ANTÓNIO ISAAC RIBEIRO TELLES IGREJAS BASTOS

Reprodução Assistida Em Equinos:

Um Exemplo Práctico.

Orientador: Manuel Pequito

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

LISBOA

2017

ANTÓNIO ISAAC RIBEIRO TELLES IGREJAS BASTOS

Reprodução Assistida Em Equinos:

Um Exemplo Práctico.

Dissertação defendida em provas publicas para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado em Medicina Veterinária Conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias,
Dia 12 DE Outobro com o Despacho Reitoral nº 306/2017
Com a seguinte composição de Júri:
Presidente:Professora Doutora Laurentina Pedroso
Arguente: Professor Doutor António Rocha
Orientador: Professor Doutor Manuel Pequito

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

LISBOA

2017

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Manuel Pequito, meu orientador, quero agradecer a disponibilidade sempre demonstrada e a sua experiência e orientação, que me ajudaram a transformar o difícil no fácil.

Agradecimento especial ao Dr. José Carlos Duarte, meu responsável externo e co-orientador na dissertação, tal como ao Dr. Luís Fragoso e particularmente á Dra. Cristina Cosinha que foram também os meus dirigentes durante todo o tempo de estágio que fiz na LusoPecus, no qual me transmitiram o seu conhecimento e experiência profissional sem qualquer restrição ou reserva e me demonstraram o que é ser um médico veterinário competente. Uma palavra também para toda a disponibilidade que demonstraram para me ajudar em qualquer coisa que precisa-se e pela sua amizade.

Á professora Maria Gaivão agradecer a ajuda e disponibilidade demonstrada sempre que foi preciso.

A toda a equipa da LusoPecus, Sr. Armando, Cristina, Dona Dulce pela forma como me receberam e pela amizade que, com certeza, ficará sempre.

Aos meus amigos que durante todo o tempo do curso me acompanharam e ajudaram a realizar o mesmo.

A todos os professores do curso, que de alguma forma me transmitiram o conhecimento necessário para chegar a esta fase.

Á minha família toda, especialmente a minha Mãe e irmãos e ao meu Tio João pela ajuda e apoio demonstrado.

Á Pipa, por insistir comigo quando era preciso, e pela disposição que me deu para conseguir concluir esta dissertação.

Por último o maior dos agradecimentos ao meu avô David, que sempre quis ver este curso terminado e porque sem o seu apoio, conselhos e dedicação nunca teria sido possível.

Obrigado.

Resumo

A reprodução assistida nos equinos tem crescido de forma notável em Portugal. A inseminação artificial gera ganhos genéticos que antes eram impossíveis, devido principalmente, ao encurtamento das distâncias que separam as éguas e garanhões, bem como a algumas patologias que são agora ultrapassadas e resolvidas facilmente pela inseminação artificial.

Este crescimento e importância da reprodução assistida nos equinos justificam este estudo, que tem como objectivo a documentação dos dados recolhidos, ao longo de uma época reprodutiva, num centro de atendimento médico-veterinário especializado em reprodução de equinos, com o fim de sistematizar e avaliar os elementos adquiridos através de múltiplas ecografias.

O presente estudo caracteriza uma população de éguas, ao longo de uma época reprodutiva, que foi acompanhada, num centro e reprodução, desde a sua entrada em observação até á obtenção de um diagnóstico de gestação.

Os parâmetros analisados e comparados, para além da caracterização da população estudada, foram também, as taxas de gestação conseguidas com os diferentes tipos de sémen, os ciclos reprodutivos, as raças das éguas e respectivas idades.

Das 68 éguas em estudo, 76,46% ficaram gestantes. As gestações obtidas com sémen congelado atingiram valores muito equiparados aos conseguidos com sémen Refrigerado/Fresco. Obteve-se cerca de 78,9% de diagnósticos positivos com sémen congelado em oposição a 84,6% com sémen Refrigerado/Fresco. Através dos resultados desenvolvidos durante o estudo, pode dizer-se que, neste caso, não houve relação evidente entre o resultado da inseminação e o tipo de sémen usado.

Os resultados deste estudo evidenciam as vantagens que um programa de inseminação pode criar numa coudelaria. Os resultados encontrados chamam a atenção para a possibilidade de realizar programas de reprodução bastante satisfatórios, com ganhos económicos e de *upgrade* genético considerável.

PALAVRAS - CHAVE: Égua; Reprodução; Seguimento Reprodutivo; Ecografia; Inseminação; Sémen Congelado; Sémen Refrigerado; Diagnostico de Gestação.

Abstract

Assisted reproduction in horses has grown remarkably in Portugal. Artificial insemination has it made possible to generate genetic gains that could not be attained in the past. This is mainly due to the shortening of distances between mares and stallions and to the emergence of new ways to resolve and overcome the problems raised by some pathologies.

This growth and the importance of assisted reproduction in horses justify this study, which aims to document the data collected during a reproductive period in a medical-veterinary center specialized in equine reproduction, in order to systematize and evaluate the information acquired through multiple ultrasounds.

The present study characterizes the population of mares followed in a reproduction center over the course of a reproductive period, from the moment of their admission up to the diagnosis of gestation.

Besides characterizing the population under study, the other parameters analyzed and compared include the gestation rates obtained with the different types of semen, the reproductive cycles, the breeds of the mares and their ages.

Of the 68 mares studied, 76.46% became pregnant. Pregnancies obtained with frozen semen reached values very similar to those obtained with refrigerated/fresh semen: approximately 78.9% of positive diagnoses with frozen semen vs. 84.6% with refrigerated/fresh semen. Based on the results obtained in our study, there was no clear relation between the results of the insemination and the type of semen used.

This study confirm the advantages of setting up an insemination program in a stud farm. Quite satisfactory breeding programs can be easily implemented, resulting in economic gains and considerable genetic upgrading.

KEYWORDS: Reproduction; Reproductive Follow-up; Ultrasound; Insemination; Frozen Semen; Refrigerated Semen; Pregnancy Diagnosis.

Índice Geral

Resumo 2
Abstract 3
Índice De Gráficos 6
Índice De Figuras 7
Índice De Tabelas 8
1) Breve Resumo Da Casuística Observada ao Longo de Todo o Estágio 9
2) Revisão literatura 11
2.1) Reprodução assistida de equinos em Portugal – contextualização histórica 11
2.2) A Égua 13
2.2.1) Sistema Reprodutor da Égua – Anatomia 13
2.2.2) Ciclo Reprodutivo Da Égua – Aspectos Fisiológicos. 15
2.3) O Cavalo – Garanhão 18
2.3.1) Considerações Fisiológicas e Anatómicas do Sistema e Ciclo Reprodutivo do Garanhão. 18
2.3.2) Sémen – Ejaculado – Espermatozóide 20
2.3.3) Recolha Sémen em Garanhões 22
2.3.4) Avaliação Do Sémen 25
2.4) Inseminação Artificial na Reprodução Equina 29
2.4.1) Técnica de Inseminação, Dose Inseminante, principais vantagens e desvantagens da IA 29
2.4.2.)Preparar para inseminar? Quando inseminar: Égua e a preparação e controlo para a inseminação. O Sémen. 31
2.4.3.) Inseminação Artificial – Sémen Fresco, Refrigerado e Congelado. 33
3) Justificação e Objectivos 37
4) Material e Métodos 38
5) Resultado 40
6) Discussão 52
7) Conclusão 61
Referencias Bibliográficas 62
ANEXO 1 70

Lista De Abreviaturas

ART – Tecnologias de Reprodução Assistida

IA – Inseminação Artificial

TE – Transferência De Embriões

APSL – Associação Puro – Sangue Lusitano

ADS – Agrupamento Defesa Sanitária

PSL – Puro-sangue Lusitano

PSA – Puro-sangue Árabe

GnRH – Hormona Libertadora De Gonadotrofinas

LH – Hormona Luteinizante

FSH – Hormona Folículo Estimulante

PGF2α – Prostaglandina $F_{2\alpha}$

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

VA – Vagina Artificial

PVC – Policloreto De Polivinila

^{0}C – Graus Celsius

Spz – Espermatozóides

ml – Mililitro

cm – Centimetro

mm – Milimetro

UI – Unidades Internacionais.

DP – Desvio Padrão

Índice De Gráficos

Gráfico 1 – Representação da Raça……..Pag.41

Gráfico 2 – Tipos de Sémen usado Para o Número de Éguas…….……..Pag.41

Gráfico 3 – Idade das éguas em estudo……Pag.41

Gráfico 4 – Representação da Taxa de Sucesso Final……..Pag.42

Gráfico 5 – Representação da Lateralidade dos Ciclos.…….....……...Pag.44

Gráfico 6 – Taxa de Sucesso por Lateralidade de Ovário……....Pag.45

Gráfico 7 – Representação do Número de Éguas Inseminadas Por Cada Cavalo…Pag.46

Gráfico 8 – Média de Idade das Éguas por Resultado aos 15 dias e Tipo de Sémen……...Pag.52

Índice De Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do Ovário da Égua……. Pag.14

Figura 2 – Representação Esquemática do Órgão Genital Feminino da Égua…….Pag.15

Figura 3 – Resumo Simplificado das Principais Alterações da concentração Hormonal Plasmática Durante o Ciclo Estral da Égua não Prenhe……..Pag 18

Figura 4 – Representação Esquemática do Modelo de Vagina Artificial para Equino…..Pag 24

Figura 5 – Manequim utilizado para colheita de Sémen em Garanhões no centro de recolha de sémen e inseminação artificial da *Lusopecus*……Pag.26

Índice De Tabelas

Tabela 1 – Representação do Numero de éguas a ser Seguida e com Diagnostico Positivo ou Negativo Conforme o mês…….Pag.42

Tabela 2 – Representação da Relação no Número de Ecografias e de Ciclos Observados com o Numero de éguas e o diferente Tio de Sémen……..…….Pag.43

Tabela 3 – Nº de Ecografias Realizadas por Égua em Função do nº de Ciclos Seguidos……Pag.43

Tabela 4 – Testagem das Relações Lateralidade do Ciclo e Resultado da Inseminação, Efectuadas Através de Testes Qui-quadrado…….….Pag.45

Tabela 5 – Resultado da Inseminação das Éguas Seguidas Tipo de Sémen…….Pag.46

Tabela 6 – Inseminação de Sémen Congelado por Ciclo Observado……...Pag.47

Tabela 7 – Inseminação de Sémen Refrigerado/Fresco por Ciclo Observado…….Pag.48

Tabela 8 – Testagem de Relações Efectuadas Através de Testes Qui-quadrado….Pag.48

Tabela 9 – Ciclos Médios Por Égua em Função do Tipo de Sémen……....Pag.49

Tabela 10 – Média de Ecografias em Função do Tipo de Sémen……Pag.50

Tabela 11 – Resultado Das éguas Avaliadas por Raça…..……Pag.50

Tabela 12 – Testagem das Relações Raça da égua e Resultado da inseminação, Efectuadas Através de Testes de Qui-quadrado....……..……...Pag.51

Tabela 13 – Média de Idades das Éguas em Função dos Resultados das Inseminações…..……..Pag.51

Tabela 14 – Idade das Éguas por Tipo de Inseminação……...Pag.52

1) Breve Resumo Da Casuística Observada ao Longo de Todo o Estágio

A presente dissertação tem como base um estágio de natureza curricular, parte complementar do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Estágio efectuado na LUSOPECUS, clinica de prestação de serviços veterinários e de comercialização de produtos agro-pecuários, com sede situada no Porto Alto, sob orientação do Dr. José Carlos Duarte e com a colaboração do Dr. Luís Fragoso e da Dra. Cristina Cosinha.

Este período de estágio teve duração de 9 meses, compreendidos entre 1 de Novembro de 2015 e 31 de Julho de 2016, e pode ser dividido em duas fases distintas, ambas no âmbito dos animais de grande porte.

Uma primeira fase, com duração de 3 meses (Novembro, Dezembro e Janeiro), com trabalho sob orientação do Doutor Luís Fragoso, em clínica de bovinos e pequenos ruminantes. Na maioria das vezes, foram realizados, serviços do Agrupamento Defesa Sanitária (ADS) do Baixo Tejo, do qual o Dr. Luís Fragoso tem a função de coordenador. Experienciaram-se também bastantes casos clínicos, quer de bovinos quer de pequenos ruminantes (ovinos e caprinos), bem como o controlo reprodutivo de bovinos.

Neste período, os casos clínicos mais observados foram casos de reprodução, como por exemplo, dificuldades no parto e cesarianas em bovinos. Porém, além destes, casos de desidratação e fraqueza, problemas oculares e locomotores e patologias do foro gástrico-intestinal foram também experienciados. Os serviços feitos no ADS baixo tejo eram uma constante diária, realizados em diversas manadas de bovinos de raça brava e mansa e vários rebanhos de pequenos ruminantes. De referir que estes serviços de sanidade em animais de pecuária, têm um papel fundamental, pois baseiam-se essencialmente na prevenção de doenças, tanto de zoonoses como de doenças infecciosas e parasitárias, que possam pôr em causa a qualidade e bem-estar do efectivo e saúde pública. Destes serviços fizeram parte a vacinação, desparasitação, o rastreio de algumas doenças de declaração obrigatória como tuberculose, leucose, brucelose, os testes de pré-movimentação animal e identificação de animais com marcas auriculares e Chip (no caso dos pequenos ruminantes).

Após esta primeira fase de estágio, passamos para uma segunda etapa realizada em clinica de equinos, com maior foco na reprodução, trabalhando também em outros casos separados da reprodução e já totalmente sobre a orientação da Doutora Cristina

Cosinha e do Doutor José Carlos Duarte. Esta etapa desenvolveu-se ao longo de 6 meses (Fevereiro, Março, Abril, Maio, Junho e Julho), onde foi realizada clinica de equinos, em trabalho ambulatório de consultas e urgências, mas também, e principalmente, no centro de recolha e congelação de sémen de equino da LUSOPECUS, onde estavam constantemente garanhões e éguas em seguimento reprodutivo. Durante este período os trabalhos observados no âmbito da reprodução equina foram constantes e diversos. Por exemplo, a recolha e congelação de sémen, avaliação de sémen e espermograma, transferência de embriões, diagnósticos de gestação, seguimento e controlo do ciclo éstrico e preparação de éguas para cobrição ou inseminação, preparação de sémen refrigerado para envio internacional e nacional, testes andrológicos a garanhões, inseminação artificial com sémen congelado e sémen Refrigerado e Fresco. Fora do âmbito da reprodução, outros casos experienciados neste período prenderam-se maioritariamente em cólicas ou outros problemas do foro gástrico-intestinal, claudicações e exames em acto de compra, casos de urgência, como lacerações ou fracturas com necessidade de tratamento urgente, casos do sistema ocular e resenhos de identificação animal com colocação de chip e também identificação com a marca do criador a azoto liquido. Além do seguimento aproximado a poldros com problemas clínicos de neonatologia, como uraco persistente, nascimentos prematuros, hérnias umbilicais e problemas oculares e de aprumos.

De salientar que durante todo o estágio foi discutida a etiologia, os diagnósticos diferenciais, a terapêutica a instituir e os prognósticos dos diversos casos encontrados, podendo participar através do tratamento de feridas e mudanças de pensos, da administração de fármacos por diversas vias (oral, endovenosa e intramuscular), da utilização de material de diagnóstico e outras.

Dos casos observados, a fase da inseminação da égua e os seus cuidados e diferenças na inseminação com sémen congelado e fresco ou refrigerado, foram os que se revelaram mais interessantes, tendo sido então, o tema da presente dissertação em torno dessa área. Após terminado o período de estágio continuou a desenvolver-se o tratamento dos dados e resultados obtidos em clinica, de forma a conseguir sumarizar o trabalho realizado ao longo de toda a época.

2) Revisão literatura

2.1) Reprodução assistida de equinos em Portugal – contextualização histórica

Para compreendermos a evolução e importância do controlo reprodutivo nos equinos é necessário reflectirmos sobre o início do cavalo e a importância do mesmo na história do Homem. O cavalo esta completamente ligado ao progresso humano, o uso e exploração da força deste animal dissipa-se na historia mas o que se pensa ser a primeira relação com o cavalo desvenda-se em varias pinturas rupestres por todo o mundo e parece ter sido a caça. Primeiro como presa ou depois como ajuda ao homem nas caçadas o cavalo começa a fazer parte do quotidiano humano e a sua domesticação acredita-se que terá ocorrido á cerca de 5000-6000 anos por povos nómadas da eurásia (Warmuth *et al.*, 2012). A partir dai a vida do homem e do cavalo tornou-se numa relação próxima que marcou a evolução de ambas as espécies em todos os sentidos, a maneira de viajar, o comércio, o lazer, o trabalho, a guerra e muitas outras actividades foram profundamente marcadas pelo uso do cavalo e também o cavalo foi começando a ser seleccionado e moldado para os diferentes usos a que tinha destino (American Museum of Natural History, 2008/2009a). As qualidades de cada cavalo determinaram o uso que se fazia dele, os mais rápidos para mensageiros, os mais fortes e pesados para o trabalho de campo, transporte de carruagens e alfaias agrícolas e os "*amblers"*, que tinham um passo mais lento, para a equitação (AMNH, 2008/2009b).

De acordo com a European Horse Network, actualmente o impacto económico total do "mundo do cavalo" na Europa poderá ser de mais de 100 biliões de euros por ano com 6 milhões ou mais cavalos, 400 000 empregos a tempo inteiro e 5% de aumento anual de cavaleiros (European Horse Network, 2010), muito devido a este impacto económico a reprodução assistida nos equinos se tornou necessária e indispensável e evoluiu até ao que é hoje.

O desenvolvimento das tecnologias de reprodução assistida (ART) no cavalo remonta ao século XIX com o estabelecimento de gestações em equinos obtidas por meio de inseminação artificial e transferência de embriões (TE) e utilizando cada vez mais inúmeras outras tecnologias de reprodução (Landim-Alvarenga et al., 2008).

A primeira documentação de um poldro nascido recorrendo a utilização de sémen congelado já data do ano de 1957 (Miller, 2008).

A primeira referência da utilização da IA em equinos remonta a 1322, pelos Árabes, no entanto foi só em 1780 que esta técnica foi documentada pela primeira vez (Morel, 1999).

