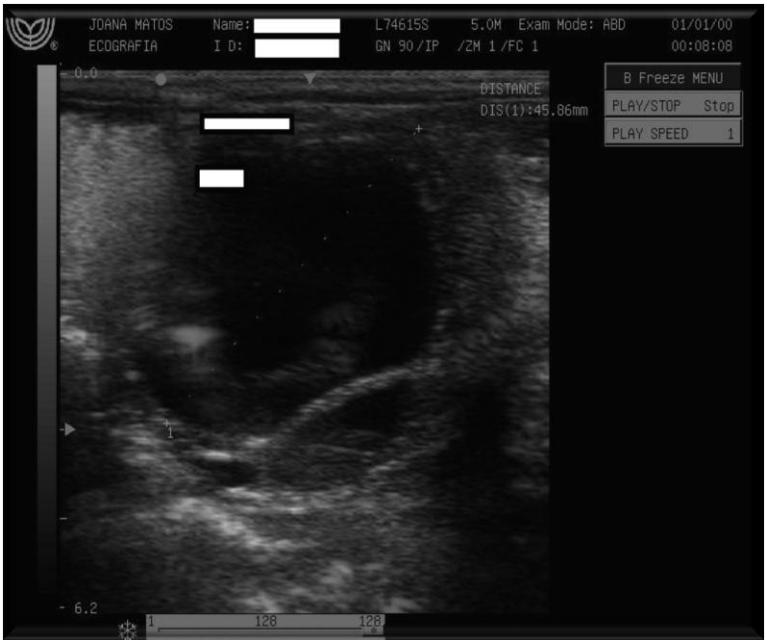


Figura 14 -Ecografia de um ovário que apresenta um folículo dominante e pré-ovulatório.

5.2.4. Inseminação artificial com sémen refrigerado.

No dia seguinte à indução da ovulação o sémen foi-nos entregue pela empresa transportadora Chronopost®. A presença do folículo dominante era novamente avaliada ecograficamente, e seguidamente era feita a IA. Todo o protocolo inerente à IA (Tabela 1) foi adaptado pela Dra. Joana Matos e tem como base o protocolo descrito por Argo (2010).

1	Elevou-se a cauda da égua dorso-lateralmente, de forma a que esta não tocasse na zona perineal.
2	Calçou-se uma luva de palpação e posteriormente procedeu-se á lubrificação com gel lubrificante. Com a palma orientada dorsalmente e a mão em forma de "concha" retiraram-se as fezes alocadas no recto da égua.
4	Introduziu-se a sonda ecográfica no recto de forma a confirmar a presença do folículo dominante e avaliar as outras estruturas reprodutivas, como o ovário contra-lateral e o útero.
5	Lavou-se a zona perineal com água corrente e com auxílio de compressas e com uma solução de clorexidina esfregou-se gentilmente até esta não apresentar qualquer sujidade.
6	Calçou-se uma nova luva de palpação esterilizada na mão direita de forma a evitar contaminação intra-uterina.
7	A seringa contendo o sémen foi acoplada no orifício distal do cateter de inseminação sem nunca tocar com a luva esterilizada na seringa.
8	Segurou-se a seringa com a mão esquerda e o cateter de inseminação com a mão direita, o dedo indicador direito foi colocado sobre o orifício de saída do cateter.
9	Pediu-se ao assistente para colocar uma pequena quantidade de gel lubrificante, estéril e não espermicida, na face externa da mão direita do inseminador.
10	Após a colocação de luvas esterilizadas o assistente retraiu em direcções opostas ambos os lábios vaginais, sem nunca lhes tocar, de forma a facilitar a entrada do braço do inseminador e evitar a conspurcação do interior do sistema reprodutivo.
11	Com movimentos suaves de rotação introduziu-se a mão direita, em forma de "concha", juntamente com o cateter até à entrada do cérvix.
12	Com a ponta dos dedos identificou-se a entrada do cérvix e introduziu-se suavemente o cateter de inseminação até a extremidade anterior do corpo uterino.
13	Propulsionou-se o êmbolo da seringa extravasando-se assim o sémen para dentro do útero.
14	Retirou-se suavemente o braço do interior do tracto de forma a não fazer o efeito de vácuo.

Tabela 2-protocolo de inseminação artificial

5.2.5. Avaliação do sémen pós IA

Logo após a inseminação, a pouca quantidade de sémen que restava no cateter de inseminação foi colocado numa lâmina e observado ao microscópio (Figura 15) com o intuito de avaliar a morfologia e mobilidade dos espermatozóides. Contudo, esta prática foi meramente confirmativa dado o facto da responsabilidade total sobre a viabilidade do sémen ser do fornecedor.



Figura 15 -Observação das amostras de sémen ao microscópio óptico.

5.2.6. Confirmação da ovulação

Em concordância com o que foi descrito por Argo (2010), no dia seguinte à IA (24 horas após IA) procedeu-se a uma nova ecografia trans-rectal de forma a confirmar ausência do folículo anteriormente detectado, o que é indicativo de ovulação.

5.2.7. Diagnóstico de gestação

Entre o 14º e o 20º dia após a ovulação procedeu-se ao diagnóstico de gestação de todas as éguas através de uma ecografia transrectal. A visualização ecográfica de uma estrutura esférica anecogénica (vesícula embrionária) confirmou a gestação (Figura 16).



Figura 16 - Diagnóstico de gestação positivo.

6. Resultados

6.1. Taxas de Gestação Obtidas

- **Taxa de gestação do total da amostra**

Do total de 56 éguas inseminadas em ambas as épocas reprodutivas 13 apresentaram diagnóstico de gestação negativo e 43 apresentaram diagnóstico de gestação positivo. Estes resultados demonstraram uma taxa de gestação de 77% (Gráfico 4).