A IA na espécie equina tornou-se muito mais exequível com o aparecimento dos programas de sincronização e indução de estro (Ax et al., 2004) e em Portugal, o desenvolvimento do Cavalo Puro-sangue Lusitano tem sido um incentivo também para a evolução do controlo reprodutivo equino no pais, contudo, e embora mais desenvolvido que nunca na área, Portugal não atinge o grau de progresso de países como os EUA, Reino Unido, Alemanha, Holanda, Bélgica, França ou Suíça (Lopes da Costa et al., 2007). Isto deve-se sobretudo à dimensão do mercado nacional, que leva a que as receitas da produção animal não permitam um investimento equiparável ao dos outros países, limitando o desenvolvimento e/ou aplicação das técnicas até agora desenvolvidas. As primeiras ART mais utilizadas em Portugal, como a IA e a TE, foram realizadas em animais de produção (bovinos, caprinos, ovinos, suínos), pelo enorme interesse que estes têm na indústria animal (Duarte J.C., 2007), mas o acompanhamento reprodutivo equino em Portugal começa a fazer-se regularmente e com maior evolução na década de 80 em paralelo com o aumento do impacto económico e genético do cavalo lusitano no desporto e fora dele, na "base deste "boom" estão três pilares principais:

a) O reconhecimento internacional das qualidades do cavalo Lusitano, com exportações periódicas expressivas a partir de 1984, nomeadamente para o Brasil; pela primeira vez, empresários brasileiros reconheceram o enorme valor dos nossos cavalos e ofereceram valores elevados, comprando grandes quantidades de animais da nossa melhor genética, tornando o negócio praticamente irrecusável.

b) Entrada na Comunidade Económica Europeia em 1986 e consequente abolição das fronteiras, consentindo o livre-trânsito de animais e pessoas e, logo, abrindo o negócio à Europa;

c) Gestão através das organizações dos criadores a partir de 1990 – neste caso da Associação Puro-Sangue Lusitano – do livro Genealógico da raça que proporcionou um significativo valor acrescentado aos animais.

Estes três acontecimentos levaram a uma preocupação acrescida dos criadores em melhorar a eficácia reprodutiva dos seus cavalos, resultando num investimento crescente em serviços veterinários nesta área." (Duarte J.C., 2008).

2.2) A Égua

2.2.1) Sistema Reprodutor da Égua – Anatomia

O sistema reprodutor da égua é constituído por órgãos e gonadas que se dividem em segmentos que produzem, transportam e armazenam os gametas. Assim, diz-se que fazem directamente parte dele os ovários, ovidutos, cornos uterinos, corpo do útero, cérvix, vagina e vulva (Getty, Grossman & Sisson, 1981).

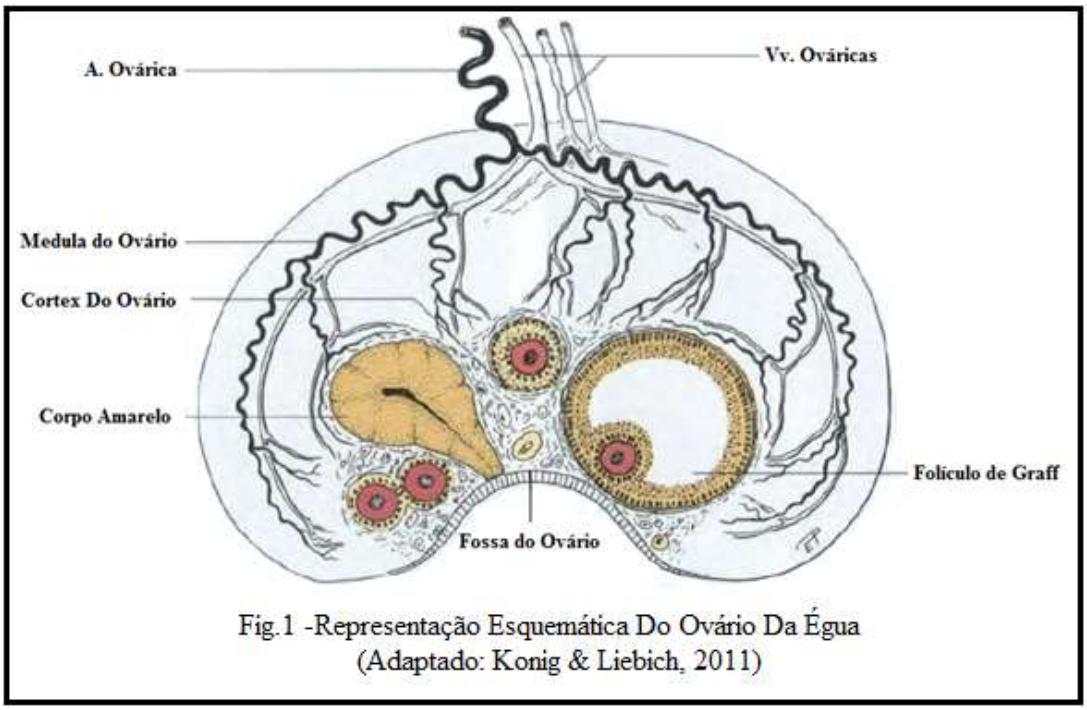


Fig.1 -Representação Esquemática Do Ovário Da Égua
(Adaptado: Konig & Liebich, 2011)

Os ovários têm uma disposição par e uma estrutura que nas éguas se vê inversa às outras espécies domésticas, na égua a zona medular (zona vasculosa), rica em vasos sanguíneos, rodeia em forma de campana a zona parenquimatosa do ovário (córtex) que alcança a superfície do ovário apenas na fossa do ovário (fossa ovarii), no bordo livre do mesmo. Por isso na égua se fala em sentido amplo de uma "fossa de ovulação" (Donadeu & Pedersen, 2008; Konig & Liebich, 2011. V2, pp.135-151).

O ovário tem funções de formação das células germinais femininas, óvulos, mas além disso tem também importante função de glândula endócrina. A ligação dos ovários ao útero é feita pelas trompas uterinas ou ovidutos, estrutura também ela par e que pode ser dividida em três partes distintas: infundíbulo, ampula e istmo. Destas três zonas o infundíbulo esta ligado ao ovário, e por isso á fossa ovulatória, que tem uma abertura para o mesmo, a sua parede é revestida de filamentos pequenos que têm função de conduzir os óvulos para a ampula, extensão mais larga de todo o oviduto e onde esta

descrita a ocorrência da fecundação dos óvulos pelos espermatozóides. Depois da ampula existe então o istmo, que a liga ao extremo do corno do útero. Na égua, a abertura que comunica com o útero, orifício uterino da trompa (ostium uterinum tubea), encontra-se sobre uma papila que representa uma barreira contra as infecções ascendentes (Mouguelar et al., 2015; Konig & Liebich, 2011. V2, pp.135-151; Morel, 2003. Cap.1, pp.1-15).

O útero é composto por dois cornos uterinos, um corpo uterino e um cérvix. Ambas as margens uterinas são unidas à parede pélvica e abdominal pelo ligamento largo (Hafez & Hafez, 2004a). É um órgão muscular e o seu tamanho depende directamente da idade e número de partos da égua, ou seja, éguas mais velhas ou que já tenham parido mais vezes tendem a apresentar úteros maiores (Morel, 2003).

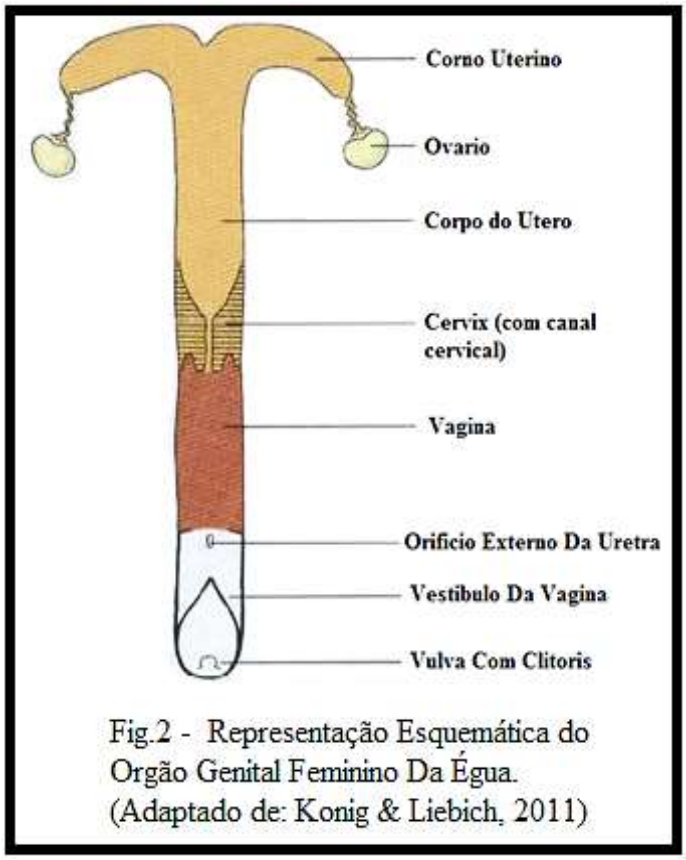


Fig.2 - Representação Esquemática do Orgão Genital Feminino Da Égua. (Adaptado de: Konig & Liebich, 2011)

Na égua, o útero apresenta uma forma simples, em "Y" ou "T", em que predomina o corpo do útero em relação aos dois cornos uterinos. O corpo do útero com maior capacidade é o da égua e a sua parede uterina é composta por três camadas: uma externa (perimétrio), uma intermédia (miométrio) e uma interna (endométrio). O miométrio é a camada com maior poder muscular da parede do útero e este facto permite o alargamento do útero durante a gestação e a ocorrência de contracções cíclicas que são fundamentais no parto. (Konig & Liebich, 2011. V2, pp.135-151)

O útero termina na sua porção mais caudal com o cérvix, estrutura semelhante a um esfíncter, funciona como um músculo protector do sistema reprodutor, abrindo ou fechando a ligação entre os lúmenes vaginal e uterino (Meijer & Van Vlissingen, 1993). O tamanho ou abertura do cérvix é determinado pelo estado hormonal da égua e ocorre que durante o estro o cérvix dilata-se mais facilmente do que no diestro.

A vagina faz a conexão entre o cérvix e a vulva e no sentido prático a vagina é apenas a parte que se encontra entre o útero e a abertura externa da uretra, sendo que o nome dado á secção localizada entre esta abertura e a vulva é vestíbulo da vagina (Meijer & Van Vlissingen, 1993). A membrana mucosa que reveste o interior da vagina é desprovida de glândulas e o tecido conjuntivo envolvente confere-lhe elasticidade, é composto por colagénio e rico em gânglios, vasos sanguíneos e tecido adiposo (Morel, 2003. Cap.1, pp.1-15; Ley, 2003).

A porção final da vagina é depois encerrada com a Vulva, que a separa do exterior e é composta por dois lábios verticais correspondendo à porção do tracto genital que é comum tanto ao sistema reprodutivo como ao urinário. A principal função da vulva é a protecção da entrada da vagina e juntamente com esta, um dos importantes órgãos que estão directamente envolvidos na cópula (Meijer & Van Vlissingen, 1993).

2.2.2) Ciclo Reprodutivo Da Égua – Aspectos Fisiológicos.

Quando se fala em ciclo reprodutivo nas éguas diz-se que, em termos de expressão reprodutiva, as éguas são poliéstricas sazonais, o que quer dizer que, existe uma altura do ano em que a maioria das fêmeas não apresenta actividade reprodutiva (anestro) e um restante período, onde ocorrem ciclos estricos regulares e repetidos, enquanto a égua não ficar gestante (Morel, 2003. Cap.3, pp.28-39).

Para que se possa implementar um programa de inseminação bem-sucedido é de extrema importância que se conheça bem o ciclo estrico da égua no seu todo, a duração de todas as suas fases e componentes é importante, bem como o momento exacto de ovulação e a altura ideal de inseminar a égua (Romano, Mucciolo & Feliciano e Silva, 1998)

As éguas são maioritariamente poliéstricas sazonais e a condição corporal e o fotoperíodo são os factores externos mais importantes na sincronização e início da actividade reprodutiva anual das éguas, a máxima actividade ovárica ocorre durante dias mais longos e com mais horas de luz (primavera-verão) enquanto a mínima actividade ovárica ocorre durante dias mais curtos (Nagy *et al.* 2000; Hafez & Hafez, 2004b).

Quer isto dizer que a variação do fotoperíodo talvez seja o sinal ambiental mais importante que orienta o eixo hipófise-gónada (Hafez & Hafez, 2004b), com dias mais longos e mais luz a produção de hormonas essenciais á ciclicidade reprodutiva aumenta e por isso aumenta a actividade sexual nos meses de mais luminosidade diária. O

aumento das noites e menos horas de luz durante o dia estimula a secreção de melatonina pela pineal durante a escuridão, que por sua vez bloqueia a secreção de Hormona Libertadora de Gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo (Morel, 2003.Cap.3, pp.28-39; Hafez & Hafez, 2004b; Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha et al., 2011) que é responsável pela libertação da Hormona Luteinizante (LH) e da Hormona Folículo-Estimulante (FSH), regredindo assim também a existência destas hormonas com elevada importância na actividade ovárica que por isso regride a expressão reprodutiva da égua.

A expressão máxima do comportamento reprodutivo da égua começa a tornar-se visível então aquando da diminuição das horas de escuridão e aumento das horas de luz, ou seja, quando as horas de luz aumentam a produção de melatonina pela hipifise reduz, estimulando a produção de GnRH pelo Hipotálamo que irá estimular a secreção produção de LH e FSH pela hipófise, hormonas gonadotrofinas responsáveis também por estimular as gónadas reprodutivas da égua a produzir estrogénios e progesterona, outras duas hormonas essenciais á actividade reprodutiva. Assim, as gonadotrofinas ao alcançarem o ovário vão estimular o crescimento folicular, activar o comportamento de cio e consequentemente consumar a ovulação. (Morel, 2003.Cap.3, pp.28-39; Crowell-Davis, 2007; Chemineau *et al.*, 2008; Cuervo-Arango & Clark, 2010)

O sinal hormonal dado pela melatonina que resulta da duração das horas de luz e por isso, dos dias, inicia uma cadeia de acontecimentos que afectam directa e indirectamente o hipotálamo e a produção de GnRH, a hipófise e a produção de FSH e LH e, consequentemente, o desenvolvimento ovárico e folicular e ovulação. (Blanchard *et al.*, 2003a; Bergfelt, 2009).

A partir do momento que a égua inicie a sua época reprodutiva anual o seu ciclo estrico tem em média entre os 21 e 22 dias de duração, que se dividem em duas fases, a fase folicular que corresponde ao estro e a fase lútea que corresponde ao diestro. O estro ou fase folicular tem duração média de 7 dias podendo variar entre os 5 e 9 dias e corresponde a fase em que existe a dominância de um folículo que irá ovular e onde a égua está sexualmente receptiva ao garanhão exibindo o comportamento de cio (Hafez & Hafez, 2004b; Romano, Mucciolo & Feliciano e Silva, 1997).

O diestro ou fase lútea pode ir até 17dias, mas tem em média 14 dias, durante os quais existe a dominância de um corpo lúteo que tem origem no colapso sofrido pelo folículo apos a ovulação e funciona como glândula endócrina, cuja função será preparar o útero para implantação do ovulo fecundado (Hafez & Hafez, 2004b).

A elevada e gradual produção de progesterona pelo corpo lúteo á medida que se desenvolve tem um efeito de feedback negativo no crescimento folicular e por isso há supressão do comportamento de estro após a ovulação. Caso não haja ovulo fecundado, ou seja, inicio de gestação, o fim do diestro é marcado pela regressão do corpo lúteo, a lúteolise, que se dá sob a influência de uma libertação pulsátil de prostaglandina F2α (PGF2α) a partir do endométrio 14 ou 15 dias após a ovulação e início de uma nova fase folicular dentro de 1 ou 2 dias. Se houver embrião, inibe a síntese da $PGF_{2\alpha}$ podendo a gestação assim progredir. (Hafez & Hafez, 2004b; Torres & Sanchez, 2008)

Consequência de uma quebra na produção de progesterona pela lúteolise, devido á acção da $PGF_{2\alpha}$ no corpo lúteo, acontece que o ciclo estrico segue o seu caminho e ocorre nova fase de estro (Torres & Sanchez, 2008).