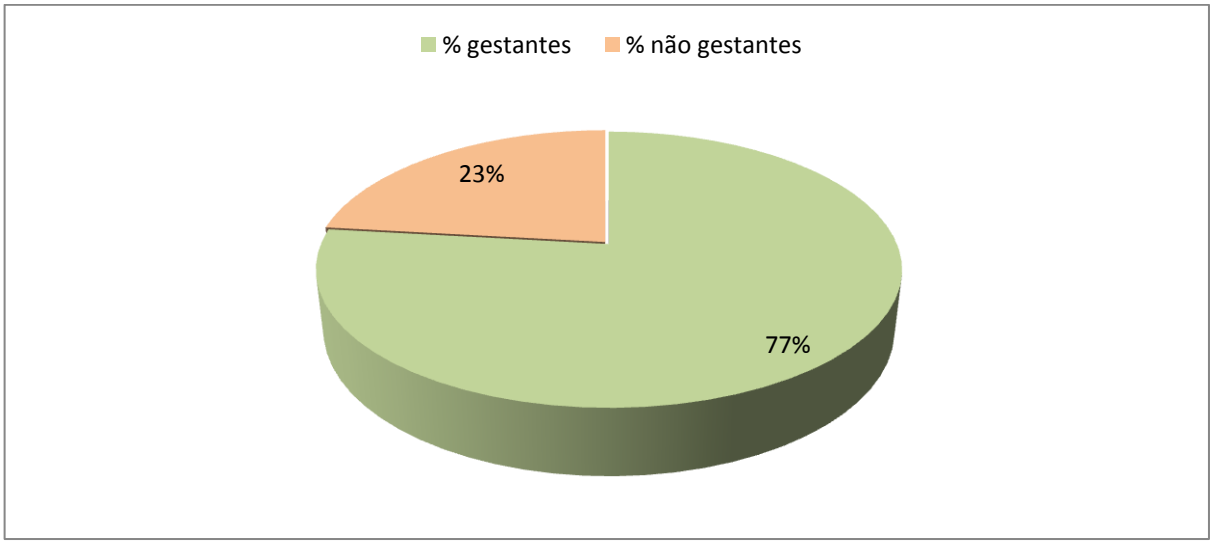


Gráfico 2 - Percentagem de éguas gestantes e não gestantes do total da amostra.

- **Taxa de gestação das éguas PSL**

Do total de 43 éguas PSL inseminadas, 8 apresentaram diagnóstico de gestação negativo e 35 apresentaram diagnóstico de gestação positivo. Estes resultados demonstraram uma taxa de gestação de 81% (Gráfico 5).

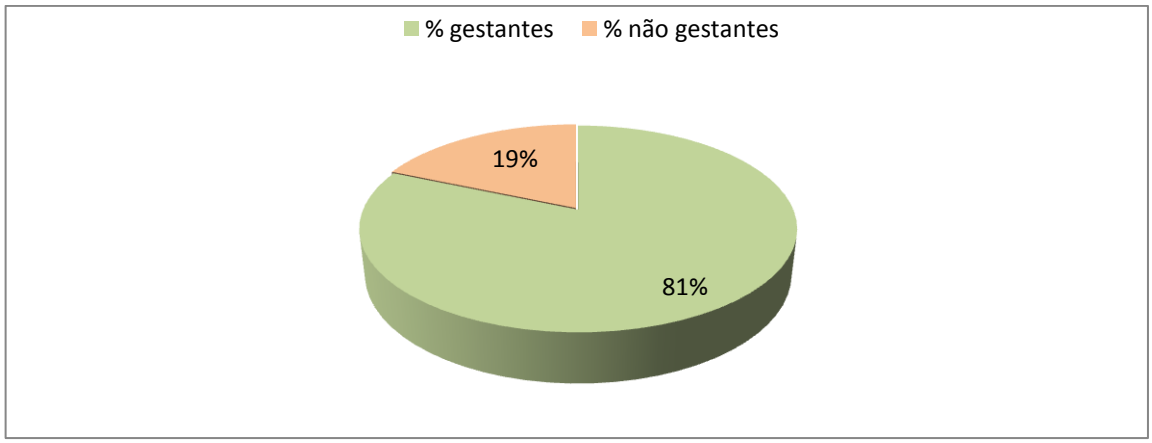


Gráfico 3 - Percentagem de as éguas gestantes e não gestantes da raça PSL.

- **Taxa de gestação das éguas CP**

Do total de 12 éguas de raça CP inseminadas, 5 apresentaram diagnóstico de gestação negativo e 7 apresentaram diagnóstico de gestação positivo. Estes resultados demonstraram uma taxa de gestação de 58% (Gráfico 6).

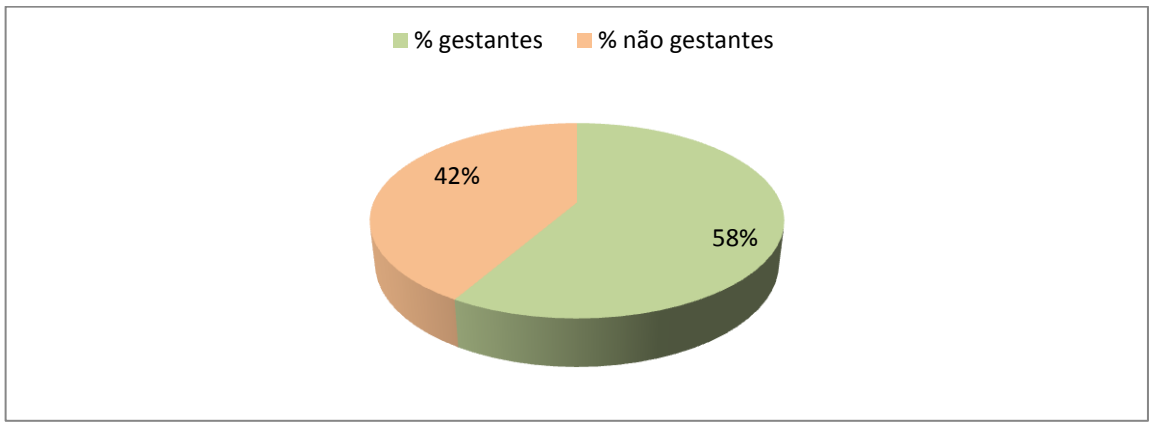


Gráfico 4 - Percentagem de éguas gestantes e não gestantes da raça CP.

- **Taxa de gestação das éguas que ovularam do ovário esquerdo.**

Das 56 éguas inseminadas, 32 ovularam do ovário esquerdo e destas 32 éguas 27 apresentaram diagnóstico positivo de gestação. Estes resultados demonstraram uma taxa de gestação 84% (Gráfico 7).

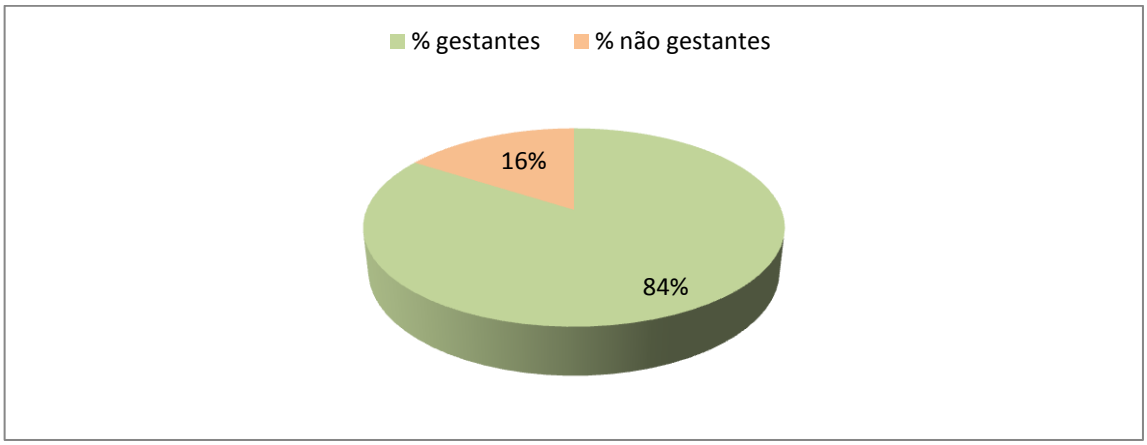


Gráfico 5 - Percentagem de gestantes e não gestantes das éguas que ovularam do ovário esquerdo.

- **Taxa de gestação das éguas que ovularam do ovário direito.**

Das 56 éguas inseminadas 24 ovularam do ovário direito e destas 24 éguas 16 apresentaram diagnóstico positivo de gestação. Estes resultados demonstraram uma taxa de gestação de 67% (Gráfico 8).

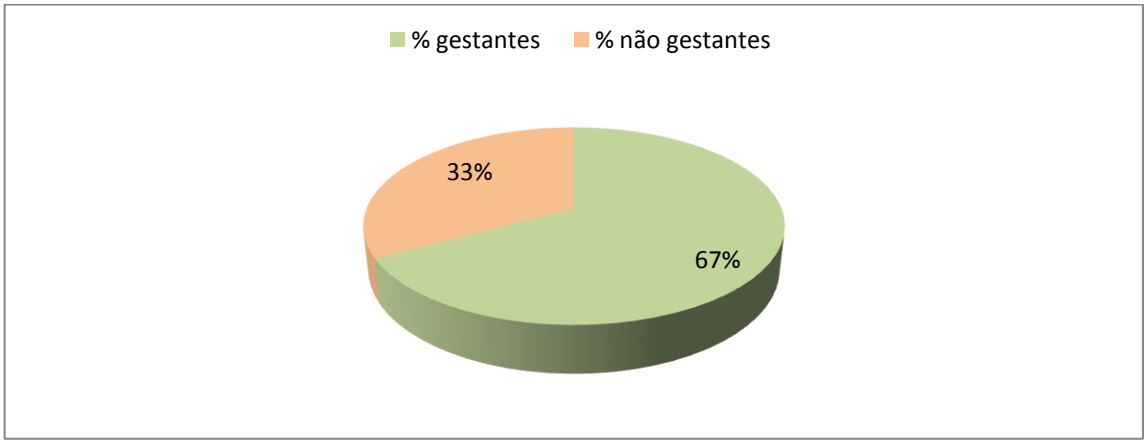


Gráfico 6 - Percentagens de gestantes e não gestantes das éguas que ovularam do ovário direito.

6.2. Análise Estatística dos Resultados

A análise estatística dos resultados obtidos tem como objectivo essencial determinar a influência das diferentes variáveis (época de inseminação, ovário ovulatório, raça e idade da égua) sobre a taxa de gestação.

6.2.1. Influência da época de inseminação

Das 56 éguas presentes ao estudo, 24 foram inseminadas no início da época ovulatória nos meses de Março e Abril (Grupo 1) e as restantes 32 foram inseminadas a meio da época ovulatória nos meses de Maio, Junho e Julho (Grupo 2). O grupo 1 obteve 16 diagnósticos positivos de gestação, enquanto que o grupo 2 obteve 27. Os resultados obtidos estão resumidos no Gráfico 9.

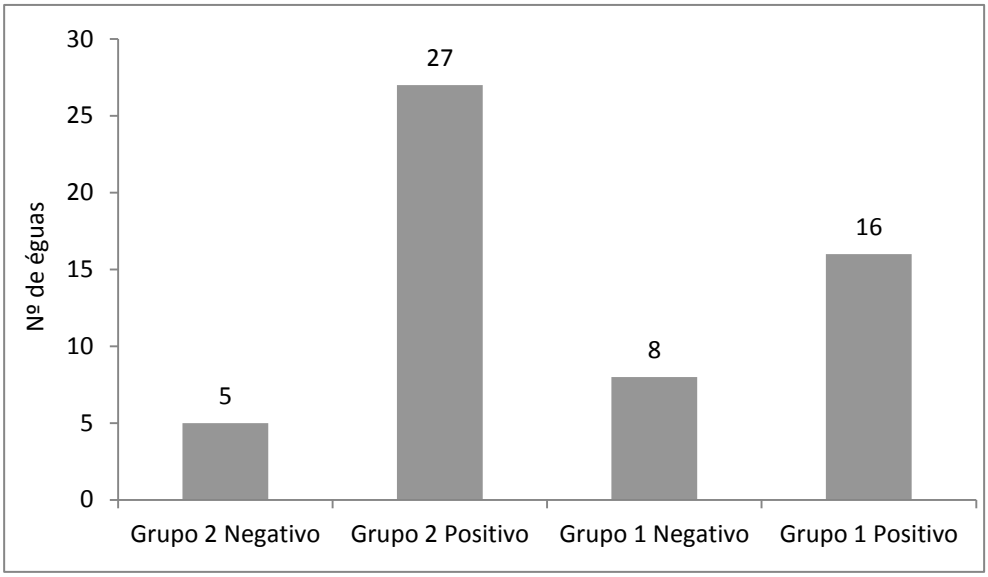


Gráfico 7 - Comparação entre o número de éguas do grupo 1 e grupo 2 que obtiveram diagnóstico de gestação positivo e negativo.

A proporção de diagnósticos de gestação positivos em éguas do grupo 2 foi 0,844, enquanto que em éguas do grupo 1 foi 0,667.

Comparou-se as proporções de diagnósticos positivos, entre o grupo 1 e o grupo 2, pelo teste à diferença de proporções. As hipóteses estabelecidas para a realização deste teste são:

- H0: Não há diferenças entre as taxas de gestação nas éguas inseminadas em Março e Abril (grupo 1) e em éguas inseminadas em Maio, Junho e Julho (grupo 2).
- H1: Há diferenças entre as taxas de gestação nas éguas inseminadas em Março e Abril (grupo 1) e em éguas inseminadas em Maio, Junho e Julho (grupo 2).

O valor de prova calculado para o teste bilateral foi de 0,126, o que significa que H0 não é rejeitada, ao nível de significância de 0,05. Conclui-se então que não há diferença estatisticamente significativa entre as taxas de gestação dos grupos 1 e 2.

Para complementar a conclusão anterior, foi realizado ainda o teste do qui-quadrado da independência de variáveis. As hipóteses deste teste são as seguintes:

- H0: As variáveis época de inseminação e resultado do diagnóstico são independentes.
- H1: As variáveis época de inseminação e resultado do diagnóstico estão relacionadas.