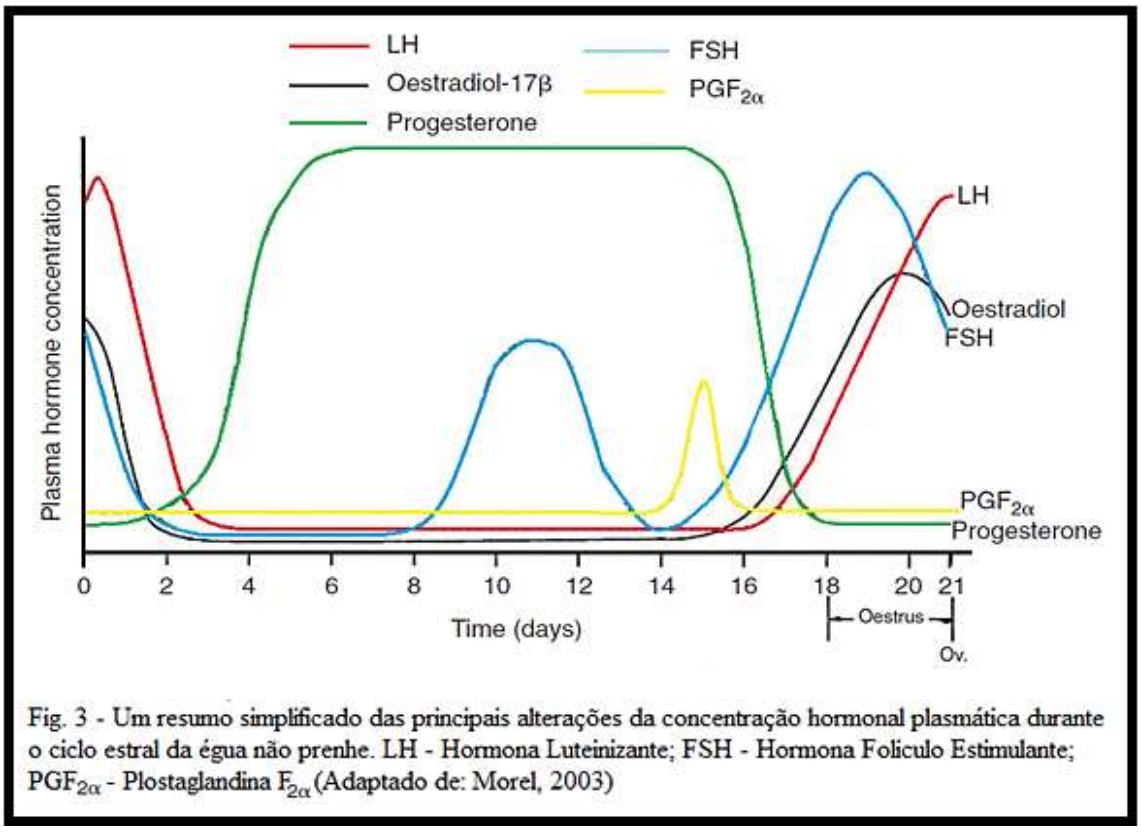


Fig. 3 - Um resumo simplificado das principais alterações da concentração hormonal plasmática durante o ciclo estral da égua não prenhe. LH - Hormona Luteinizante; FSH - Hormona Foliculo Estimulante; $PGF_{2\alpha}$ - Plostaglandina $F_{2\alpha}$ (Adaptado de: Morel, 2003)

A diminuição da progesterona tem um efeito de segregação positivo de gonadotrofinas, GnRH, pela pituitária que se traduz num aumento da produção de LH e FSH e portanto num novo desenvolvimento e maturação dos folículos que consequentemente vão aumentar a produção de estrogénios. O estrogénio, hormona predominante durante o estro, agora produzida pelos folículos faz aumentar a frequência de pulsos de GnRH, favorecendo a secreção de LH relativamente é FSH, com um maior efeito de feedback positivo na produção de LH, que irá aumentar ainda mais, e á medida

que os folículos vão crescendo e produzindo estrogénios existe também um efeito de feedback negativo na produção de FSH o que explica uma maior quantidade de LH comparativamente á FSH na altura da ovulação (Morel, 2003.Cap.3, pp.28-39; Hafez & Hafez, 2004b).

Este aumento de estrogénio é também responsável pelo edema uterino verificado durante esta fase de estro que tende a ser diminuído nos dois dias antes da ovulação. Nas éguas um pico de LH ocorre após a ovulação, ao contrário do que acontece nas outras espécies onde este pico ocorre imediatamente antes da ovulação (Hafez & Hafez, 2004b).

O comportamento de estro é suprimido após a ovulação do folículo dominante com o aumento gradual da concentração de progesterona em circulação associada ao desenvolvimento do corpo lúteo formado (Blanchard *et al.*, 2003a).

2.3) O Cavalo – Garanhão

2.3.1) Considerações Fisiológicas e Anatómicas do Sistema e Ciclo Reprodutivo do Garanhão.

Os órgãos genitais masculinos são compostos por uma serie de segmentos, ligados entre si, e que têm a seu cargo a formação, maturação e transporte das células germinais masculinas, os espermatozóides (Konig & Liebich, 2011. V2, pp.119-134)

Os testículos, gonadas masculinas, situam-se fora do abdómen, no escroto, uma estrutura semelhante a uma bolsa, derivada da pele e da fáscia da parede abdominal, são responsáveis pela produção de hormonas e dos espermatozóides que são depois armazenados e fazem a sua maturação definitiva no Epidídimo. Depois de um longo caminho pelo ducto deferente estas células germinais masculinas, os espermatozóides, alcançam a uretra na sua parede pélvica, local onde se misturam com as secreções das glândulas genitais acessórias de maneira a formar o sémen que poderá ser depois depositado nos genitais da égua através do pénis passando pela uretra durante a cópula (Konig & Liebich, 2011. V2, pp.119-134).

O pénis é constituído anatomicamente por uretra extra-pelvica, corpo esponjoso da glande e três corpos cavernosos que estão agregados ao redor da uretra peniana e que contêm espaços cavernosos grandes onde durante a erecção ocorre o acumulo de sangue resultando o considerável aumento de tamanho do pénis (Hafez, 2004).

As glândulas genitais acessórias presentes no cavalo são a próstata, glândula bulbouretral, glândula vesicular e ampola do ducto deferente que se considera também parte das mesmas (Konig & Liebich, 2011. V2, pp.119-134).

Apesar das secreções das glândulas fornecerem um veículo liquido para o transporte dos espermatozóides a função das mesmas na reprodução e no sémen dos equinos é pouco conhecida. Sabe-se muito acerca dos seus agentes químicos específicos no entanto, por exemplo os espermatozóides da cauda do epidídimo são capazes de fertilização quando usados em inseminação sem adição das secreções das glândulas acessórias (Hafez, 2004; Hafez & Hafez, 2004b).

Não tão marcado como na égua, mas o garanhão tem actividade reprodutiva condicionada também pela sazonalidade (Janett et al., 2003).

A duração da época reprodutiva de um garanhão depende de entre outros factores, a raça, das condições ambientais e o maneio, mas de um modo geral, a sazonalidade dos garanhões é menos distinta que a das éguas e ao contrário da maior partes destas, a maioria dos garanhões tem a capacidade de reprodução durante todo o ano (Morel 1999. Cap.3 pp.37-77), ainda que numa dada altura a sua qualidade e possa ser menor.

Apesar de se saber que a produção de espermatozóides é um processo contínuo após o seu início (Brackett, 2006) está descrito também que a estação do ano afecta tanto características comportamentais como parâmetros do sémen (Agrícola *et al.* 2008; Robalo Silva *et al.,* 2007), dai que se classifique o cavalo como "reprodutor de dias longos", pois de facto da sua capacidade reprodutiva máxima é atingida durante os períodos de aumento de luz natural tal como na égua. Durante o período de mais horas de luz diária no ano, há um aumento do tamanho e peso testicular, da produção de esperma, do libido e das concentrações plasmáticas de LH, FSH e testosterona (Roser, 2009).

O controlo a nível endócrino da reprodução do garanhão é feito com base no eixo hipotálamo-hipófise-testículos, e por sua vez, tal como na égua, o hipotálamo é condicionado pela melatonina, hormona que existe em maior quantidade quanto maior forem as horas de escuridão inibindo a produção de GnRH. Quando os dias aumentam, e com eles as horas de luz e regridem as noites e as horas de escuridão, a secreção de melatonina reduz, aumentando a produção de GnRH (Morel 1999. Cap.4 pp.78-150) e com isso existe maior disponibilidade de FSH e LH na circulação sanguínea que vão

actuar sobre as células dos testículos estimulando e regularizando a espermatogénese e a esteroidogénese (Bertol, 2009).

Os dois tipos de células principais constituintes dos testiculos são as Células de Sertoli e as Células de Leydig (Morel 1999. Cap.4 pp.78-150). A LH liga-se a receptores nas células de Leydig para estimular a produção principalmente de testosterona mas também de estrogénios e diidrotestosterona que regulam as glândulas acessórias, a espermatogénese e principalmente a manutenção da libido (Bertol, 2009; Roser, 2008). Enquanto isso, a FSH se liga-se ás células de sertoli para estimular a produção maioritariamente de estrogénios mas também de factores de crescimento e inibina e activina, todos eles componentes importantes para a produção de espermatozóides. A inibina e a ativina estão relacionadas ao processo de feedback da FSH, com a manutenção da barreira hemato-testicular e do desenvolvimento das células germinativas essenciais para espermatogénese (Morel 1999. Cap.4 pp.78-150; Garner, 2004; Meyers, 2009).

Fora da época considerada melhor em termos reprodutivos, ou seja, com os dias mais curtos e mais horas de escuridão para o garanhão está descrito um aumento da percentagem de espermatozóides com anomalias morfológicas e além disso características alteradas de volume seminal, concentrações de espermatozóides, número de espermatozóides por ejaculado, número de montas por ejaculação e tempo de reacção perante uma égua em estro (Morel 1999. Cap.4 pp.78-150).

2.3.2) Sémen – Ejaculado – Espermatozóide

"O sémen é a suspensão celular líquida contendo espermatozóides (gametas masculinos) e secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino. A porção fluida dessa suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal" (Garner, 2004).

O sémen produzido pelo garanhão é assim constituído por dois componentes principais, o plasma seminal e os espermatozóides.

Os espermatozóides são produzidos na espermatogénese, que é o processo que envolve a transformação das células do epitélio germinativo em espermatozóides, ocorrem durante a mesma mitoses e meioses progressivamente, processo em que as células tronco masculinas ou espermatogónias se desenvolvem em espermatozóides. (Brackett, 2006).

Esse processo ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos e os espermatozóides são formados nesses mesmos túbulos seminíferos (Garner, 2004).

No final da espermatogénese, as espermátides maduras, produzidas durante a mesma, são liberadas no interior do lúmen dos túbulos seminíferos como espermatozóides (Brackett, 2006).

Morfologicamente o espermatozóide é constituído pela cabeça, acrossoma e cauda. A cabeça tem como principal característica o núcleo achatado de forma oval, contendo cromatina altamente condensada composta por DNA. O acrossoma caracteriza-se por ter uma fina cobertura com dupla camada de membranas que envolve intimamente o núcleo durante os últimos estágios da espermatogénese, é importante pois é a parte do espermatozóide que, juntamente com a porção anterior da região pós-acrossómica, inicialmente se funde com a membrana do oócito durante a fertilização. A cauda do espermatozóide é composta principalmente por três peças, a peça intermédia, peça principal e peça terminal e tem principal função de conferir motilidade ao espermatozóide (Garner, 2004).

O plasma seminal é uma secreção proveniente de uma serie de fontes, incluindo testículos, epidídimos e glândulas acessórias do macho (Garner, 2004). É constituído por várias substâncias que podem não ser evidentes nas restantes partes do organismo do animal, ou estarem presentes em muito maior concentração neste componente do sémen (Morel 1999. Cap.4 pp.78-150). Em algumas espécies é possível induzir a gestação com inseminação feita através de espermatozóides directamente do epidídimo sem terem contacto com o plasma seminal, por isso, talvez o significado prático do mesmo seja questionável (Hafez & Hafez, 2004c), mas está descrito que este tem várias funções que se prendem com o desempenho como substrato para o transporte de espermatozóides para a égua, que permite e inicia a maturação dos espermatozóides, assegura a sobrevivência e motilidade dos espermatozóides pelo fornecimento de energia e protege-os de flutuações da pressão osmótica (Morel 1999. Cap.4 pp.78-150).

Quando o garanhão ejacula pode-se ainda subdividir em três fracções diferentes esse ejaculado, a fracção pré-espermática, a fracção rica em esperma e a fracção pós-espermática (Mann *et al,* 1963). A fracção pré-espermática não possui geralmente espermatozóides mas caso possua são normalmente velhos e inviáveis e tem função lubrificante e de limpeza da uretra. A segunda fracção é a maior e é rica em espermatozóides enquanto a terceira fracção, a pós espermática, é também denominada

de fracção de gel e é depositada após a porção rica em espermatozóides. (Morel 1999. Cap.4 pp.78-150; Mann *et al*, 1963).

2.3.3) Recolha Sémen em Garanhões

Cada vez mais no dia-a-dia do médico veterinário de reprodução equina a recolha de sémen em garanhões é uma constante, quer para efeitos de venda e compra de cavalos como reprodutores quer para congelamento de sémen ou recolha para inseminação em fresco, a verdade é que a recolha de sémen esta na base de muitas das técnicas de reprodução e maneio reprodutivo e permite tanto a avaliação do potencial de fertilidade de um futuro reprodutor, como a apreciação da qualidade espermática de ejaculados destinados a serem utilizados em Inseminação Artificial (IA).

Existem varias técnicas para recolha de sémen em equinos e as primeiras tentativas descrevem-se recorrendo a esponjas intravaginais colocadas na vagina antes da monta natural (Allen, 2005; Guimarães,2014). Está descrito depois a utilização de um preservativo de borracha inserido na vagina da égua, mas esta técnica rudimentar resultava frequentemente fracassada e perdia-se o ejaculado ou ficava contaminado demais (Love, 1992; Guimarães,2014), ambas as técnicas foram caindo em desuso devido às suas óbvias limitações (Guimarães,2014).

As técnicas de recolha foram sofrendo actualizações ao longo dos anos e podemos, nos dias que correm, utilizar com diferentes graus de eficiência, diferentes tipos de recolha de sémen/espermatozóides. Entre eles, a utilização combinada de fármacos (iminaprina e xilazina) para a obtenção do ejaculado (Samper, 2007) por ejaculação química, por vagina artificial (VA), por electroejaculação e por recolha das reservas espermáticas extra-gonadais (Morel, 1999).

De todas as técnicas de recolha de sémen a mais largamente utilizada é a VA visto que é a mais eficiente e económica, minimizando riscos para o garanhão e optimizando a fertilidade (Trischner, 1979; Morel 2003. Cap.20, pp.295-309). A electroejaculação é uma técnica bastante eficiente mas mais em bovinos e ovinos e tem uma aplicação limitada no cavalo devido ao elevado risco de trauma para o animal e para o operador (Cary *et al.*, 2004), bem como pela frequente contaminação do sémen com urina.

Há vários tipos de vaginas artificias, como por exemplo modelo de Cambridge ou russo, o modelo de Hanover, o Colorado, o Botucatu, o Nishikawa ou o Missouri,

entre outros. No entanto, há três tipos básicos, a Missouri, a Nishikawa e a Cambridge, que são os precursores dos três tipos principais usados hoje, em que a maioria das modificações mais recentes tem sido o material a partir do qual são construídas, a fim de reduzir o seu peso e facilitar a sua manipulação, em vez de qualquer necessidade de alterar o princípio básicos da sua utilização, todas elas têm o objectivo comum de simular as condições o mais parecido possível com as condições naturais da égua de modo a obter a colheita de sémen facilmente. (Morel, 1999. Cap.2, pp.9-35)

A escolha do modelo será uma opção dependente do gosto do médico veterinário responsável, da aceitação e preferência do garanhão, do poder económico disponível e da disponibilidade do mercado.

De maneira simples e directa, a VA é constituída por um tubo rígido, normalmente feito de policloreto de polivinila, o famoso "PVC", aberto nas extremidades, como um tubo oco, no interior do qual se introduz uma manga de latex flexível e mais comprida que é depois revertida sobre os extremos do tubo delimitando um espaço que se irá preencher com água quente de forma a atingir uma temperatura parecida ao aparelho reprodutor da égua. É depois usada uma manga plástica descartável no interior dessa mesma manga de latex que vai entrar em contacto com o pénis e permite, para além de uma maior higienização de todo o processo, acoplar, numa das extremidades da VA, um recipiente, copo colector, que receberá a totalidade do ejaculado. A outra extremidade do tubo rígido constitui a porção vulvar e deve estar devidamente lubrificada com um lubrificante não espermicida tal como a superfície interna da VA (Gamboa, 2011,pp.61-65).

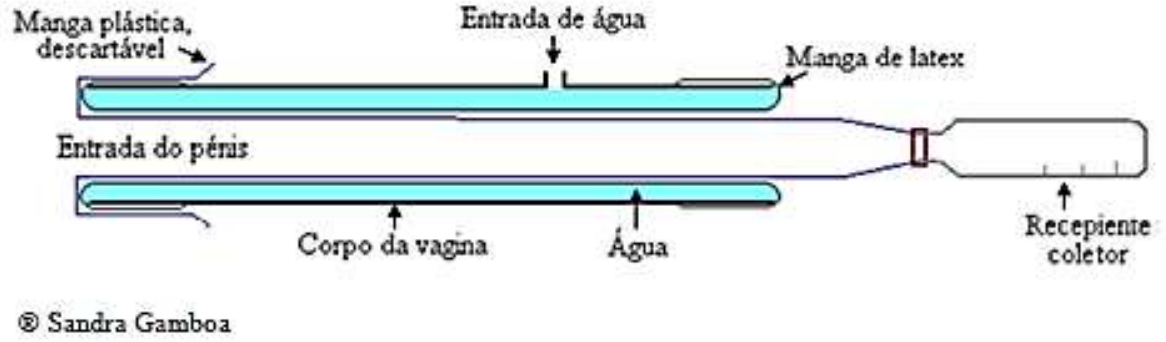


Figura 4 - Representação esquemática do modelo de vagina artificial para equinos. Modelo INRA, construída pelos Serviços Técnicos da ESAC e utilizada no seu Posto de Cobrição desde 1999, (adaptado de: Gamboa, 2011).

É muito importante que se realize a separação da fracção gelatinosa do ejaculado da fracção rica em espermatozóides, visto que a fracção de gel tem efeitos nocivos á célula espermática. Esta separação pode ser feita logo após a colheita de sémen através de filtragem do ejaculado, mas para que se consiga de melhor maneira, o procedimento de mais uso é a filtragem através do acoplamento de um filtro na entrada do copo colector que permite a retenção da fracção gelatinosa, de parte dos contaminantes bacterianos e de sujidades presentes no sémen (Canisso I.F. et al., 2008).

Depois de devidamente montada a VA deve então ser preparada para a colheita com as condições ideais de temperatura e pressão, que podem variar conforme o gosto e sensibilidade de cada garanhão. A pressão pode ser controlada pela quantidade de água usada e em conjunto com a sua temperatura determina-se, no interior do tubo rígido, as condições de pressão e temperatura que constituem o estímulo necessário à ejaculação (Morel, 1999.Cap.5, pp.151-189).

A temperatura a atingir visa estabelecer no todo da vagina artificial o ambiente térmico equiparável ao tracto genital real. A utilização de uma temperatura acima de 38,5ºc (temperatura normal da égua) parece ser indicada e temperaturas internas da vagina artificial de 44 a 48ºC parecem estimular o pénis e a ejaculação (Allen, 2005), ainda que alguns garanhões possam necessitar de temperaturas de até 63ºC (Rocha *et al.*, 2008).

Para a recolha de sémen, depois de preparada a VA, deve ser feita a assepsia do pénis do garanhão e a colheita pode ser realizada com uma égua em cio, para a qual o garanhão irá subir e o operador desvia o pénis para a vagina artificial recolhendo o ejaculado. Mas o uso de uma égua é arriscado, pois pode provocar escoriações tanto no garanhão como na égua se esta não estiver bem contida, e não é seguro para quem efectua a recolha (Ley, 2006). Assim, o ideal e correcto é a utilização de um manequim onde o garanhão salta para realizar a colheita, onde a vantagem óbvia deste sistema é a remoção do risco e maior segurança para o garanhão, para a égua e para o médico veterinário ou operador (Morel, 1999.Cap.5, pp.151-189).