Para a variável resultado do diagnóstico consideraram-se apenas os resultados diagnóstico negativo e diagnóstico positivo.

O valor de prova encontrado foi de 0,120, o que significa que H0 não é rejeitada, ao nível de significância de 0,05. Conclui-se então que não há relação estatisticamente significativa entre a taxa de gestação e a época de inseminação.

6.2.2. Influência do ovário ovulatório

Das 56 éguas presentes ao estudo 24 ovularam do ovário direito e destas, 16 obtiveram diagnóstico de gestação positivo. As restantes 32 éguas, ovularam do ovário esquerdo e 27 ficaram gestantes. Os resultados obtidos estão resumidos no Gráfico 10.

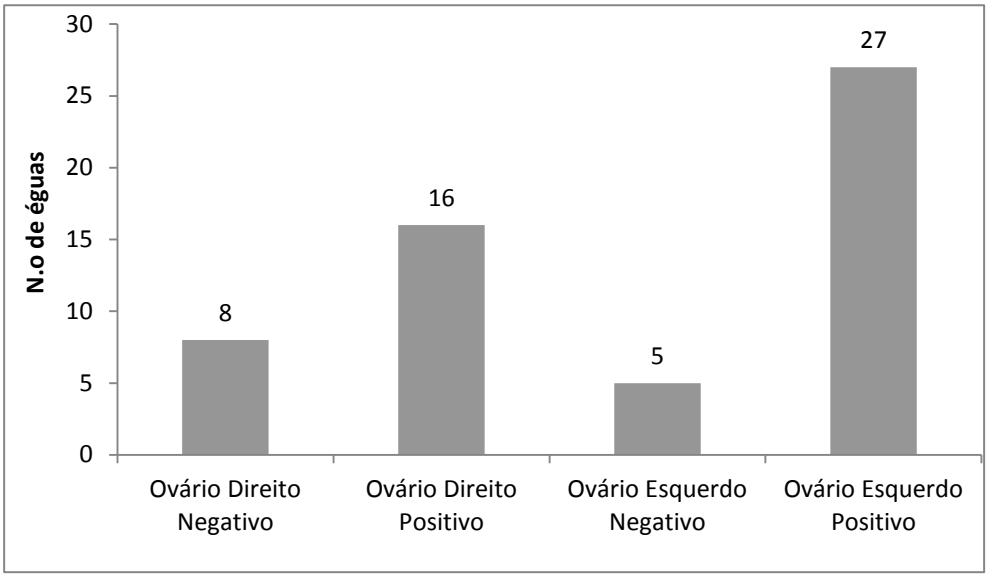


Gráfico 8 -Comparação entre os diagnósticos de gestação positivo e negativo relativamente aos diferentes ovários ovulatórios

As proporções de diagnósticos, positivos entre os dois ovários, direito e esquerdo foram comparadas pelos métodos aplicados à comparação entre épocas de inseminação. No teste à diferença de proporções, as hipóteses estabelecidas são:

- H0: Não há diferenças entre as taxas de gestação das éguas que apresentaram diferentes ovários ovulatórios.
- H0: Há diferenças entre as taxas de gestação das éguas que apresentaram diferentes ovários ovulatórios.

O valor de prova calculado para o teste bilateral foi de 0,126, o que significa que H0 não é rejeitada, ao nível de significância de 0,05. Conclui-se então que não há diferença estatisticamente significativa entre as taxas de gestação das éguas que apresentaram diferentes ovários ovulatórios.

Para complementar a conclusão anterior foi ainda realizado também o teste do qui-quadrado da independência de variáveis. As hipóteses deste teste são as seguintes:

- H0: As variáveis ovário ovulatório e resultado do diagnóstico são independentes.
- H1: As variáveis ovário ovulatório e resultado do diagnóstico estão relacionadas.

De forma semelhante à anterior, para a variável resultado do diagnóstico consideraram-se apenas os resultados diagnóstico negativo e diagnóstico positivo.

O valor de prova encontrado foi de 0,120, o que significa que H0 não é rejeitada, ao nível de significância de 0,05. Conclui-se então que não há relação estatisticamente significativa entre o resultado do diagnóstico e o diferente ovário ovulatório.

6.2.3. Influência da raça

Das 43 éguas PSL 35 ficaram gestantes enquanto que das 12 CP só 7 obtiveram diagnóstico de gestação positiva. A única égua de raça PSI ficou gestante. Os resultados obtidos estão resumidos no Gráfico 11.

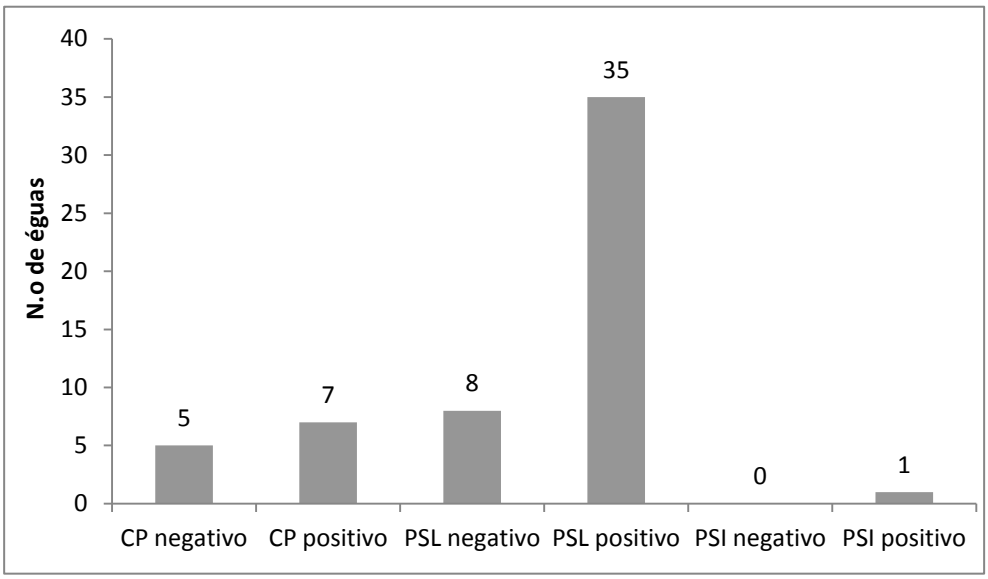


Gráfico 9 - Comparação dos diagnósticos de gestação entre as diferentes raças.

Não foi possível comparar as proporções de diagnósticos positivos, entre as várias raças presentes no estudo, porque algumas raças não apresentam número de animais suficiente para que o teste seja válido.

Pelo mesmo motivo, também não foi possível realizar o teste do qui-quadrado da independência de variáveis, uma vez que as reduzidas dimensões de alguns dos grupos levaram a que alguns valores esperados resultassem inferiores a 5, o que invalida o resultado.