Logo após a colheita o material recolhido deve então ser levado para observação e seguidamente tratado consoante o objectivo da recolha (Morel 1999.Cap.6, pp.190-233).



Figura 5 – Manequim utilizado para colheita de Sémen em Garanhões no centro de recolha de sémen e inseminação artificial da *Lusopecus*.

2.3.4) Avaliação Do Sémen

É fundamental que o sémen seja avaliado após a recolha pois a sua qualidade tem um papel fulcral na capacidade desse mesmo garanhão emprenhar as éguas com sucesso durante uma época reprodutiva (Morel, 2003.Cap.11, pp.105-130) ou até mesmo predizer se o garanhão consegue originar um sémen congelado e/ou resfriado de qualidade se for caso disso (Samper, 2009).

É importante realçar que a avaliação do sémen de um equino num determinado momento é afectada pela condição do animal nesse momento e de diversos factores do mesmo e que o rodeiam, ou seja, factores como a raça, a idade, a nutrição, estado de saúde, condição física, altura do ano, frequência de ejaculados, repouso sexual, tamanho testicular, anomalias hormonais, doenças, entres outros, (Blanchard et al., 2003b; Estrada & Samper, 2007; Papa et al., 2014) são agentes com que temos de contar ao fazer o juízo final na avaliação de um sémen e do potencial do garanhão.

Normalmente o sémen é avaliado considerando-se aspectos macroscópicos e microscópicos, pois não existe nenhuma avaliação ou parâmetro que isoladamente sirva para determinar o grau de fertilidade potencial de um garanhão (Estrada & Samper, 2007; Morel, 2003. Cap.20, pp.295-309).

Acontece normalmente que como aspectos microscópicos é avaliada a motilidade, o vigor, a concentração e a morfologia dos espermatozóides enquanto que

como aspectos macroscópicos principais registados são o volume, coloração e viscosidade do sémen (Morel, 2003. Cap.20, pp.295-309; Graham, 1996).

Nos aspectos macroscópicos a coloração será aquele que menos subjectivo e variável é no que toca a quadrar se um ejaculado é melhor ou pior, visto que o sémen deve ser de cor branca a "branco sujo" e outras cores podem sugerir alterações patológicas do trato reprodutivo do garanhão (Samper *et al*., 2007). O ejaculado não deve evidenciar contaminação por urina ou grumos (Morel, 2003. Cap.20, pp.295-309).

O volume e a viscosidade são características bastante alteráveis e subjectivas quer no mesmo garanhão em ejaculados diferentes quer entre garanhões, onde um volume pequeno ou grande não quer dizer pior ou maior qualidade pois teremos sempre de o equiparar com a concentração e com outros aspectos microscópicos do mesmo ejaculado, no entanto, na generalidade o volume de sémen varia inversamente com a concentração (Morel, 2003. Cap.20/Cap.2, pp.295-309/ pp.16-28; Morel 1999.Cap.6, pp.190-233). São vários os factores que afectam o volume, pode variar com a estação do ano, com a frequência de ejaculação, com a idade, raça, efeito da provocação com éguas em cio e com as condições clínicas do animal (Morel, 1999.Cap.6, pp.190-233).

Embora não seja directamente importante para a fertilidade o volume é usado para cálculo do número de espermatozóides total contido num ejaculado, consequentemente é essencial a sua determinação precisa (Blanchard et al., 2003c; Ax et al., 2004).

Olhando á viscosidade, um ejaculado pode variar de aquoso a cremoso consoante a sua concentração. No entanto, tal como no volume, um ejaculado mais viscoso não significa que seja melhor e o mesmo garanhão pode dar um ejaculado com alta viscosidade e outro com baixa não sendo por isso que um é melhor que o outro (Morel, 1999.Cap.6, pp.190-233).

Nos parâmetros microscópicos a motilidade é provavelmente o teste mais subjectivo na avaliação do sémen (Rousset *et al.,* 1987). A percentagem de espermatozóides móveis, particularmente aqueles que demonstram motilidade progressiva é um bom indicador do número de espermatozóides viáveis (Morel, 1999.Cap.6, pp.190-233), sendo essa percentagem de motilidade progressiva calculada logo após a recolha de sémen utilizando um microscópio óptico (Jasko, 1992).

O sémen que se apresentar com motilidade progressiva de pelo menos 40% pode ser considerado adequado para a Inseminação Artificial (Morel, 2003. Cap.20, pp.295-309) mas no respeita à conservação de sémen, Samper 2009 refere que

garanhões que não tenham pelo menos 50% de espermatozóides com motilidade progressiva, não são bons candidatos para programas de sémen refrigerado e congelado.

Assim, se a motilidade for muito baixa isso será um bom indicador para a não utilização do sémen em programas de reprodução, a probabilidade de se obterem resultados medíocres é muito mais elevada. Há que ter sempre em conta que este parâmetro é afectado por muitos motivos, quer positivamente como negativamente, por exemplo longos períodos de inactividade sexual ou machos que não ejaculam há algum tempo muitas vezes têm a motilidade diminuída no primeiro ejaculado (Samper, 2009; Katila, 2001).

A baixa frequência de ejaculação tem um efeito negativo na motilidade mas por sua vez o estímulo do garanhão com uma égua em cio antes da recolha eleva esses valores de motilidade (Katila, 2001; Sieme, Katila & Klug, 2004).

De qualquer modo, a motilidade é o parâmetro mais correlacionado com a fertilidade, comparativamente a outros (Morel, 2003. Cap.20, pp.295-309). Por isso, a sua avaliação é extremamente importante e reflecte vários aspectos do metabolismo espermático, comprova a capacidade dos espermatozóides se deslocarem até ao oócito e é o parâmetro mais fácil e rápido de avaliar (Colenbrander, Gadella & Stout, 2003; Katila, 2001).

O vigor espermático é quase sempre avaliado ao mesmo tempo e na mesma lâmina que a motilidade e também ele é bastante subjectivo. É definido através da propulsão do espermatozóide, ou seja, pela potencia energética e velocidade do espermatozóide sendo que por isso esta também relacionado com o tipo de movimento do mesmo e pela velocidade das células espermáticas atravessarem o campo de visualização. É geralmente avaliado numa escala de zero a cinco definida por Barth,1990 onde o máximo vigor é expressado em cinco e em zero a ausência do mesmo (Papa et al., 2014).

A morfologia dos espermatozóides é importante e anormalidades na morfologia espermática podem afectar a capacidade fertilizante do sémen. A morfologia espermática é avaliada através da observação ao microscópio óptico de um esfregaço espermático corado (Brito, 2007; Katila, 2001). De seguida, devem examinar-se 200 células, mas a avaliação de apenas 100 é provavelmente representativa do ejaculado (Katila, 2001; Ax et al., 2004). No entanto, estas técnicas não são utilizadas por rotina mas são extremamente úteis em casos de morfologias espermáticas infrequentes (Katila, 2001).

A morfologia espermática continua a ser um tema bastante controverso e existem várias categorias de espermatozóides dentro do que é a sua morfologia, os normais, com anomalias da cabeça, com anomalias do acrossoma, com gotas citoplasmáticas proximais, com gotas citoplasmáticas distais, com anomalias da peça intermédia, com anomalias da cauda, entre outros. O facto de muitos defeitos serem de origem desconhecida e os efeitos na fertilidade de cada anomalia estarem pouco estudados no garanhão faz com que uma grande variedade de anomalias morfológicas seja aceitável desde que o número de espermatozóides normais e móveis por ejaculado seja adequado. (Ax et al., 2004; Brito, 2007; Katila, 2001). Nos garanhões de alta fertilidade e em uso constante a frequência de anormalidades morfológicas no sémen é mais baixa (Rousset *et al.*1987).

A concentração do ejaculado é também um parâmetro importante, em que o número total de espermatozóides está directamente relacionado com a concentração espermática. Por intermédio da concentração podemos depois calcular o número de doses possíveis por ejaculado. Para avaliar a concentração podemos recorrer a um hemocitómetro (câmara de Neubauer) ou a um espectrofotómetro. (Papa et al., 2014; Morel, 2003. Cap.20, pp.295-309; Morel, 1999.Cap.6, pp.190-233).

O intervalo normal para a concentração de espermatozóides em sémen não diluído é de 30-600x10^6 espermatozóides por mililitro (spz mL^{-1}), no entanto as concentrações variam significativamente (Morel, 2003. Cap.20, pp.295-309), e por isso, como outros parâmetros de avaliação do sémen, a concentração não pode ser avaliada em solitário como parâmetro decisivo, também ela esta sujeita a alterações que podem ser temporárias e pontuais num garanhão.

Segundo Morel, 1999 a produção diária de espermatozóides que contribui para a concentração destes no ejaculado é influenciada por variados factores, entre eles a estação do ano, idade, tamanho testicular, frequência de uso, raça, além de factores ambientais que incluem a temperatura, radiação, nutrição e produtos químicos tóxicos e fármacos. Por outro lado as anomalias físicas e hormonais, doenças e infecções têm também o seu peso tal como a estação do ano que tal como influencia a libido e o volume de sémen afecta a produção diária de espermatozóides.

2.4) Inseminação Artificial na Reprodução Equina

A Inseminação Artificial (IA) na espécie equina experimentou nos últimos anos um desenvolvimento espectacular. Ainda que com pouca expressão em Portugal o uso da IA nos equinos já data de algumas décadas atrás e embora se tenha observado um aumento da sua utilização, na sequência da autorização do registo de poldros provenientes de IA pela Associação de Criadores de Cavalos Puro-sangue Lusitano (APSL), a IA em Portugal ainda tem muito para crescer. Com algumas das mudanças que sucederam ouve um aumento gradual de IA com sémen refrigerado e congelado, mas a percentagem de éguas inseminadas ainda é baixa e a IA está longe de ser o método principal de reprodução em cavalos (Lopes da Costa et al., 2007).

2.4.1) Técnica de Inseminação, Dose Inseminante, principais vantagens e desvantagens da IA.

A IA refere-se ao processo de deposição do sémen de um garanhão no sistema genital de uma fêmea. A IA envolve a recolha de sémen de um macho, geralmente de mérito genético superior, seguindo-se pela transferência desse sémen para uma fêmea sexualmente receptiva no momento da ovulação, para resultar em fertilização. Ou seja, de uma forma simples e directa, a IA é a cobrição de uma égua com sémen que foi colhido a um garanhão (Morel, 1999. Cap.1, p1-8).

Na técnica, todas as inseminações devem ser executadas com contaminação mínima, ou seja, com a égua devidamente contida, com a cauda ligada e elevada e a área entre a base da cauda e a comissura ventral da vulva bem lavada e seca. É preciso ter em conta que as manobras da IA são sempre hipotéticas fontes de contaminação intra-uterina, através de bactérias exteriores, que encontrarão ali óptimas condições de desenvolvimento, indo complicar o sucesso do trabalho **(**Kenney et al.,1975; Duarte, 2007c; British Equine Veterinary Association, 1991).

O inseminador deve usar uma luva esterilizada, protegendo todo o braço até ao ombro, passando depois a sonda de IA, sonda de inseminação estéril, através do cérvix para o corpo uterino, onde o sémen será depositado. O sémen contido numa seringa é depositado ou no corpo uterino anterior ou por inseminação profunda no corno uterino (Ax et al., 2004; Blanchard et al., 2003**)** dependendo do tipo de sémen que se está a usar.

O método utilizado e o tempo ideal e também a frequência de inseminação varia consoante o sémen utilizado é fresco, refrigerado ou congelado (Morel, 2003; cap.20, pp 295 - 308).

A dose de sémen a usar é referida por muitos autores como Blanchard et al., 2003; Ax et al., 2004; Morel, 1999; Brinsko, 2006; Ricketts & Troedsson 2007; Miller, 2008, que as éguas geralmente são inseminadas com $250x10^6$ a $500x10^6$ espermatozóides (Spz) com mobilidade progressiva. Com sémen congelado e posteriormente descongelado varia entre $400x10^6$ e $800x10^6$ de Spz (Miller, 2008; Squires, 2005) e idealmente com um volume de 10 a 30 mL (Morel, 2003. cap.20, pp.295 - 308; Papa et al., 2007).

Grandes volumes de sémen não são vantajosos porque muito desse volume perde-se devido à dilatação do cérvix após a inseminação (Blanchard et al., 2003) e aumentam igualmente a reacção inflamatória da égua pós-inseminação (Ricketts & Troedsson, 2007).

A IA tem inúmeras vantagens e também algumas desvantagens. Vários autores como Blanchard et al., 2003; Miller, 2008; Ax et al., 2004; Morel, 2003, referem vantagens da IA como por exemplo:

- Um garanhão muito solicitado sexualmente pode não ter a capacidade reprodutiva de cobrir todas as éguas mas num programa de IA o sémen pode ser recolhido 3 a 4 vezes por semana e ter os requisitos necessários (300 milhões spz/dose a 500 milhões spz/dose), para inseminar o mesmo número de éguas ou mais.
- Podem usar-se reprodutores já mortos, através do seu sémen congelado, por períodos indeterminados, colaborando na preservação de linhagens selectas e de reprodutores que à medida que vão envelhecendo a qualidade espermática diminui. A IA manipula o sémen de maneira a que o número correcto de spz/dose seja inseminado na égua.
- Reduz o risco de propagação de doenças sexualmente transmissíveis, pois não há contacto directo entre os dois órgãos reprodutores como acontece na monta natural. Além disso, a IA ao contrário da cobrição natural, permite a adição de antibióticos ao sémen de forma a reduzir ou eliminar totalmente todo o tipo de bactérias da reprodução da égua.

- Permite a avaliação do sémen cada vez que é colhido. Com a IA podemos observar e medir parâmetros relacionados com a fertilidade cada vez que este é recolhido.
- Possibilita o transporte de sémen a grandes distâncias, que facilita a expansão de reprodutores de alto valor genético a outros locais do mundo e até o seu armazenamento em tempo indeterminado quando congelado.
- Permite a cobrição de éguas no momento óptimo da concepção porque se pode refrigerar ou congelar sémen, preservando-o até a égua estar pronta a inseminar.

No entanto a IA tem também algumas desvantagens, sendo as mais visíveis o seu custo económico e o aumento do maneio e controlo da eguada e dos garanhões (Ax et al., 2004; Loomis,2005) comparativamente a um programa reprodutivo com cobrição natural.

A IA pode também trazer falhas e fraudes nos registos genealógicos dos garanhões, mas estas podem ser detectadas e evitadas através de exigências, como a tipificação sanguínea dos progenitores, oferecendo este método garantia de paternidade (Morel, 1999. Cap.1, pp.1-8).

2.4.2.)Preparar para inseminar? Quando inseminar: Égua e a preparação e controlo para a inseminação. O Sémen.

É evidente que a preparação e escolha da égua e do garanhão para a inseminação necessita de ser pensada. Sobretudo se os animais em causa tiverem a complicação adicional de uma carreira atlética por trás deles. No entanto, se for investido o tempo e as previsões adequadas, a maioria dos cavalos que são anatomicamente e fisiologicamente sólidos são capazes e podem reproduzir (Morel, 2003. Cap.11, pp 105-130).

Uma vez que a égua pretendida tenha provado estar pronta para a IA, a sua preparação deve estar orientada para atingir as taxas máximas de concepção. O momento correto da inseminação em relação à ovulação é de suma importância (Miller, 2008; Morel, 2003. Cap.11, pp 105-130).

A fase ideal para inseminação será quando a égua permitiria o acasalamento ocorrer naturalmente, ou seja, quando ela está na fase sexualmente receptiva ao cavalo, em cio/estro. Este período de receptividade sexual ocorre regularmente aos 21 dias do ciclo reprodutivo e pode durar 2 a 10 dias. É sincronizado com a ovulação e garante que

a égua está no momento ideal para a fertilização. A ovulação ocorre normalmente cerca de 24h antes do final do estro e depois de inseminada espera-se que os espermatozóides sobrevivam durante 24 a 72h dentro do trato reprodutivo da égua, já o óvulo, por outro lado, pensa-se que sobrevive apenas 8 a 12h por isso, o momento da IA é de grande importância (Morel, 2003. Cap.13, pp148-168; Watson and Nikolakopoulos, 1996).

Na égua a preparação para a inseminação é avaliada principalmente através da actividade ovariana, e para isso é usada a técnica de ultra-sonografia uterina transrectal e a palpação rectal do útero e ovários. Observa-se principalmente a presença de folículos e corpo lúteo (CL) e a sua consistência, aparência, posição e tamanho, de modo que o tempo de ovulação possa ser estimado e o tempo mais apropriado para a IA determinado pois o diâmetro dos folículos é utilizado como guia para a ovulação sendo que a maioria das éguas ovula folículos de 3,5 a 4,5cm de diâmetro. Deste modo, em qualquer uma destas duas técnicas, duas características principais são procuradas no ovário da égua. São elas, a presença de um folículo maior que 3 cm de diâmetro, ou a ocorrência de uma ovulação. Estes dois parâmetros são os principais marcos para calcular o tempo mais apropriado para uma inseminação (Morel, 2003. Cap.13, pp.148-168; Morel & Sullivan, 2001; Morel, 1999. Cap.8, pp. 302-335).

No entanto, a sincronização da inseminação e da ovulação é difícil, podendo ser necessárias várias inseminações ao longo do período de estro. Na maioria das situações, é mais conveniente manipular o ciclo da égua, pois isso permite que a chegada do sémen seja sincronizada com o momento mais oportuno para a IA (Govaere, 2014; Morel, 1999. Cap.8, pp. 302-335).

Á medida que se aproxima a ovulação, os ovários devem ser examinados 2 a 4 vezes por dia por ultra-sonografia transrectal a fim de prever com precisão o momento exacto da ovulação. As éguas devem ser inseminadas dentro de 6 a 12 horas antes ou dentro de 6 horas depois da ovulação. A Administração de 2.000 a 2.500 U.I. de gonadotrofina coriónica Humana (hCG) em éguas com um folículo dominante de tamanho especifico, ou seja, de 35 a 40 mm de diâmetro, propicia um poder de previsão adicional com referencia ao momento da ovulação, porque a maioria dessas éguas irá ovular em 36 a 40 horas após a injecção de hCG (Miller, 2008; Ax et al., 2004b).

Apesar disso, espera-se que folículos desse tamanho ovulem dentro de 24h e a maioria dos estudos aconselham que a égua deve ser coberta imediatamente pois as melhores taxas de gestação são alcançadas cobrindo dentro do período de 48h antes da ovulação (Morel, 2003. Cap.13, pp.148-168; Govaere, 2014).

No que toca ao sémen e dependendo se é fresco, refrigerado ou congelado, quaisquer requisitos da sua preparação são normalmente determinados pelos seus meios de armazenamento mas a preocupação principal é normalmente na IA com sémen congelado a descongelação do mesmo.

Em resumo, as palhetas de sémen congeladas podem ser descongeladas, no período imediatamente antes á IA e depois da égua já devidamente preparada, quer a uma temperatura mais baixa durante um período tempo mais longo, quer a uma temperatura mais elevada durante um período mais curto. Por exemplo, de maneira geral, as palhetas de 0,5ml podem ser descongeladas num banho de água a 5°C durante 4min, mais rapidamente a 75°C durante 7s ou na forma que é mais usada, a 37°C durante 30s ou (Morel, 2003. Cap.13, pp.148-168; Miller, 2008).

2.4.3.) Inseminação Artificial – Sémen Fresco, Refrigerado e Congelado.

Uma vez colhido e avaliado, o sémen pode ser usado para inseminação, isso pode acontecer de uma de quatro maneiras diferentes. Primeiro usando-o imediatamente não diluído como sémen fresco. Segundo, diluindo-o e usando-o imediatamente para inseminação, como sémen fresco diluído. Terceiro, diluído e refrigerado para uso nas 72 horas seguintes. Ou quarto, diluído e congelado para uso numa data posterior e armazenamento. O método utilizado depende depois do sistema de reprodução aplicado e da distância a que se encontra da égua a inseminar do garanhão (Morel, 2003. cap.20, pp.295 – 308; Canisso I.F. et al., 2008; Morel, 1999. cap.7, pp.234-301).

O sémen fresco na IA deve ser usado imediatamente, ou seja, para inseminações mediatas, após a colheita. O sémen pode ser utilizado puro, mas convém diluir se for utilizado 20 minutos após a colheita (Canisso I.F. et al., 2008). A centrifugação, para remover o plasma seminal deve ser feita quando este vai ser usado 2 a 6 horas pós colheita, 6 horas depois da colheita o sémen já perde qualidades rapidamente, pois á temperatura ambiente o metabolismo dos espermatozóides e das bactérias permanece activo (Canisso I.F. et al., 2008), produzindo radicais livres (O2) e portanto ocorre acidificação do pH e peroxidação dos lípidos, que resulta em danos celulares permanentes na membrana e núcleo dos espermatozóides, dai já ser aconselhado o sémen estar refrigerado a esta altura, de modo a reduzir o metabolismo e assim baixar a sua degradação (Morel, 1999. cap.7, pp.234-301; Traça, 2010, pp19-78; Katila, 1997).

A Inseminação com sémen fresco é normalmente feita no corpo do útero (Canisso I.F. et al., 2008).

Com o sémen refrigerado fala-se de maneira distinta, a IA com sémen refrigerado é a mais costumeira na Europa quando a égua e o garanhão não se encontram nas mesmas instalações, esta permite a IA até às 72 horas após colheita (Blanchard et al., 2003). Mas a tolerância do sémen à refrigeração é extremamente variável de garanhão para garanhão quer a nível de raças quer a nível individual o que se pode tornar num problema em garanhões que o sémen refrigera mal (Traça, 2010, pp19-78).

No entanto, na generalidade, os garanhões produzem sémen que, quando sujeitos a refrigeração, mantêm as qualidades minimamente fiáveis até às 24 horas pós colheita e existe uma boa percentagem em que os ejaculados só sofrem decréscimos expressivos da motilidade progressiva às 48 horas. (Blanchard et al., 2003b; Morel, 1999. Cap.7, pp.234-301).

Existem também hipóteses de maximizar a resistência dos ejaculados tornando-os melhores e por isso aguentando melhor a refrigeração, obtendo melhores resultados. Suplementar os cavalos com ómega 3 e L-carnitina durante 30 dias no mínimo, utilizar o segundo ejaculado que deve ser colhido 1 hora após o primeiro retirando o plasma seminal por centrifugação e adicionando um bom diluidor, induzir a ovulação e inseminar 24horas depois, fazer as contas de modo a tentar inseminar sempre antes dos espermatozóides completarem 24horas de refrigeração são todas normas que podem fazer a diferença na IA com sémen refrigerado (Morel, 1999 Cap. 4, pp.78 – 150 & Cap.7, pp.234 – 301; Morel, 2003. pp.249-294).

Para poder ainda maximizar a sobrevivência dos espermatozóides ao fazer as doses para inseminação, deve obter-se uma diluição de 1:4 spz/diluidor de modo a assegurar que a concentração final de plasma seminal em sémen diluído é igual ou inferior a 20% e pode, previamente ao resfriamento submeter-se o sémen diluído a taxas leves de centrifugação, com a finalidade de remoção de 90% do plasma seminal, observando-se melhorias na motilidade espermática, especialmente para garanhões previamente classificados como garanhões de sémen refrigerado pobre (Canisso I.F. et al., 2008).

Depois de processado o sémen deve ainda ser acondicionado em recipientes especialmente desenvolvidos para este fim, a uma temperatura de refrigeração de 4 a 6ºC para preservar melhor a mobilidade espermática e a fertilidade (Canisso I. F. et al.,

2008; Blanchard et al., 2003b). Neste tipo de IA o sémen é normalmente depositado no corpo do útero, e o ideal é cobrir as éguas 48 a 24 horas (com sémen refrigerado e sémen fresco) antes da ovulação e até 6 horas após ovulação (Blanchard et al., 2003b).

Depois de ser inseminada, a égua deve ser de novo observada atendendo a que há sempre a nível uterino, uma resposta inflamatória à deposição de sémen, que deve ser analisada. Com um ejaculado ou com sémen refrigerado, a reacção inflamatória produzida não afecta extraordinariamente os espermatozóides, visto que o plasma seminal (que contém ocitocina e prostaglandinas), para além de proteger os espermatozóides dos polimorfonucleares, provoca contracções uterinas, que eliminam de forma natural o fluido inflamatório que se possa vir a criar, e por essa altura muitos espermatozóides já se encontram "a salvo" no oviduto (Duarte 2007; Miller, 2008; Samper, Estrada & Mckinnon, 2007).

Finalmente, o modo mais prático e barato de conservar a genética de garanhões para que a sua utilização seja, teoricamente, *ad eternum* chegou com a congelação de sémen, que tem o potencial de somar uma nova dimensão a indústria da reprodução equina já bastante solicitada pelos proprietários (Blanchard et al., 2003b; Miller,2008).

A grande vantagem deste tipo de IA é sem dúvida a possibilidade de se poder inseminar éguas anos após ter sido feita a colheita e congelação do sémen, além disso, o sémen poder facilmente obter-se a partir de cavalos no estrangeiro o que permite a venda de doses e gestações em todo o mundo em qualquer altura. De mais a mais, a reprodução dos garanhões pode continuar enquanto estão a competir e até enquanto recuperam de uma lesão ou doença e pode ter-se sempre em vista "eternizar" o garanhão mesmo após a sua morte e enquanto houver reservas disponíveis de sémen (Miller, 2008).

Mas há ainda que colocar as desvantagens em cima da mesa, pois a fertilidade do sémen do garanhão é reduzida pela congelação e existe uma grande variação no sucesso com que o sémen pode ou não ser congelado (Miller, 2008; Hafez, 2004b; Ax et al., 2004b) e por isso muitas vezes, trabalhamos com sémen que pode ter características incompatíveis com uma boa capacidade fertilizante, querendo isto dizer que há mais dificuldade em provocar gestações nas éguas inseminadas com sémen congelado e como tal, o sucesso da IA com sémen congelado é mais baixo do que com sémen fresco e refrigerado (Miller, 2008; Samper, Estrada & Mckinnon, 2007).

Alertar ainda que a congelação de sémen implica custos e obriga a um trabalho mais intenso por parte dos Médicos Veterinários no maneio das éguas porque dada a

menor viabilidade do sémen congelado há que assegurar que a IA é feita de modo a permitir a capacitação dos espermatozóides dentro do período viável (6horas) do oócito após a ovulação (Miller, 2008). Normalmente fazem-se ecografias repetidas em intervalos de 6 horas, iniciadas 24 horas após a indução da ovulação com hCG, inseminando-se logo que a ovulação seja detectada e depositando o sémen profundamente no corno uterino. (Duarte J.C., 2007; Ax et al., 2004b).

As éguas inseminadas com sémen congelado devem ser re-observadas devido a resposta inflamatória a nível uterino. No sémen congelado, devido a inexistência de plasma seminal e à alta concentração de espermatozóides geralmente acontece uma forte reacção inflamatória na pós-inseminação e para garantir o sucesso da IA é fundamental delinear uma intervenção que não deverá ultrapassar os dois primeiros dias pós ovulação e deve ser feita no mínimo cerca de 4 a 6 horas pós ovulação e inseminação (Duarte J.C., 2007; Pycock, 2007; Miller,2008).

Essa intervenção consiste num tratamento de fluidoterapia uterina, até o fluido sair límpido, com ou sem antibióticos, e acompanhada de injecção endovenosa de ocitocina (Duarte J.C., 2007; Pycock, 2007; Miller, 2008). Em éguas que sejam susceptíveis á acumulação de fluido deve ser feito tratamento 4 a 6 horas após a cobrição de modo a aumentar a probabilidade destas éguas ficarem prenhas (Pycock, 2007).

Para que a técnica de IA com sémen congelado tenha maior sucesso a avaliação do sémen utilizado para a IA deve ser feita antes da criopreservação e novamente após a descongelação (Hafez, 2004b), a escolha do diluidor tem um papel decisivo no prolongamento da conservação do sémen, na protecção contra condições adversas de temperatura, facilidade de avaliação da mobilidade, melhor divisão por dose de inseminação e incremento das taxas de fertilidade (Miller, 2008; Kenney et al., 1975; Samper, 1995) e também a concentração do sémen é outro factor importante que quando tido em conta ajuda a aumentar a taxa de sucesso da congelação (Blanchard et al., 2003b).

3) Justificação e Objectivos

Trabalho realizado terá como justificação documentar o crescimento e importância da reprodução assistida nos equinos e fazer uma contextualização dos resultados do trabalho feito nas técnicas de Inseminação artificial com os diferentes tipos de sémen no mercado da reprodução assistida equina ao longo de uma época reprodutiva real, no sentido de aumentar a partilha de conhecimentos e experiências deste tipo de actividade médico-veterinária numa região de Portugal durante essa mesma época de reprodução. Tendo sempre como Objectivo final sistematizar e avaliar os dados relativos ao trabalho realizado, num centro de atendimento médico-veterinário especializado em reprodução equina, adquiridos através de múltiplas ecografias durante o período de tempo do estudo.

4) Material e Métodos

O estudo foi realizado a partir de éguas seguidas reprodutivamente ao longo do ano 2016 no Centro de Reprodução e Recolha De Sémen Equino da LUSOPECUS, centro de colheita de sémen de garanhão, registado em Portugal e na União Europeia com o número PT3E01CS. Os animais em estudo estavam em parques individuais, a sua alimentação era a base de feno e ração duas vezes ao dia e água sempre a disposição e todas as éguas tiveram maneio idêntico.

Os dados foram recolhidos a medida que as éguas iam sendo seguidas em todas as ecografias transrectais e procedimentos realizados aos animais através de uma folha de seguimento individual (exemplo em anexo I) onde foram registados dados individuais de cada égua como o nome, a raça, a idade, a data de inicio de seguimento e de todas as ecografias, o nome do garanhão e o tipo de sémen a utilizar na IA e o proprietário da égua e onde foram também avaliados e escritos os estados dos ovários esquerdo e direito individualmente, as medições em milímetros dos respectivos folículos existentes e o estado do útero, colocados os produtos utilizados e feita alguma observação pertinente em relação ao observado nas ecografias realizadas.

Todos os procedimentos efectuados foram rigorosamente registados e através desta folha de seguimento individual foi também possível retirar no final outras informações ai subentendidas, tais como o número de ecografias realizadas a cada égua, o número de IA realizadas em cada égua e o número de ciclos seguidos em cada égua.

O material utilizado para recolha de todos os dados foi um ecógrafo da marca EMP® (Shenzeben Emperor Electronic Technology Co. LTD), modelo V9 com sonda rectal linear na frequência de 4,5MHz e 122mm de profundidade.

As ecografias foram realizadas com as éguas contidas em manga numa sala fechada, sem qualquer tipo de sedação ou tranquilizante.

Utilizou-se sempre luva de palpação rectal e gel lubrificante e o procedimento começou sempre por esvaziar o recto de fezes e só posteriormente começar o exame ecográfico transrectal. Em cada ecografia foram sempre medidos os folículos que se destacavam pelo seu tamanho maior e avaliado o estado do útero e também a presença de edema uterino em +, ++ ou +++ (sendo: + pouco edema; ++ edema médio e +++ edema elevado).

Para a realização do estudo e comparação de resultados, as éguas foram divididas em dois grupos. O critério de divisão foi o tipo de seguimento efectuado na égua (mais

efectivo e trabalhoso em éguas para sémen congelado e menos intensivo em éguas para sémen Refrigerado/Fresco) e o tipo de sémen a ser usado pois existem diferenças significativas na técnica de inseminação do sémen congelado (IA profunda no corno uterino) quando comparada com a técnica de IA em sémen Refrigerado e Fresco (IA no corpo do útero).

O critério para criação de um grupo de estudo único que engloba Sémen Refrigerado e Fresco, não diferenciando estes dois tipos de sémen justifica-se pelo facto de neste estudo, o seguimento das éguas para IA com estes tipos de sémen ser sempre igual, o local de deposição do sémen na IA ser sempre o mesmo (corpo do útero), e em todos os casos o sémen (para ambos os tipos de sémen) ser sempre centrifugado e diluído obtendo características quer de sémen Refrigerado, quer de sémen Fresco.

A confirmação de gestação foi efectuada 15 dias após a IA. No caso dos animais com diagnóstico negativo foi efectuado seguimento de um novo ciclo para nova tentativa de IA a começar no exacto momento da confirmação negativa. Existiram no entanto casos onde o proprietário optou por não realizar nova tentativa. Os animais de diagnóstico positivo foram transportados pelos proprietários às respectivas coudelarias.

Para o tratamento e a análise de resultados foi utilizando o programa estatístico IBM® SPSS® Statistics V.22. Através deste efectuou-se a estatística descritiva e inferencial. De acordo com a natureza das variáveis e dimensão da amostra utilizaram-se teste paramétricos (Teste T e ANOVA) e não paramétricos (Teste do Qui-Quadrado e sua variante Monte Carlo e Teste de Fisher).

5) Resultado

O presente trabalho foi realizado num total de 68 éguas (n=68), de raça PSL (n=55), PSA (n=4) e cruzadas (n=9) (gráfico1), com idades entre os 3 e 21 anos ao longo da época reprodutiva de 2016. O sémen utilizado para inseminação (gráfico 2) foi classificado em duas categorias principais, Refrigerado/Fresco (usado em 42 éguas) ou Congelado (usado em 21 éguas), existindo ainda uma terceira categoria, Monta natural (5 éguas), onde as éguas foram seguidas e o próprio garanhão saltou na égua no momento destinado pelo veterinário. Assim, 61,8% das inseminações foram realizadas com sémen refrigerado/fresco, 30,9% com sémen congelado e 7,4% das éguas foram a monta natural.

Gráfico 1 – Representação da Raça.

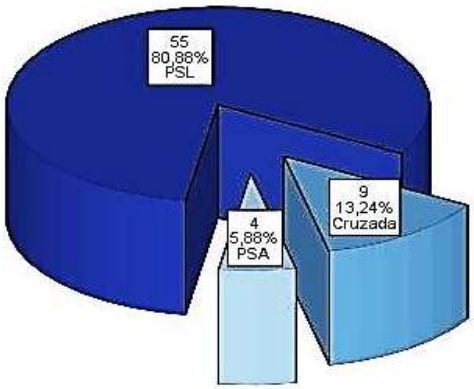
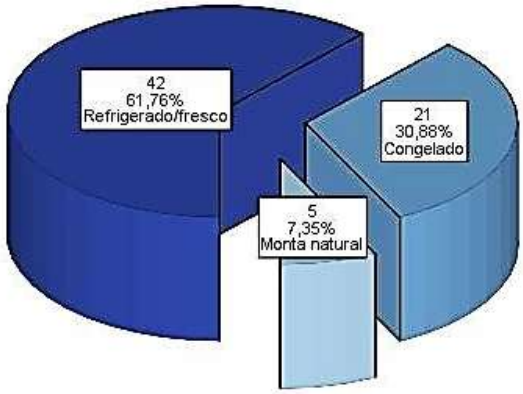
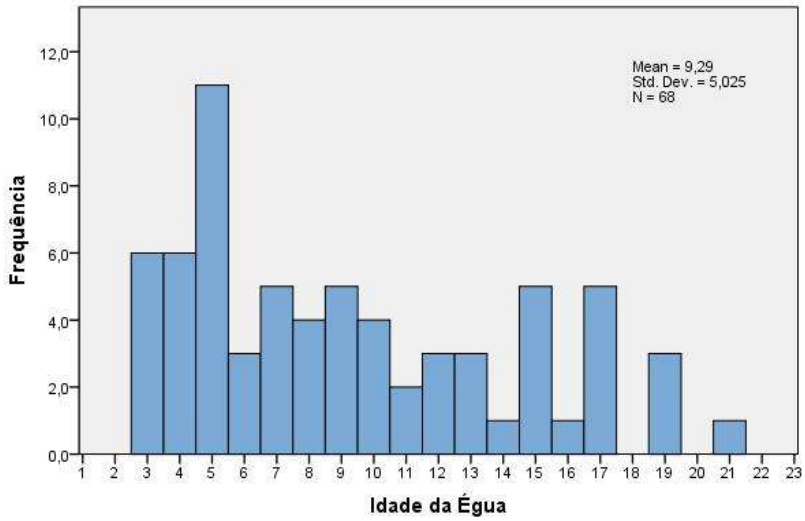


Gráfico 2 – Tipos de Sémen usado Para o Número de Éguas.