Optou-se então por construir intervalos de confiança para as taxas de gestação nas raças CP e PSL, não se tendo avaliado a raça PSI, por corresponder apenas a um resultado.

Uma vez que a dimensão amostral da raça CP é inferior a 20, a aproximação à distribuição normal não é válida. O intervalo de confiança foi determinado directamente a partir da distribuição binomial. Para a realização deste cálculo é necessário um método iterativo. Assim, conclui-se que a proporção de diagnósticos positivos na raça CP se situa no intervalo [0,275 ; 0,847] , com 95% de confiança.

Já em relação à raça PSL, foi possível determinar a estimação intervalar empregando a aproximação à distribuição normal reduzida, para o nível de confiança de 0,95, apresenta o valor de 1,960. Calculou-se assim que a proporção de diagnósticos positivos na raça PSL se situa no intervalo [0,698 ; 0,930] , com 95% de confiança.

Por comparação dos dois intervalos construídos, conclui-se que não há uma diferença estatisticamente significativa entre as taxas de gestação das éguas de raça CP e PSL.

6.2.4. Influência da idade

No gráfico12 podem ser consultadas as percentagens de diagnósticos positivos por valor individual de idade:

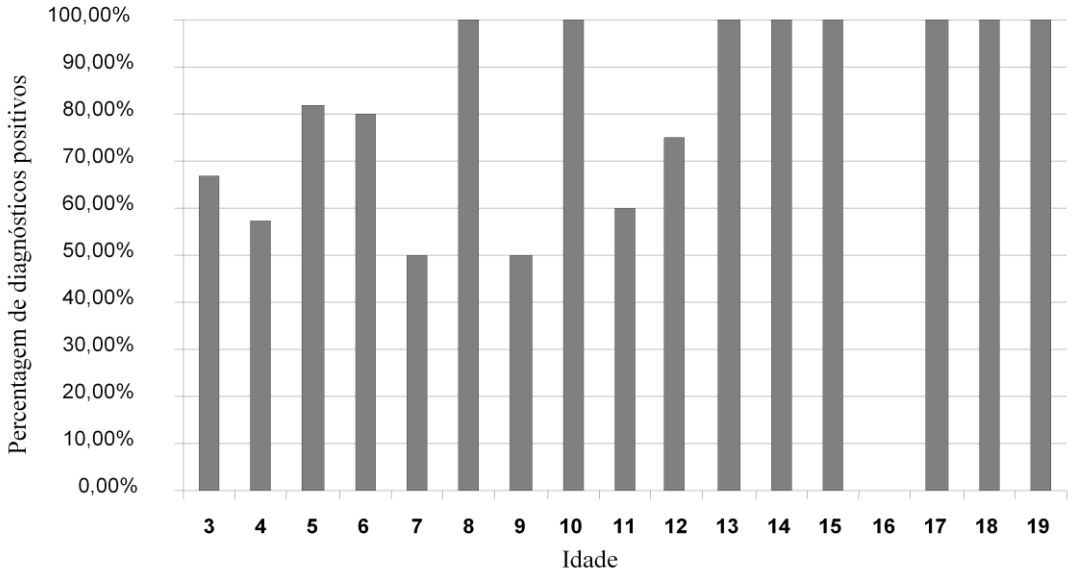


Gráfico 10 -Percentagens de diagnósticos positivos por idade

Foi realizado também o teste do qui-quadrado da independência de variáveis. As hipóteses deste teste são as seguintes:

- H0: As variáveis faixa etária e resultado do diagnóstico são independentes.
- H1: As variáveis faixa etária e resultado do diagnóstico estão relacionadas.

De forma semelhante à anterior, para a variável resultado do diagnóstico consideraram-se apenas os resultados diagnóstico negativo e diagnóstico positivo.

O valor de prova encontrado foi de 0,315, o que significa que H0 não é rejeitada, ao nível de significância de 0,05. Conclui-se então que não há relação estatisticamente significativa entre o resultado do diagnóstico e a faixa etária.

Seguidamente, considerando a variável diagnóstico como quantitativa, podendo assumir os valores 0 (negativo) e 1 (positivo), pesquisou-se a possibilidade de uma correlação linear entre esta e a idade, pelo cálculo do coeficiente de correlação de Pearson.

Encontrou-se um coeficiente de correlação de 0,155, com um valor de prova igual a 0,253, o que significa que não existe correlação linear estatisticamente significativa.

7. Discussão e Conclusões

- Taxa de gestação do total da amostra

Jasko *et al.* (1992) reportou uma taxa de gestação por ciclo éstrico de 65% em éguas inseminadas com sémen refrigerado. Nove anos depois, Loomis (2001) obteve uma taxa de gestação de 59% similar à de Jasko *et al*. (1992). Metcalf (1998) reportou que obteve uma taxa de gestação por ciclo éstrico de 48%. Contudo, neste estudo, Metcalf classificou os diferentes tipos de sémen utilizado em: excelente, muito bom, bom, razoável e concluiu que a taxa de gestação das éguas inseminadas com mau sémen e com excelente sémen variaram entre 11% e 87,5%, respectivamente.

A taxa de gestação, 76,8% está de acordo com os resultados obtidos por Metcalf (1998) aquando o uso de sémen de muito boa e excelente qualidade. Contudo em este estudo não nos foi possível ter acesso aos dados da qualidade do sémen.

- Influência da época de inseminação sobre a taxa de gestação.

As diferentes épocas de inseminação (Março-Abril e Maio-Julho) não provaram, estatisticamente (P =0,120)., ter influência na fertilidade das éguas Contudo, as éguas que foram inseminadas entre os meses de Maio e Julho obtiveram maiores taxas de fertilidade que as éguas inseminadas nos meses de Março e Abril (84,4% *vs* 66,7%). Os resultados obtidos no presente estudo vão de encontro aos resultados do estudo de Skaife e Loomis (2010), que reportou ter obtido a taxa de gestação de 63% em éguas inseminadas no inicio da época reprodutiva e a taxa de gestação de 79% em éguas inseminadas no meio da época reprodutiva.