A média de idade das éguas é de 9,29 anos (DP=5,025). Da amostra de estudo de 68 éguas, 50 % apresentam até 8 anos. (gráfico 3)

Gráfico 3 - Idade das éguas em estudo.



Os meses de maior entrada de animais para ser observados e seguidos foram os de Fevereiro, Março e Abril e enquanto que os meses que se observou um maior número de diagnósticos de gestação positivos aos 15 dias após inseminação foram Março, Abril, Maio e Junho (Tabela 1).

Tabela 1 - Representação do Número de Éguas a ser Seguida e com Diagnóstico Positivo ou Negativo Conforme o Mês.

Mês	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Nº Éguas a entrar para ser seguida	4	13	14	15	6	6	5	1	0	4	0	0
Nº Éguas c/ Diag. Pos. de 15 Dias.	0	5	11	12	9	8	2	1	0	2	2	0
Nº Éguas c/ Diag. Neg.	0	0	0	2	2	0	2	3	0	1	0	0

A taxa de sucesso da inseminação nas 68 éguas, sem diferenciar o trabalho realizado na IA e o tipo de sémen usado, foi de 76,5% éguas com diagnóstico positivo, enquanto 14,7%, das éguas tiveram com resultado negativo, desconhecendo-se o resultado das inseminações de 6 das éguas (8,8%) devido à não confirmação de gestação das mesmas por opção dos proprietários ou por razões não dependentes do médico veterinário. (gráfico 4)

Gráfico 4 – Representação da Taxa de Sucesso Final.



Assim, foram no total efectuadas 884 ecografias às 68 éguas, das quais 387 foram realizadas a éguas para sémen congelado e 468 em éguas para sémen Refrigerado/Fresco. Foram seguidos 107 ciclos das 68 éguas avaliadas sendo que destes, 41 ciclos foram seguidos nas 21 éguas que estavam para sémen congelado e ou outros 61 ciclos foram observados nas éguas de sémen Refrigerado/fresco, 42 animais. (tabela2)

Tabela 2 - Representação Da Relação no Número de Ecografias e de Ciclos Observados com o Número de Éguas e o Diferente Tipo de Sémen

Sémen	Nº De Ecografias	Nº de Éguas	Nº de ciclos
Sémen Refrigerado/Fresco	468	42	61
Sémen Congelado	387	21	41
Monta Natural	29	5	5
Total	884	68	107

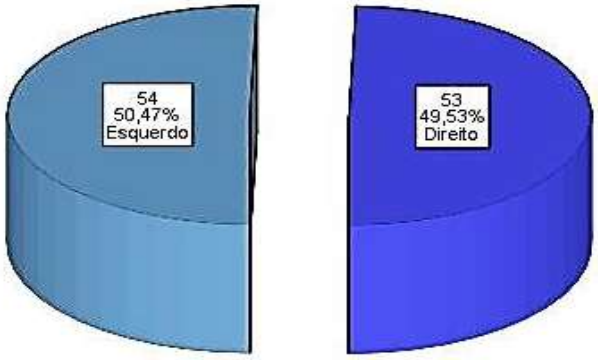
Na tabela 3, é apresentado o resultado do número de ecografias realizadas por égua em função do número de ciclos seguidos. Pela sua leitura, pode verificar-se que as éguas em que foi seguido somente 1 ciclo (n = 41; 60%) realizou-se entre 2 e 12 ecografias, com uma média de 7,20 ecografias (DP=2,542). As éguas em que se seguiram 2 ciclos (n = 17; 25%) efectuaram entre 7 e 28 ecografias, com uma média de 16,06 ecografias (DP=6,057). Com o seguimento de 3 ciclos (n = 8; 12%) efectuaram-se entre 23 e 34 ecografias, com uma média de 26,63 ecografias (DP=3,815) e das duas éguas que foram seguidas em 4 ciclos efectuaram-se entre 28 e 75 ecografias, com uma média de 51,50 ecografias (DP=33,234).

Tabela 3 - Nº de Ecografias Realizadas por Égua em Função do nº de Ciclos Seguidos.

Nº Ciclos Observados	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
1 Ciclo	41	2	12	7,20	2,542
2 Ciclos	17	7	28	16,06	6,057
3 Ciclos	8	23	34	26,63	3,815
4 Ciclos	2	28	75	51,50	33,234
Total	68	2	75	13,00	10,956

Durante o período de estudo foram observados 107ciclos ás 68éguas, como podemos concluir pela tabela 2. A partir do total dos 107 ciclos observados, realizou-se um apanhado da lateralidade dos mesmos, sendo que 50,47% dos ciclos observados ocorreram no Ovário Esquerdo e 49,53% no Ovário Direito. Uma das éguas realizou crescimento folicular com ovulação bilateralmente ao longo do 2º ciclo observado na mesma, obtendo uma gestação positiva. Ao desconhecer-se qual o lado da ovulação que originou o resultado positivo tomou-se a decisão de, para efeitos de análise estatística, regista-la como tendo sido do lado esquerdo. (gráfico 5)

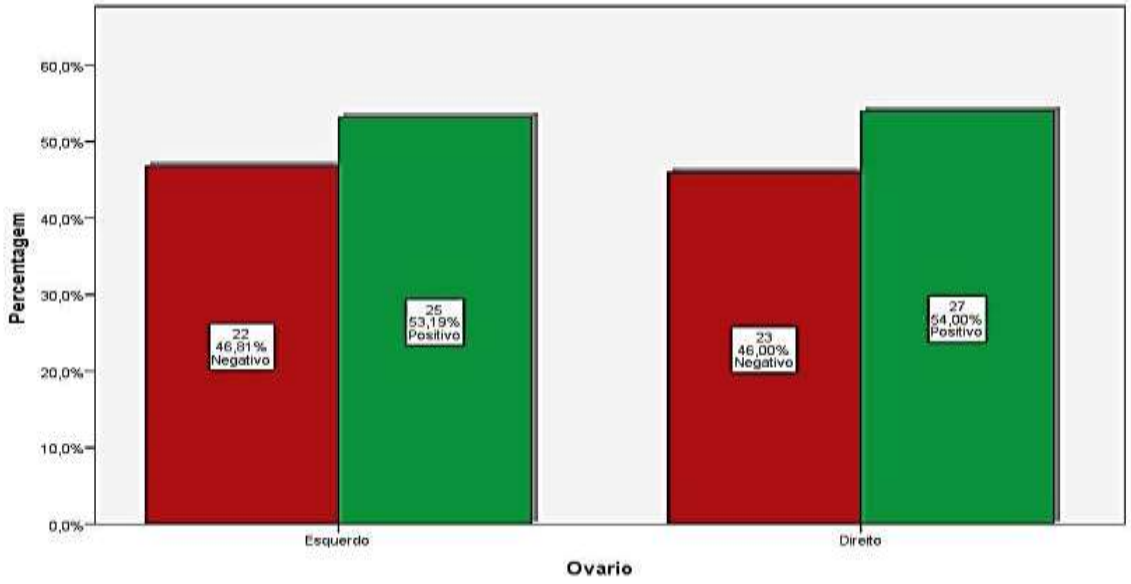
Gráfico 5 – Representação da Lateralidade dos Ciclos



Considerando a lateralidade e para o cálculo das taxas de sucesso dos ovários esquerdo ou direito respectivamente, não se consideraram as inseminações a 6 éguas, sob as quais se desconhece o diagnóstico (não foram confirmadas se estavam gestantes) e também de 4 ciclos observados em 4 éguas diferentes, cujo seguimento do ciclo foi feito mas esses animais acabaram por não ser inseminadas nesse 1º ciclo que foi seguido. Assim, irão analisar-se os resultados de 97 ciclos com ovulações em que as éguas foram inseminadas e dos quais se conhece o resultado negativo ou positivo de gestação das respectivas inseminações. [(107 ciclos) - (4 ciclos sem inseminação) - (6 inseminações sem resultado) = 97 ciclos ciclos com inseminação realizada e resultado conhecido)].

De acordo com que se consegue analisar por interpretação do gráfico 6, a taxa de sucesso das inseminações efectuadas em ciclos seguidos e trabalhados do lado esquerdo é de 53,19% e de ciclos à direita é de 54%.

Gráfico 6 - Taxa de Sucesso por Lateralidade de Ovário



Na Tabela (tabela 4) é demonstrado a testagem feita sobre a existência de uma relação entre a lateralização do ciclo usado e o sucesso da inseminação feita em ciclos seguidos de lados diferentes, através do teste de independência do qui-quadrado, verificou-se que estes aspectos não se encontram relacionados ($\chi 2$ (1) = 0,000; p=1,000), (tabela 4) sendo o sucesso da inseminação independente da lateralidade do ciclo usado.

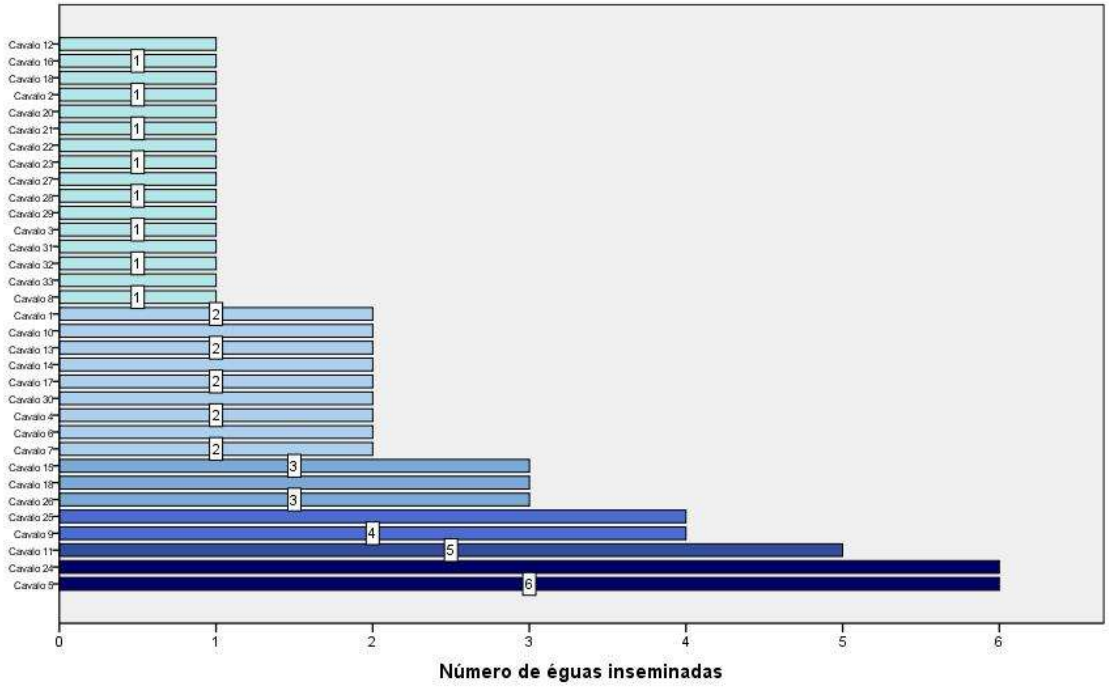
Tabela 4: Testagem das Relações Lateralidade do Ciclo e Resultado da Inseminação, Efectuadas Através de Testes Qui-quadrado

	$\chi 2$	g.l.	p *Bilateral*
Lateralidade do Ciclo (Drt. ou Esq.) x Resultado da Inseminação	0,000	1	1,000[a]

[a] Utilizada a correcção de continuidade

Expondo os dados relativos ao sémen utilizados, foi manipulado sémen de 33 cavalos diferentes para as 68 éguas. Tendo sido, no máximo inseminadas 6 éguas com um mesmo cavalo. (gráfico 7). De 33 Cavalos diferentes existiram alguns casos em que o mesmo cavalo foi usado mais de uma vez mas com sémen conservado de formas diferentes. Quer isto dizer que o sémen de um mesmo cavalo pode ter sido usado para uma égua sob forma congelada e para outra sob forma Refrigerada/Fresca ou por monta natural.

Gráfico 7 – Representação do Número de Éguas Inseminadas Por Cada Cavalo.



Na tabela 5 pode observar-se a taxas de sucesso das éguas por tipo de sémen utilizado (Taxa de Sucesso da inseminação vs Tipo de Sémen). Da sua leitura, verifica-se que no caso do Sémen Refrigerado/Fresco 84,6% das éguas em que foi usado este tipo de sémen ficaram gestantes. Com utilização de Sémen Congelado, 78,9% de éguas foram confirmadas em gestação e com monta natural 100% das éguas apresentaram gestação. É ainda perceptível pela tabela que, das 62 éguas que se conhecia o resultado da inseminação ou da monta natural 52 apresentaram gestação o que representa uma taxa de 83,9% de sucesso nas éguas em que foi feito o diagnóstico de gestação aos 15 dias após inseminação.

Tabela 5: Resultado da Inseminação das Éguas Seguidas por Tipo de Sémen

			Diagnóstico aos 15 dias		
			Negativo	Positivo	Total
Tipo de sémen	Refrigerado/Fresco	Frequência	6	33	39
		Percentagem	15,4%	84,6%	100,0%
	Congelado	Frequência	4	15	19
		Percentagem	21,1%	78,9%	100,0%
	Monta natural	Frequência	0	4	4
		Percentagem	0,0%	100,0%	100,0%
Total		Frequência	10	52	62[a]
		Percentagem	16,1%	83,9%	100,0%

[a] Utilizadas na comparação somente as 62 éguas cujos resultados eram conhecidos

Em prol de se saber os resultados das inseminações por ciclo observado conforme o tipo de sémen que foram elaboradas as tabelas 6 e 7. Nestas tabelas conseguimos interpretar que, com sémen congelado (tabela 6) a percentagem de gestações obtidas com IA no primeiro ciclo seguido foi de 38,1%, a percentagem de éguas seguidas em 2 ciclos teve uma taxa de sucesso de 36,4%. Já em éguas em que se seguiu três ciclos a percentagem de gestações conseguida foi de 42,9%. Apenas foram seguidas 2 éguas em quatro ciclos reprodutivos, uma delas não chegou a fazer-se IA neste ciclo por opção do proprietário e devido a vários problemas de saúde que a mesma vinha demonstrando desde o inicio do seu acompanhamento e a outra estava a ser inseminada com um sémen de muito má qualidade o que tornou impossível provocar a sua gestação quer neste ciclo observado quer nos anteriores.

Tabela 6: Inseminação de Sémen Congelado por Ciclo Observado

			Resultado da inseminação			
			Negativo	Positivo	Sem confirmação	Total
Nº do Ciclo	1º Ciclo	Frequência	11	8	2	21
		Percentagem	52,4%	38,1%	9,5%	100,0%
	2º Ciclo	Frequência	7	4	0	11
		Percentagem	63,6%	36,4%	0,0%	100,0%
	3º Ciclo	Frequência	4	3	0	7
		Percentagem	57,1%	42,9%	0,0%	100,0%
	4º Ciclo	Frequência	2	0	0	2
		Percentagem	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
Total		Frequência	24	15	2	41
		Percentagem	58,5%	36,6%	4,9%	100,0%

Na seguinte tabela 7 examina-se a fertilidade das inseminações com sémen refrigerado/fresco em cada ciclo observado. Num primeiro ciclo seguido foram conseguidas 23 gestações em 38 éguas inseminadas o que dá uma taxa de 60,5% de gestações conseguidas. Já no segundo e terceiro ciclo seguidos foram conseguidas respectivamente 56,3 e 33,1% de gestações. Tomar nota ainda que em três das éguas inseminadas com este tipo de sémen não foi efectuado diagnóstico de gestação por opção dos proprietários, perdendo-se assim a hipótese de verificar se estariam gestantes.

Tabela 7: Inseminação de Sémen Refrigerado/Fresco por Ciclo Observado

			Resultado da inseminação			
			Negativo	Positivo	Sem confirmação	Total
Nº do Ciclo	1º Ciclo	Frequência	14	23	1	38*
		Percentagem	36,8%	60,5%	2,6%	100,0%
	2º Ciclo	Frequência	6	9	1	16
		Percentagem	37,5%	56,3%	6,3%	100,0%
	3º Ciclo	Frequência	1	1	1	3
		Percentagem	33,3%	33,3%	33,3%	100,0%
Total		Frequência	21	33	3	57
		Percentagem	36,8%	57,9%	5,3%	100,0%

*não foi utilizado o 1ºCiclo observado de 4 éguas.

No intuito de verificar se existe uma relação estatisticamente significativa entre o tipo de sémen utilizado e o resultado, ou seja, se existe uma maior ou menor prevalência de resultados positivos em função do tipo de sémen, realizou-se o teste de qui-quadrado. Os resultados são apresentados na tabela 8, da sua análise determina-se que não existe uma relação entre o tipo de sémen utilizado e o resultado. O resultado é independente do tipo de sémen utilizado (Qui-quadrado de Monte Carlo; $\chi 2$ (2)=1,126; p=0,563). Para verificar se o sucesso da inseminação se encontra relacionado com o número de ciclos acompanhados e usados para inseminação, aplicou-se o teste de independência do qui-quadrado, cujo resultado é apresentado também na tabela 8 e da sua interpretação, verifica-se que não existe relação entre o sucesso da inseminação e o número de ciclo observados com inseminação, estes aspectos são independentes ($\chi 2$ (3)=3,290; p=0,349).

Tabela 8: Testagem de Relações, Efectuadas Através de Testes de Qui-quadrado

	$\chi 2$	g.l.	p *Bilateral*	Residual Ajustado
Tipo de sémen x Resultado da Inseminação	1,126	2	,563[a]	
Nº Ciclo de Observado x Resultado da Inseminação	3,290	3	,349[a]	

[a] Utilizada a variante de Monte Carlo por não satisfação das condições de aplicabilidade do qui-quadrado

Pegando nos diferentes tipos de Sémen que foram usados, testou-se depois se há diferenças significativas no número médio de ciclos realizados em função do tipo de sémen usado. Na tabela 9 podem observar-se o número médio de ciclos por tipo de

sémen. Da sua descodificação advém que, a média de ciclos usados em éguas que foram a monta natural foi de 1 ciclo, nas éguas inseminadas por Sémen refrigerado/fresco fizeram-se em média observação de 1,45 ciclos, e as inseminadas por sémen congelado 1,95 ciclos.