- Influência da idade sobre a taxa de gestação

Vários estudos demonstram uma relação positiva entre o avanço da idade e a subfertilidade nas éguas (Laing e Leech, 1975; Laing *et al.,* 1988; Vanderwall e Woods, 1991;; Gibbs e Davison, 1992; Ginther, 1992; Carnevale e Ginther, 1994; Allen, 1994; e Brinsko *et al*., 1995). Contudo, a idade exacta em que ocorre a diminuição de fertilidade não é consensual. Alguns estudos afirmam que a diminuição da fertilidade ocorre aos 10 anos (Laing e Leech, 1975); outros aos 12 anos (Vanderwall e Woods, 1991); e outros aos 15 anos. (Laing *et al.*, 1988; Gibbs e Davison, 1992). Contudo é consensual que com o avanço da idade aumenta a incidência de determinadas patologias que por sua vez são causadoras da diminuição da fertilidade. Silva (1991), que estudou a ocorrência de patologias reprodutivas em éguas de diferentes idades, conclui que essas patologias têm maior incidência em éguas mais velhas (≥15 anos) e que as patologias inflamatórias uterinas são as principais causadoras de infertilidade. Segundo Ginther (1992) , o útero, com o avançar da idade, perde a capacidade

de contractilidade e por consequência diminui o clearence uterino o que leva ao aumento da incidência de endometrite. Este autor afirma, também, que a endometrite é das principais causas de infertilidade em éguas. A incidência de patologias degenerativas como os quistos uterinos e fibrose uterina também está associada ao aumento da idade e também são passíveis de provocar diminuição da fertilidade (Ginther, 1992; Van Camp , 1993; Eilts et al., 1995).

Outros estudos sugerem também que a viabilidade dos oócitos bem como dos embriões, é menor em éguas com idade superior a 15 anos, independentemente da condição uterina(Carnevale e Ginther, 1994; Brinsko et al., 1995).

No presente estudo não ficou provado, estatisticamente, a influência da idade sob a fertilidade das éguas, possivelmente devido ao controlo reprodutivo minucioso a que foram submetidas, controlo esse que descartou a presença de lesões passíveis comprometer a fertilidade. É de referir também que este resultado pode estar relacionado com o tamanho da amostra, que pode não ser representativo (por exemplo: 11 éguas com 5 anos *vs* 1 éguas com 19 anos), uma vez que este estudo utiliza animais que não foram seleccionados em função da sua idade mas sim todos os animais que se deslocaram à Coudelaria em causa para fins de maneio reprodutivo.

.

- Influência do ovário ovulatório sobre a taxa de gestação.

Do total das 56 éguas inseminadas 32 (57%) ovularam do ovário esquerdo e, destas, 27 (84%) ficaram gestantes. Das restantes 24 (43%) que ovularam do ovário direito 16 (67%) ficaram gestantes. A diferença encontrada entre o ovário onde ocorreu a ovulação (57% vs 43%), é idêntica ao estudo efectuado por Zúccari *et al.* (2000). Em relação à taxa de gestação, apesar da diferença percentual, estatisticamente provou-se que o facto de o folículo ovulatório ser proveniente do ovário esquerdo ou direito não têm influência na taxa de gestação das éguas. Não foi encontrado nenhum estudo que me permitisse comparar resultados, ficando assim em aberto a hipótese para futuras investigações.

- Influência da raça sobre a taxa de gestação

A raça demonstrou, estatisticamente, não ter influência na taxa de gestação das éguas. Apesar de o número de éguas de raça CP ser inferior ao número das éguas de raça PSL, a taxa de gestação das éguas PSL foi claramente superior á taxa de gestação das éguas CP (81% *vs* 58%). Este resultado demonstra que o índice de fertilidade inerente ás éguas de raça PSL é elevado contudo não foi encontrado nenhum estudo que suporte, cientificamente, esta afirmação.

Uma das razões possíveis para a diferença entre as taxas de gestação das diferentes raças, é a possibilidade de o sémen utilizados nas éguas CP não ter sido sujeito a um controlo reprodutivo tão exigente como o sémen utilizado nas éguas PSL. Contudo, esta possibilidade é meramente especulativa, dado ao facto de este estudo não possuir dados relativos aos garanhões.

- Conclusão

No presente estudo, o ovário ovulatório, a idade das éguas, época de inseminação e a raça, não demonstraram ter influência no resultado do diagnóstico de gestação e por consequência na taxa de gestação. Contudo, a elevada taxa de gestação sugere que quanto maior for o controlo reprodutivo maior o sucesso de um programa de inseminação artificial, uma vez que minimizamos e/ou eliminamos vários factores passíveis de comprometer o sucesso de um programa de reprodução assistida.

Bibliografia

- Allen, D. G., Anderson, D. P., Jeffcott, L. B., Quesenberry, K. E., Radostits, O. M., Reeves, P. T. & Wolf, A. M. (2010). *The Merck Veterinary Manual*. (9ª ed.). Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc., pp.1759-1771.

- Allen, W. R. & Goddard, P. J. (1984). Serial investigations of early pregnancy in pony mares using a real time ultrasound scanning. *Equine Veterinary Journal*,16 (6), 509-514.

- Allen, W. R. (1994). Equine endometritis: an update on recent findings and treatment regimes. Paper presented at the Equine Practitioners Group Congress, Vancouver, Canada.

- Anderson, k. (2011).Understanding mare reproduction. Retirado em 23 Fevereiro 2013 de: http://ianrpubs.unl.edu/live/ec271/build/ec271.pdf

- Argo, C. M., (2010). How to manage the mare for artificial insemination with chilled or frozen semen. Proceedings of the 49th British Equine Veterinary Association Congress. Birmingham, United Kingdom. 139-140.

- Ashdown, R. R. & Done, S.H. (2011). *Colour Atlas of Veterinary Anatomy, Volume 2, The Horse* (2nd ed.). Maryland Heights, MO: Mosby Elsevier.840-860

- Auer, J. A., Stick, J. A. (2006). *Textbook of Equine Surgery* (3rded.). St. Louis, MO: Saunders Elsevier, pp 811-835.

- Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Brinsko, S. P. & Rigby, S. L. (2003). *Manual of Equine Reproduction* (2nded.). Maryland Heights, MO: Mosby Elsevier.

- Brinsko, S. P., Ball, B. A. & Ellington, J. E. (1995). In vitro maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares. *Theriogenology*, 44(4), 461-469.

- Brinsko, S. P., Varner S. P. , & Blanchard, T.L.(2000*).* Transported Equine Semen in: Recent Advances in Equine Reproduction, Ball B.A. (Ed.).International Veterinary Information Service, Ithaca NY.

- Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K. & Hartman, D. (2011). *Manual of Equine Reproduction* (3rded.). Maryland Heights, MO: Mosby Elsevier, pp 176-206.

- Broussard, J. R., Goodeaux, S. D., Goodeaux, L. L., Thibodeaux, J. K., Moreau, J. D, Godke, R. A. &Roussel, J. D. (1993). The effects of different types of syringes on equine spermatozoa. *Theriogenology*, 39 (2), 389-399.

- Cantuaria, G., Angioli, R., Fernandez-Abril, A., & Penalver, M. (1998). Primary malignant melanoma of the uterine cervix: case report and review of the literature.*Primary Care Update for Ob/Gyns*, 5 (4), 159-160.

- Carleton, C. L. &Nie, G. J. (2011). *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion Equine Theriogenology* (1st ed.). Ames, IA: Wiley-Blackwell, pp 92-112.
- Carnevale, E. M. & Cox, T. J. (2008). How to do induction of ovulation. Proceedings of the European Equine Meeting - XIV SIVE - FEEVA Congress, Italy, 307-309.
- Carnevale, E. M. &Ginther, O. J. (1994). Reproduction in old mares. AAEP Proceedings, 37, 15.
- Caron, J., Barber, S. & Bailey, J. (1985). Equine testicular neoplasia. *Compendium of Continuing Educationfor Practicing Vets*,6, 5296.
- Clement, F., Guerin, B., Vidament, M., Diemert, S. & Palmer, E. (1993). Microbial quality of stallion semen. *PratiqueVétérinaire Equine*,25 (1), 37–43.
- Collins, A. M. & Buckley, T. C. (1993). Comparison of methods for early pregnancy detection. *Journal of Equine Veterinary Science*,13 (11), 627–630.
- Cox, J. E. (1971). Urine tests for pregnancy in mares. *Veterinary Record*,89, 606–607.
- Crowell-Davis, S. L. (2007). Sexual behavior of mares. *Hormones and Behavior*, 52 (1), 12–17.
- Cunningham, J.G. & Klein B.G. (2007).*Textbook of Veterinary Physiology* (4ªed) Missouri, MO. Sauders 470-524
- Curran, S. & Ginther, O. J. (1989). Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. *Journal of Equine Veterinary Science*,9 (2), 77–83.
- Douglas H., Osol R, Osol G, Driscoll D, Noble H. (1984). A field study of fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, 22, 291-304.
- England, G. C. W. (2005). Fertility and Obstetrics in the Horse (3rd ed.). UK: Blackwell Publishing.
- Evans, K. L., Kasman, L. H., Hughes, J. P., Couto, M. &Lasley B. L. (1984). Pregnancy diagnosis in the domestic horse through direct urinary estrone conjugate analysis. *Theriogenology*,22 (6), 615–620.
- Evans, M. J. & Irvine, C. H. G. (1975). The serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycles and pregnancy in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*,23 (Suppl), 193-200.
- Foote, R. H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *American Society of Animal Science*, 1-10.
- Getty, R. (1986). *Sisson / Grossman - Anatomia dos animais domésticos* (5ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Gibbs, P. G. & Davidson, K. E. (1992). A field study on reproductive efficiency of mares maintained predominately on native pasture. *Equine Veterinary Journal*, 12(4), 219-222.
- Ginther, O. J. (1984). Ultrasonic evaluation of the reproductive tract of the mare: the single embryo. *Journalof Equine Veterinary Science*,4 (2), 75–81.
- Ginther, O. J. (1989). Twin embryos in mares. I: From ovulation to fixation. *Equine Veterinary Journal* ,21 (3), 166–170.
- Ginther, O. J. (1992). *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects* (2nd ed.). Cross Plains, WI: Equiservices, pp. 642.
- Griffin, P. G. (2000). The breeding soundness examination in the stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, 20 (3), 168–171.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. (2004). *Reprodução Animal* (7ª ed.). São Paulo: Manole.
- Hallowell, A. L. (1989). The use of ultrasonography in equine reproduction on the breeding farm. Proceedings of the Society of Theriogenology,202–205.
- Hansen, P. J. (1985). Photoperiodic regulation of reproduction in mammals breeding during long days versus mammals breeding during short days. *Animal Reproduction Science*, 9 (4), 301-315.
- Henderson, K., Stevens, S., Bailey, C., Hall, G., Stewart, J. & Wards, R. (1998). Comparison of the merits of measuring equine chorionic gonadotrophin (eCG) and blood and faecal concentrations of oestrone sulphate for determining pregnancy status of miniature horses. *Reproduction, Fertility and Development*,10(5), 441–444.
- Henneke, D. R., Potter, G. D. &Kreider, J. L. (1984). Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares, *Theriogenology*,21 (6), 897-909.
- Ivanoff, E. I. (1922). On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. Journal of AgriculturalScience, 12, 244–256.
- Jasko, D. J., Moran, D. M., Farlin, M. E. & Squires E. L. (1991). Effect of Seminal Plasma Dilution or Removal on Spermatozoal Motion Characteristics of Cooled Stallion Semen. *Theriogenology*; 35 (6), 1059-1067.
- Jasko, D. J., Moran, D. M., Farlin, M. E., Squires, E .L.,Amann, R. P. & Pickett, B. W. (1992). Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed semen. Proceedings of the 38th Annual Convention of the AAEP, 649-660.
- Johnson, L. & Thompson, D. L. (1983). Age related and seasonal variation in the sertoli cell population, daily sperm production and serum concentration of follicle stimulating hormone, luteinising hormone and testosterone in stallions. *Biology of Reproduction*,29 (3), 777–789.

- Johnson, L. A., Welch, G. R., Rens, W. &Dobrinsky, J. R. (1998**).** Enhanced cytometric sorting of mammalian X and Y sperm: high speed sorting and orientating nozzle for artificial insemination. *Theriogenology*, 49 (1), 361.

- Junqueira, L. C. e Carneiro, J.(2004). *Histologia Básica* (10ª ed.). Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, pp.200-470.

- Kayser, J. P., Amann, R. P., Sheideler, R. K., Squires, E. L., Jasko, D. J. & Pickett, B. W. (1992) Effects of linear cooling rates on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38 (4), 601–614.

- Laing, J. A., Morgan, W. J. B. & Wagner, W. C. (1988). *Fertility & infertility in veterinary practice* (4thed.). London: BaillièreTindall, pp.140-159.

- Laing, j. A. & Leech, F. B. (1975). The frequency of infertilty in thoroughbred mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 23 (Suppl.), 307-310.

- Ley, W. B. (2006). *Reprodução em éguas para veterinários de equinos* (1ª ed.). São Paulo: Roca.

- Loomis, P. R. (2011). Processing Semen for Cooled Transport. Proceedings of the 17th Congress of the Italian Association of Equine Veterinarians, 23-26.

- Loomis, P. R. (2001). The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction. Science*, 68 (3-4), 191-200.

- Love, C. C. (1992). Semen collection techniques. *Veterinary Clinics of North America, Equine Practice*,8 (1), 111–128.

- McAllister, R.A. & Sack, W.O. (1990). Identification of anatomical features of the equine clitoris as potential growth sites for Taylorella equigenitalis. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 196(12), 1965–1966.

- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. & Varner, D. D. (2011). *Equine Reproduction* (2nded.). Ames, IA: Wiley-Blackwell.

- Metcalf, E. S. (1998). Pregnancy rates with cooled equine semen received in private practice. AAEP Proceedings, 44, 16-18.