Para testar se o número médio de ciclos difere em função do tipo de sémen utilizado efectuou-se o teste não paramétrico de Kruskall-Wallis em alternativa ao teste paramétrico de ANOVA, na medida em que não se assegura o pressuposto de normalidade de distribuição por grupo. Os resultados fornecem indicações da existência de diferenças significativas no número médio de ciclos entre éguas inseminadas pelos diferentes tipos de Sémen (Kruskal-Wallis; $\chi^2_{(2)}$ =6,215; p=0,045) (Tabela 9).

Tabela 9 - Ciclos Médios por Égua em Função do Tipo de Sémen

Ciclo	N	Mín.-Máx	Média	DP	Kruskal-Wallis	g.l	p
Monta natural	5	1-1	1,00	,000	6,215	2	0,045
Refrigerado/Fresco	42	1-3	1,45	,633			
Congelado	21	1-4	1,95	1,071			

Foi testado também se houve diferenças significativas no número médio de ecografias realizadas em função do tipo de sémen. Na tabela 10 podem observar-se o número médio de ecografias por tipo de sémen e verifica-se que a média de ecografias por monta natural foi de 5,80 ecografias, por sémen refrigerado/fresco 11,14 ecografias, e por sémen congelado 18,43 ecografias.

Com a finalidade de testar se o número médio de ecografias difere em função do tipo de sémen utilizado elaborou-se também o teste não paramétrico de Kruskall-Wallis, em alternativa ao teste paramétrico de ANOVA, na medida em que não se assegura o pressuposto de normalidade de distribuição por grupo.

Da apreciação dos resultados surge que existem diferenças significativas no número médio de ecografias realizadas em função do tipo de sémen (Kruskal-Wallis; $\chi^2_{(2)}$ =10,815; p=0,004). Analisando as comparações múltiplas, verifica-se que o numero médio de ecografias realizado com sémen por monta natural (5,80) é significativamente inferior ao quando realizado por sémen congelado (18,43). Não existem diferenças significativas entre as restantes médias (p> 0,05).

Tabela 10 - Média de Ecografias em Função do Tipo de Sémen

Ciclo	N	Mín.-Máx.	Média	DP	Kruskal-Wallis	g.l	p	Comparações múltiplas p
Monta natural	5	4 - 8	5,80	1,789	10,815	2	,004	Monta natural*Congelado p=0,008
Refrigerado/Fresco	42	2 - 34	11,14	7,374				
Congelado	21	4 - 75	18,43	15,455				

Apesar de 80,9% das éguas serem PSL e existirem poucos animais no estudo PSA (5,9%) e Cruzados (13,2ª%) quis-se testar também se a taxa de sucesso tinha diferenças significativas e entre raças. A tabela 11 estuda as taxas de sucesso das éguas consoante a raça. Considerando a tabela, nas éguas de raça cruzada e lusitanas prevalecem éguas com resultados positivos (respectivamente 71,4% e 90,2%) e nas éguas PSA prevalecem os resultados negativos (75%).

Tabela 11 - Resultado das Éguas Avaliadas por Raça da égua

			Diagnóstico aos 15 dias		
			Negativo	Positivo	Total
Raça da égua	Cruzada	Frequência	2	5	7
		Percentagem	28,6%	71,4%	100,0%
		Residual Ajustado	1,0	-1,0	
	PSL	Frequência	5	46	51
		Percentagem	9,8%	90,2%	100,0%
		Residual Ajustado	-2,9	**2,9**	
	PSA	Frequência	3	1	4
		Percentagem	75,0%	25,0%	100,0%
		Residual Ajustado	**3,3**	-3,3	
Total		Frequência	10	52	62[a]
		Percentagem	16,1%	83,9%	100,0%

[a] Utilizadas na comparação somente as 62 éguas cujos resultados eram conhecidos

Para verificar se existe uma relação estatisticamente significativa entre a raça e o resultado, ou seja, observação de uma maior/menor prevalência de éguas positivas em função da raça, efectuou-se um teste de qui-quadrado. Os resultados são apresentados na tabela 12, onde se vê uma relação entre a raça e a confirmação da égua (Qui-quadrado de Monte Carlos; $\chi 2$ (2)=12,557; p=0,004). As éguas PSL tendem a apresentar uma taxa positiva significativamente superior (ResAjus=2,9), enquanto que, pelo contrário, as éguas PSA uma taxa positiva significativamente inferior (ResAjust=3,3).

Tabela 12: Testagem das Relações Raça da égua e Resultado da inseminação, Efectuadas Através de Testes de Qui-quadrado

	$\chi 2$	g.l.	p *bilateral*	Residual Ajustado
Raça da égua x Resultado da inseminação	12,557	2	,004[a]	PSL*Positivo=2,9 PSA*Negativo=3,3

[a] Utilizada a variante de Monte Carlo por não satisfação das condições de aplicabilidade do qui-quadrado

Concluindo, para ensaiar se as éguas com resultado negativo têm uma média de idade significativamente diferente das éguas com resultados positivos, aplicou-se o Teste paramétrico T para 2 amostras independentes, estando assegurados os pressupostos à sua realização.

Na tabela 13 podem observar-se as médias de idade das éguas em função do resultado da inseminação. Da sua descodificação percebe-se que a idade média das éguas com resultado negativo é de 10,80 anos e a com resultados positivos 9,17 anos. Pode afirmar-se ainda, pela mesma tabela, que não existem diferenças significativas na idade média das éguas com diagnóstico positivo e negativo (T(60)=0,905; p=0,905), ou seja o resultado é independente da idade da égua.

Tabela 13 – Média de Idades das Éguas em Função dos Resultados das Inseminações

Diagnóstico	N	Mín.-Máx.	Média	DP	Teste T	g.l	p
Negativo	10	3-21	10,80	6,286	,905	60	,369
Positivo	52	3-19	9,17	4,993			

Já na tabela 14 observamos de modo detalhado as idades das éguas consoante os diferentes tipos de sémen, consegue perceber-se pela tabela que com IA de sémen Refrigerado/Fresco utilizaram-se animais entre os 3 e os 21 anos com uma média de 8,93 anos para este caso. Desde logo, consegue ver-se também na tabela, que as médias de idades dos animais sujeitos a IA com sémen congelado e a monta natural são de 11,14 e 4,60 anos respectivamente. Com idades compreendidas entre os 3 e 19 anos para sémen congelado e os 3 e 8 anos para monta natural.

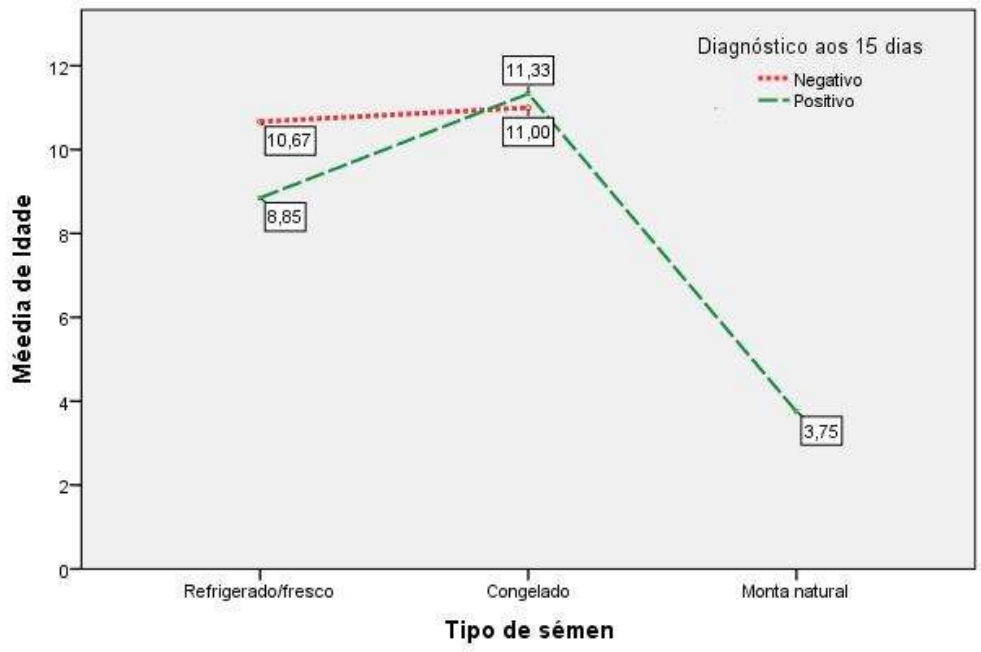
Tabela 14: Idade das Éguas por Tipo de Sémen

Tipo de sémen	N	Mínimo	Máximo	Pc25	Mediana	Pc75	Media	DP
Refrigerado/Fresco	42	3 Anos	21 Anos	5	8	12	8,93	4,955
Congelado	21	3 Anos	19 Anos	6	11	15	11,14	4,902
Monta natural	5	3 Anos	8 Anos	3	4	6,5	4,60	2,074

Na sequencia das tabelas anteriores importava ainda saber se na amostra a idade interfere ou não com o resultado da inseminação e se sim em que tipo de sémen utilizado seria. Assim, efectuou-se o gráfico 9 para apresentação destas questões.

Afirma-se então que não se observam diferenças significativas na média de idade das éguas com diagnóstico positivo e diagnóstico negativo aos 15 dias quando a inseminação foi realizada com sémen Refrigerado/Fresco (Teste t; p> 0,05), Sémen congelado (Teste t; p> 0,05). Ou seja, nesta amostra a idade não interfere com o resultado da inseminação, em nenhum dos tipos de sémen utilizado.

Gráfico 8 – Média de Idade das Éguas por Resultado aos 15 dias e Tipo de Sémen.



6) Discussão

O estudo e avaliação desta época reprodutiva tem como suporte uma amostragem constituída por 68 animais, dos quais, 42 (61,76%) foram inseminados com sémen Refrigerado/Fresco, 21 (30,88%) com sémen congelado e 5 animais (7,35%) foram seguidos reprodutivamente, contudo acabaram por encaminhar-se para monta natural por opção dos proprietários. A amostra, é na sua maioria, de raça PSL (80,88%), havendo éguas PSA (5,88%) e as restantes cruzadas (13,24%). A média de idades da amostra foi de 9,29 anos, estando os animais compreendidos entre os 3 e os 21anos, 50% dos animais apresentam até 8 anos.

Fazendo uma avaliação do tipo da amostra, com apoio aos gráficos 1, 2 e 3, poderíamos desde já, julgando de maneira superficial, indicar que o facto de ser um pouco heterogénea a possa tornar limitada. Heterogénea quanto ao número de éguas avaliadas, para os diferentes tipos de sémen, assim como quanto às suas raças, pois numericamente não é absolutamente semelhante e homogénea para essas características, podendo ser assim uma amostra sub-óptima. No entanto a amostra tem as grandes vantagens e quando avaliada devidamente é de conclusões interessantes e de boa possibilidade à sua discussão.

Outro ponto que pode causar alguma controvérsia no estudo, será a junção de dois tipos de sémen (sémen Refrigerado e sémen Fresco) numa só categoria de estudo, denominando-a de sémen Refrigerado/Fresco. Para este caso em análise, a constituição deste grupo tem algum sentido, e apesar de em termos bibliográficos as particularidades de cada um dos tipos de sémen estarem bem descritas, no caso deste estudo acabou por se estabelecer uma categoria comum que os une, pois a inseminação e o seguimento da égua para esses dois tipos de sémen é bastante próximo neste cenário, e mesmo em casos onde o sémen foi colhido e usado dentro dos parâmetros temporais que o definiriam como sémen fresco, esse mesmo sémen foi sempre centrifugado e foi-lhe adicionado diluidores próprios que fazem, por isso, com que tenha também características que são intrínsecas da definição de sémen refrigerado e no entanto não estaria, nem foi sujeito, a temperaturas e tempo de frio que definem as publicações como sendo características desse tipo de sémen. Devido a isso, a justificativa para a anastomose dos dois tipos de sémen numa categoria conjunta deve ser compreendida e aceite, facilitando assim o estudo sem o colocar em causa no que toca aos resultados.

A avaliação detalhada dos dados obtidos e do trabalho realizado, torna o trabalho final e os seus resultados interessante, confirmando muito daquilo que é dito na literatura a cerca do tema. A população estudada caracteriza-se por ser uma população que, além de real, corresponde a éguas internadas num dos 3 únicos Centros de Reprodução de Equinos Portugueses, durante todo ano de 2016.

Vários autores, tais como Morel, 2003 (cap.3, pp.28-39); Tompson, 2004; Hafez & Hafez, 2004, referem a égua como poliéstrica sazonal, ou seja, como sendo um animal que tem uma altura do ano em que o seu aparelho reprodutor faz vários ciclos e ovulações, e outra em que está mais parado e não produz cios. Salvo algumas excepções em que, segundo Hafez & Hafez, 2004, animais bem alimentados e estabulados podem efectuar ciclos durante todo o ano. Avaliando os dados recolhidos em clinica conseguimos observar isso mesmo de maneira clara. Na tabela 1 da apresentação de resultados, observa-se que o maior número de éguas seguidas reprodutivamente, deram entrada para esse efeito nos meses de primavera (Fevereiro, Março e Abril) e foi também por essa altura (Março, Abril, Maio e Junho), que se obtiveram mais diagnósticos de gestação positivos, notando-se bem marcado o período sazonal de maior reprodução da égua conforme afirma a literatura.

Examinando em seguida os resultados finais de uma forma geral, conforme o gráfico 4, conclui-se que das 68 éguas para IA em estudo, a taxa de sucesso na inseminação foi de 76,5%, com 52 animais a apresentarem gestação aquando da sua confirmação aos 15 dias após IA, sabendo que 6 éguas (8,8%) não foram confirmadas e obtendo apenas 14,71% de resultados negativos, o que representa apenas 10 éguas sem gestação, das 68 em estudo. Apesar de já assim em bruto, através destes dados, conseguirmos dizer que os resultados finais foram muito positivos, não podemos fazer uma avaliação final da época apenas com base neles, pois é de notar que estes resultados, apesar de muito positivos, estão em bruto, sem descodificar o tipo de sémen usado e o número de éguas para cada categoria de sémen. Encontram-se também sem detalhes referentes a animais que, não realizaram diagnóstico de gestação, e a alguns ciclos que não foram usados por diversas razões. Ou seja, no caso do gráfico 4, faz-se uma avaliação do trabalho realizado de forma geral, mas para uma avaliação detalhada da época reprodutiva, é necessário esmiuçar estes mesmos resultados e avaliar o seu sucesso minuciosamente nos diferentes ciclos e tipos de inseminação e de sémen.

Loomis, 2005 refere que, um dos factores que limita uma IA de sémen congelado, é o protocolo de IA, bem como o maior nível de intensidade e trabalho da

mesma com este tipo de sémen, o que a torna mais limitada e com mais custos. Pelo contrário, a IA com sémen Refrigerado/fresco, que tem um maneio da égua e um protocolo mais simples e, é por isso, menos trabalhosa.

A tabela 2 reflecte a maior carga de trabalho que tem a IA com o sémen congelado, comparativamente ao sémen Refrigerado/fresco e á monta natural. Com exactamente metade das éguas seguidas para sémen congelado (21éguas), do que para sémen refrigerado/fresco (42éguas), o número de ecografias realizadas para o total das inseminações com sémen congelado foi de 387e foram seguidos 41 ciclos para sémen congelado. Enquanto nas IA de sémen Refrigerado/Fresco foram totalizadas 468 ecografias em 42 éguas seguidas. Olhando atentamente estes números, retira-se que, apesar de se ver na tabela maior número de ecografias no caso de sémen Refrigerado/Fresco, quando relacionamos este número com o número de éguas seguidas, conclui-se que para metade das éguas de sémen Refrigerado/Fresco, o sémen congelado realizou um número bastante mais elevado de ecografias, reflectindo assim de forma simples, a maior intensidade no maneio associado a mais ecografias e consequente trabalho.

Relacionando ainda pela tabela 2, apenas o número de ecografias com o número de ciclos seguidos, será de esperar que éguas onde foram seguidos mais de um ciclo reprodutivo foram, por isso, sujeitas a mais trabalho, realizando obviamente mais ecografias, o que aconteceu também em mais vezes no caso do sémen congelado. De forma geral, foram seguidos num total das 68 éguas, 107 ciclos reprodutivos e realizadas a esses 107 ciclos, 884 ecografias.

Detalhando através da tabela 3, nos animais em que só foi seguido um ciclo, 41 éguas, a média de ecografias realizadas foi de 7,20, sendo no máximo efectuadas 12 ecografias para seguimento de um só ciclo. Seguindo o mesmo raciocínio, nos casos das éguas em que se seguiu 2 ciclos, a média de ecografias realizadas já foi de 16,06. Nas que foram seguidos 3 ciclos a média foi de 26,63 ecografias, aumentando a média de ecografias realizadas à medida que vão também aumentando número de ciclos seguidos, como seria de esperar. Conclui-se então, à medida que são seguidos mais ciclos, naturalmente o número de ecografias realizadas aumentou, sendo de 13 a média total de ecografias realizadas nas 68éguas.