- Morel, M. C. G. D. (2003). *Equine Reproductive Physiology,Breeding and Stud Management* (2nded.). UK: CABI Publishing.

- Morel, M. C. G. D. (2005). *Breeding Horses* (1sted.). UK: Blackwell Publishing.

- Morrow, D. A. (1986). *Current therapy in theriogenology* (1sted.). Philadelphia: Saunders Co, pp670-678, 721-736.

- Nagy, P., Guillame. D. &Daels, P. F. (2000). Seasonality in mares. *Animal Reproduction Science,* 60/61, 245 – 262.

- Papa, F.O., Alvarenga, M.A., Dell`Aqua jr,J.A.(2008). Manual de Andrologia e Manipulação de Sémen Equino. Botucatu,SP,Brasil. 1-33

- Pickett, B. W., Amann, R. P., & McKinnon, A. O. (1989). *Management of the stallion for maximum reproductive efficiency* (1st ed.). Fort Collins, CO: Animal Reproduction Laboratory, CSU, pp 59–64.

- Pommer, A. C., Linfor, J. J. & Meyers, S. A. (2002). Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. *Theriogenology*, (57), 1493-1501.

- Province, C. A., Squires, E. L., Pickett, B. W. & Amann, R. P. (1985). Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology,* (23), 925-934.

- Raeside, J. I., Ryan, P. L. & Lucas, Z. (1991). A method for the measurement of oestronesulphate in faeces in feral mares. *Journal of Reproduction and Fertility,* 44, 638.

- Rantanen, N. W. & McKinnon, A. O. (1998). *Equine Diagnostic Ultrasonography* (1sted.). Baltimore, MD: Williams and Wilkins, pp. 213-220,271-288.

- Reece, W. O. (2009). *Anatomia Funcional e Fisiologia dos Animais Domésticos* (4ª ed.). São Paulo: Roca, pp 432-492.

- Ricketts, S. (2008). Management of the broodmare. Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, Moscow, Russia, pp. 212-215.

- Robinson, N. E. &Sprayberry, K. A. (2009). *Current Therapy in EquineMedicine* (6thed.). St. Louis, MO: Saunders Elsevier, pp. 558–562.

- Sellnow L. (2000). Artificial Insemination For Horses. Retirado em 8 de Outubro de 2012 de: http://www.thehorse.com/articles/10226/artificial-insemination-for-horses

- Samper, J. C. (2009). *Equine breeding management and artificial insemination* (2nded.). St. Louis, MO: SaundersElsevier, pp.141-164, 179-194.

- Samper, J. C., Pycock, J. & McKinnon, A. O. (2007). *Current Therapy in Equine Reproduction* (2nded.). St. Louis, MO: Saunders Elsevier, pp. 32-35, 53-69, 93-104.

- Schumacher, J. (1999). Testicular neoplasia of horses: an underreported condition. *Equine Veterinary Journal*, 31 (4), 270-272.

- Silva, M. (1991) Alterações morfológicas em útero, tubas e ovários da égua. Belo Horizonte: UFMG, pp 253.

- Sist, M. D. (1987). Fecal oestrone suphate assay for pregnancy. *Veterinary Medicine* ,82, 1036–1043.

- Skaife J.S , Loomis P.R. (2010). Unpublished results collected in 2010 by Select Breeders Services Inc. Maryland.

- Sørensen, E. (1940). Insemination with gelatinized semen in paraffined cellophane tubes. *Medlernsbl.Danske Dyrlaegeforen*,23, 166–169.

- Sousa A. (2008). Reprodução Assistida. *Revista Mundo dos animais*. Retirado em Outubro de 2012, de: www.mundodosanimais.com/portal/cavalos/artigos/596reproducaoassistida.htm

- Squires, E. L., Pickett, B. W., Graham, J. K., Vanderwall, D.K., McCue P. M., Bruemmer, J. E. (1999). Cooled and frozen stallion semen. *Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory*, 9 (Suppl), 1-38.

- Thompson, D. L., Pickett, B. W., Squires, E. L., &Amann, R. P. (1979). Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 27(Suppl), 13–17.

- Thomson, A. A. &Marke, P. C. (2006). Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. *Differentiation*, 74 (7), 382–392.

- Threlfall, W. R., Carleton, C. L., Robertson, J., Rosol, T. & Gabel, A. (1990) Recurrent torsion of the spermatic chord and scrotal testis in a stallion. *Journal of American Veterinary Association*,196 (10), 1641–1643.

- Tischner, M. (1992). Equine artificial insemination in central and eastern Europe. *ActaVeterinariaScandinavica*, 88 (Suppl.), 111–115.

- Vanderwall, D. K. & Woods, G. L. (1991). Age-related subfertility in the mare. AAEP Proceedings, 36, 85-89.

- Varner D. D., Blanchard T. L., Love C. L., Garcia M. C. & Kenney R. M. (1987). Effects of Semen Fractionation and Dilution Ratio on Equine Spermatozoal Motility Parameters. *Theriogenology*. 28,709-724.

- Varner, D. D., Blanchard, T. L., Meyers, P. J., Meyers, S. A. (1989). Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20ºC. *Theriogenology*, v.32, p.515-525, 1989.

- Zafracas, A. M. (1994). The equines in Greece nowadays. *Bulletin of Veterinary Medical Society*,45 (4), 333–338.

- Zúccari, C. E. S. N., Nunes, D. B. & Corrêa Filho, R. A. C. (2000). Reproductive efficiency mare equine pantaneiro breed. *Arcquivos de zootecnia,* vol. 51, p148.

Anexo 1

- _____

- _____

- Teste à diferença de proporções, a estatística do teste é:

$$ET = \frac{f_A - f_B}{\sqrt{\frac{\hat{\pi}_A (1-\hat{\pi}_A)}{n_A} + \frac{\hat{\pi}_B (1-\hat{\pi}_B)}{n_B}}}$$

- Teste do qui-quadrado da independência de variáveis,

  Este teste é unilateral à direita e a sua estatística do teste, ET, é igual a:

$$ET = \sum_i \sum_j \frac{(o_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$$

  ET, segue uma distribuição do qui-quadrado com 1 grau de liberdade, GL, já que:

  GL = (n.º de valores possíveis para a primeira variável – 1) x (n.º de valores possíveis para a segunda variável – 1)

  o_{ij} é a frequência simples absoluta observada para a combinação do valor i da primeira variável e do valor j da segunda variável. e_{ij} é o valor teórico esperado para a frequência da mesma combinação de valores, sob H0, calculado da seguinte forma:

$$e_{ij} = \frac{n_{1i} \times n_{2j}}{n}$$

expressão na qual n é a dimensão amostral, n_{1i} é a frequência do valor i da primeira variável e n_{2j} é a frequência do valor j da segunda variável.