Porque os dados recolhidos assim o permitiram analisar, foi realizada também uma análise acerca da lateralidade dos ciclos observados nas éguas. As perguntas efectuadas nesse âmbito foram as seguintes: em qual dos ovários (esquerdo ou direito)

foram seguidos mais ciclos e consequentemente observadas mais ovulações? Será que a taxa de gestações conseguidas foi maior com os ciclos seguidos num dos lados em particular? Ou o lado de ovulação, seguimento e inseminação não teve relação com uma taxa de gestação mais elevada? Apesar de não ter encontrado literatura recente para comparação destes dados, a maioria dos trabalhos reportam maior incidência de ovulações no ovário esquerdo, quando comparadas ao direito, facto que, tal como no estudo de Romano et al., 1998, não foi observado neste caso, que demonstrou uma ocorrência igual entre os dois ovários. Na análise do gráfico 5, observou-se que em questões de lateralidade, foram seguidos ciclos e por isso ovulações, em quase igual número em ambos os ovários, direito e esquerdo, sendo seguidos um total 107 ciclos, onde 54 (50,47%) foram apreciados no ovário esquerdo e 53 ciclos (49,53%) no ovário direito. A diferença vista, com apenas um ciclo a mais seguido do lado direito, torna-se insignificante e entende-se então que, neste caso de estudo, não houve diferenças na lateralidade dos ciclos observados pela égua. O mesmo aconteceu quando se testou a taxa de sucesso por lateralidade do ovário, no gráfico 6, onde os resultados obtidos foram uma taxa de sucesso das IA efectuadas em ciclos seguidos e trabalhados do lado esquerdo de 53,19%, e 54% no lado direito. Olhando às questões elaboradas sobre este tema pode então responder-se, que neste caso, não haverá relação entre a lateralidade do ciclo seguido na égua e o sucesso da inseminação desse ciclo, tendo ambos os ovários as mesmas taxas de positividade e igualdade em número de ciclos observados e seguidos em ambos os lados. No entanto, ainda foi efectuado o teste Qui-Quadrado, como forma de confirmar a existência de uma relação entre a lateralização do ciclo e o resultado obtido. Os resultados do teste, na tabela 4, confirmam novamente que o sucesso da IA era independente do lado do ciclo, ou seja, estes aspectos não se encontram relacionados neste caso.

Ainda de realçar que, para as 68 éguas em estudo, foi utilizado sémen de 33 cavalos diferentes, podendo o sémen de um mesmo cavalo, sob formas diferentes (refrigerado/fresco ou congelado), ter inseminado diferentes éguas. Tendo sido, num máximo, inseminadas 6 éguas com o mesmo cavalo tal como representa o gráfico 7.

Olhamos agora para o sucesso final das IA dos diferentes tipos de sémen relatado na tabela 5, onde é descrito o número de diagnósticos positivos e negativos das 62 éguas que foram confirmadas. Mantiveram-se afastadas do estudo as 5 éguas às quais não se realizou diagnóstico de gestação.

Segundo Sieme et al., 2004[a], a percentagem média de gestações utilizando sémen refrigerado, é de 56,5%. Já Jascko et al., 1992, refere como taxa de gestação satisfatória 65% e Morel, 2008 adianta que para este tipo de sémen taxas de concepção, entre os 50 e 80%, são regularmente relatadas. Os resultados finais obtidos, para este tipo de sémen, conforme a tabela 5, foram de 84,6 % de diagnósticos de gestação positivos nas éguas confirmadas, o que revela um valor consideravelmente superior ao referenciado por alguns dos autores atrás assinalados, evidenciando o trabalho de excelência que foi realizado neste ponto.

No caso do sémen congelado, a definição de uma boa taxa de fertilidade depende, comparativamente ao sémen Refrigerado/Fresco, de muitos factores e varia de garanhão para garanhão consoante o potencial de congelabilidade do seu sémen. Varia também, no mesmo garanhão, consoante os diluidores e as variáveis de congelação usadas. Porém, Morel, 1999, afirma ainda ser evidente que as taxas de gestação, como resultado do uso do sémen congelado, variam enormemente e a previsão do sucesso é imprecisa. Já Sieme et al., 2003, relata que o aparecimento de taxas de gravidez relativamente precárias, após a IA com sémen congelado, em comparação com o sémen Refrigerado ou Fresco são comuns. Não obstante, o resultado final conseguido foi de 15 animais com diagnóstico de gestação positivo, num total de 19 que foram confirmados após IA, representando, no geral, uma taxa de gestação positiva de 78,9%. Equiparando este valor com outros resultados publicados, comprova-se mais uma vez o excelente trabalho efectuado, pois segundo Morel, 1999, as taxas de gestação deste tipo de sémen não são tão elevadas como as de sémen Refrigerado, e seria normal chegar a resultados que podiam rondar os 5-30% de diferença comparativamente aos resultados de sémen Refrigerado/Fresco. Govaere et al., 2014 obteve, num estudo realizado acerca de protocolos de inseminação com sémen congelado, um resultado geral de gravidez de 27%, relatado por diversos autores como normal quando se trabalha com este tipo de sémen, resultado esse que é bastante mais baixo quando comparado com o obtido na presente análise.

No caso de Govaere et al.,2014, o autor conseguiu no estudo, uma taxa de gravidez por ciclo com sémen congelado de 40% no grupo de controlo positivo. Ainda segundo Samper, 2001 a taxa média de gestações por ciclo com sémen congelado é de 30 a 40%. Neste caso, comentando através da tabela 6, conseguiram-se taxas de gestação positivas de 38,1%, 36,4% e 42,9% no 1º, 2º e 3º ciclo respectivamente, obtendo um total de 36,6% de gestações por ciclo, ficando este valor dentro do intervalo

já definido por Samper,2001 e muito próximo do obtido por Govaere et al.,2014. Chegando mesmo a obter melhores resulta que os autores acima referidos no caso do 3ºciclo seguido, onde se conseguiu uma taxa de gestação de 42,9%.

Fazendo idêntica analise para o sémen Refrigerado/fresco na tabela 7 dos resultados, repara-se que se obteve uma taxa de sucesso de 60,5% para o primeiro ciclo seguido, 56,3% no segundo ciclo seguido e de 33,3% para o terceiro ciclo seguido, resultando numa percentagem media final de gravidez por ciclo de 57,9%. Analisando alguma literatura, Morrell et al.,2014 refere, através de outros autores na introdução ao seu estudo que a taxa de gestação por ciclo com sémen refrigerado após inseminações é de cerca de 65%, sendo dependente da qualidade espermática do ejaculado, e refere ainda que um terço das éguas inseminadas com este tipo de sémen e que não ficam gestantes deve-se a problemas associados a vários factores incluindo a qualidade do esperma, factores de manipulação do mesmo e factores da égua. Morrell et al.,2014 obteve depois no grupo de controlo do seu estudo uma taxa de gestação por ciclo com sémen Refrigerado de 45%. Outros autores relatam taxas de gestação de 56% e entre 49,7-71,4% por ciclo (Sieme et al., 2003; Vidament et al.,1999). Discutindo os resultados vistos em bibliografia com os resultados obtidos neste estudo constata-se que a taxa de 57,9% de gestações por ciclo com sémen Refrigerado/Fresco se enquadra perfeitamente com os resultados de outros estudos referidos.

Por forma a confirmar os resultados obtidos nos gráficos 5, 6 e 7 e a obter maior informação, foram realizados testes estatísticos de qui-quadrado sobre esses dados. Na Tabela 8 vêem-se os resultados dos testes qui-quadrado e depreende-se através deles que não existe uma relação entre o tipo de sémen usado e o resultado da IA e também que não existe relação entre o sucesso da inseminação e o número de ciclo observado com inseminação, sendo estes aspectos independentes. Considerando a resposta aos testes feitos nota-se o excelente resultado já discutido acima acerca do trabalho feito, pois o teste refere não existir qualquer diferença entre o tipo de sémen usado e o resultado da inseminação, colocando assim a IA com sémen refrigerado/fresco e com sémen Congelado num mesmo patamar.

No entanto, o resultado deste teste em termos gerais não será de elevada fiabilidade devido ao facto da amostra não conter o mesmo número de éguas para IA com sémen congelado e IA com sémen refrigerado/fresco, e por isso não se conseguir comparar estas diferenças devidamente e com parâmetros de quantidade idênticos, talvez se aumentassem os casos de IA com sémen congelado coincidiríamos com um

aumento dos casos de insucesso das mesmas, mas em todo o caso, e sem divagar a outras hipóteses, este dado estatístico pode, não vinculando a diferença no número de éguas para os diferentes tipos de sémen, mas sim avaliando o caso como ele próprio e em particular significar mais uma vez que foi realizado um bom trabalho nesta época reprodutiva, conseguindo chegar-se muito perto das taxas de concepção do sémen refrigerado/fresco com as do sémen congelado.

No entanto, constata-se depois avaliando a média de ciclos utilizados consoante o tipo de sémen, na tabela 9, que na utilização de sémen congelado se obteve uma media mais alta de ciclos usados, com cerca de 1,95 ciclos para uma gestação com este tipo de sémen versus 1,45 ciclos e 1 ciclo usados para o sémen refrigerado e a monta natural respectivamente, considerando assim a maior dificuldade em provocar gestações em apenas um ciclo com sémen congelado comparativamente aos outros. Estes resultados mais uma vez não fogem é literatura, e confirmam o artigo de revisão de oliveira et al 2013 e as ideias de Morel 1999, que indica ser bastante mais trabalhoso o seguimento nas éguas para IA com sémen congelado e também que é evidente que taxas de gestação conseguidas através de sémen congelado não são tao elevadas quando comparadas com outros tipos de sémen. Estes quocientes são depois solidificados pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskall-wallis, também representado na tabela 9, que indica existência de diferenças significativas no número médio de ciclos entre éguas inseminadas com sémen congelado e éguas para monta natural e não desmente a diferença existente entre a média de ciclos usados para IA com sémen fresco e congelado.

Na tentativa de avaliar melhor o trabalho realizado e particularizar todos os pontos onde pode existir diferenças consoante o tipo de sémen, de forma a obter uma análise minuciosa que confirme em mais pontos a literatura referida, fez-se a testagem e comparação do número médio de ecografias feitas nas éguas para os diferentes tipos de sémen, determinando diferenças significativas. O desfecho é apresentado na tabela 10, com uma média de 18 ecografias realizadas em éguas de sémen congelado e de 11 ecografias para éguas de sémen refrigerado/fresco, demonstrado também pelo teste estatístico de Kruskal – Wallis, que ditou haver neste caso diferenças significativas no número médio de ecografias realizado em função do tipo de sémen. Todavia, podemos admitir diferenças ainda maiores pois com uma avaliação mais pormenorizada da tabela de dados recolhida observa-se que 5 éguas seguidas para IA com sémen refrigerado/fresco realizaram mais de 20 ecografias devido a problemas reprodutivos e

consequente tratamento, facto este que levou a realizar mais ecografias nestes casos particulares. Retirando essas éguas da contagem a média de ecografias para éguas de sémen refrigerado/fresco desce substancialmente para 9 ecografias por cada seguimento de égua para inseminação com esta categoria de sémen considerada em estudo.

Apesar de na sua maioria a amostra ser composta por éguas PSL (80,9%) testou-se se a raça era um tema influente na taxa de sucesso das IA. Como resultado, na tabela 12, foi ultimado pelo teste de qui-quadrado que as éguas PSL, neste caso, apresentaram uma taxa positiva significativamente superior e as éguas PSA uma taxa negativa superior. Este resultado pode ser explicado pela maior existência de animais PSL em estudo e comparativamente muito baixo número de outras raças. Contudo esta observação é muito limitada e não pode ser considerada porque a amostra não é exageradamente desproporcional em termos de raças, existindo muito poucos animais PSA e Cruzados comparando com PSL para se puder realizar uma comparação considerável. Todavia, contemplando as taxas de sucesso de cada raça individualmente, na tabela 11 vê-se que dos 62 animais com diagnóstico de gestação efectuado as éguas PSL num total de 51 animais apresentaram taxa de sucesso de 90,2% (46 éguas gestantes), as éguas PSA num total de 4 animais apresentaram apenas 1 gestante (25% positivos) e nos animais Cruzados conseguiu-se uma percentagem de 71,4% resultados positivos (5 animais num total de 7).

Para a conclusão da análise e reflexão acerca dos dados recolhidos realizou-se o balanço dos resultados consoante a idade das éguas em estudo. Como já dito anteriormente a idade média das 68 éguas é de 9,29 anos, com um mínimo de 3 anos e um máximo de 21 anos. Pela visualização da tabela 13, conseguimos afirmar que a média das idades das éguas com diagnóstico final negativo (10 animais) é ligeiramente mais alta que a média das idades das éguas com diagnóstico de gestação positivo (52 animais) com 10,8 anos e 9,17anos de médias respectivamente. Encaixando os resultados com a bibliografia pode dizer-se que, apesar de insignificante a diferença da média de idades, ela faz sentido e relata bem o que já é dito. Por exemplo em Morel,1999 lê-se que a idade pode ser uma consideração a ter aquando da IA, mas dentro da faixa etária dos 5 aos 12 anos não é observado um efeito significativo da idade sobre a fertilidade. Contudo o autor refere que éguas de ambos os lados destes limites podem mostrar uma redução da fertilidade para a IA, especialmente as éguas mais velhas. Apesar de ambas as idades médias das éguas positivas e negativas estarem dentro do intervalo definido por Morel 1999 como sendo de idade boa para reprodução

e de ter sido confirmado através do "teste T" que não existem diferenças significativas na idade média das éguas com diagnóstico positivo e negativo, eles vão ao encontro de Sharma et al. 2010, que refere que a taxa de gestação das éguas diminui com o aumento da idade das mesmas e de Valle et al.,1999 que conclui-o no seu estudo que a fertilidade decaiu com a aproximação aos 15 anos de idade.

Satisfazendo o interesse pela idade das éguas consoante o tipo de sémen na tabela 14 descortina-se que a média das idades das éguas para IA com sémen refrigerado é de 8,93 anos e de 11,14anos e 4,60anos para sémen congelado e monta natural respectivamente, acontecendo curiosamente que para IA com sémen congelado, onde será mais difícil provocar gestações conforme o provado pela bibliografia de Sieme et al., 2003 e outros autores, corresponde a media de idades mais alta onde também piora a fertilidade da égua, embora a mesma esteja igualmente dentro de intervalo definido como de idade aceitável para reprodução como já foi dito, tornando este dado uma mera conclusão curiosa sem efeito significativo nos resultados obtidos. Finalmente, o gráfico 8 relaciona a média das idades das éguas por resultado do diagnóstico de gestação aos 15dias após inseminação e pelo tipo de sémen usado, fazendo um cruzamento de todos os dados onde se constata que por monta natural foi onde se conseguiu uma média de idades com diagnóstico positivo mais baixa e reafirma que a diferença das idades das éguas com diagnostico negativo não é significativa atendendo ao sémen congelado e fresco como foi provado também pelo "teste T" (test T; $p > 0,05$).

7) Conclusão

Ao longo do presente trabalho, foi analisada uma época reprodutiva num centro de reprodução equina português. Descreveram-se os resultados obtidos com a inseminação de éguas, a partir dos principais tipos de conservação de sémen, utilizados em reprodução equina actualmente, bem como o trabalho efectuado para cada um deles. A amostra é representativa, com um número considerável de animais, e os resultados conseguidos confirmaram, o que é descrito na literatura.

Observaram-se resultado idênticos, entre o número de gestações obtidas com o sémen congelado (cerca de 80% de gestações), ao número de gestações com sémen Refrigerado/Fresco (cerca de 84%), apesar da bibliografia indicar que a percentagem de gestações com sémen congelado é mais baixa do que com sémen refrigerado ou fresco. A taxa de gestação obtida no geral foi positiva, obtendo-se num total dos 68 animais, 52 gestantes no final do ano reprodutivo.

Observou-se que na realização de IA com sémen congelado, o trabalho efectuado é mais intenso e de maneio mais severo, tal como é afirmado por diversos autores na literatura. Contudo, pode definir-se que seguindo um protocolo fiável os resultados podem ser também eles estimulantes com este tipo de sémen.

No entanto, para ambas as IA com os diferentes tipos de sémen, tem sempre de se contar com a variável "Qualidade do Sémen" que, mesmo não sendo avaliada nesta dissertação, é intrínseco que pode, só por si, definir o sucesso ou não de uma IA.

As fertilidades conseguidas por ciclos, nos diferentes tipos de sémen, foram também equiparadas á literatura, estando também no limite superior óptimo do que foi conseguido por diversos autores.

A inseminação artificial e o seguimento reprodutivo equino, estão em clara evolução e desenvolvimento no país e no mundo. São de elevada vantagem e rentabilidade, em coudelarias que queiram tornar a sua genética um produto a ser exportado, tal como coudelarias que queiram implementar programas de reprodução.

Realizando protocolos de inseminação, pode chegar-se a resultados muitos satisfatórios e ganhos genéticos importantes na criação de cavalos. Este estudo confirma a vantagem que, a inseminação artificial representa no maneio reprodutivo de equinos.

.

Referencias Bibliográficas

- Agrícola R, Chaveiro A, Robalo Silva JR, Horta A, Silva FM. "Seasonal changes in semen quality and freezability in Lusitano stallions: A flow cytometric study".(2008), *Proceedings of the 5th International Symposium on Stallion Reproduction*, Anim. Reprod. Sci.,107, 302-303.
- Allen WR, 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse. Breeding. Reproduction in domestic Animals, 40, 310-329 (2005). Blackwell Verlag, Berlin
- American Museum of Natural History, (AMNH). (2008/2009b) *The evoluition of horses*, Acedido em 15 Setembro 2016, disponível em: *http://www.amnh.org/exhibitions/horse/the-evolution-of-horses*
- American Museum of Natural History, (AMNH). (2008/2009a). *How we shaped horses how horses shaped us*, Acedido em 15 Setembro 2016, disponível em: *http://www.amnh.org/exhibitions/horse/how-we-shaped-horses-how-horses-shaped-us*
- Ax R..L;Dally M..; Didion B.A.; Lenz R.W.; Love C.C.; Varner D.D.; Hafez B. & Bellin M.E. (2004). Avaliação do sémen. In: Hafez B. & Hafez E.S.E. *Reprodução Animal*. (7ªed, Cap.25, pp. 369-380). Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Ax R.L., Dally M., Didion B.A., Lenz R.W., Love C.C., Varner D.D., Hafez B. & Bellin M.E. (2004b). Inseminação Artificial. In Hafez E.S.E. & Hafez B. *Reprodução Animal*. (7ª edição, capitulo 26, pp. 381-394), Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Bergfelt, Don R "Anatomy and Physiology of The Mare". In: Samper J.C., Equine breeding management and artificial insemination. (2009) 2ªEd:Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri USA (Cap.11, pp. 113-133)
- Bertol, M. A. F. Estágio curricular supervisionado em reprodução animal. (2009). Trabalho apresentado para conclusão de curso de medicina veterinária da Universidade Federal do Paraná.
- Blanchard, T.L., Dickson, D.V., Schumacher, J., Love, C.C., Brinsko, S.P. & Rigby, S.L. (2003a). *Manual of equine reproduction*. (2ª ed.; chapter 1, 2 & 3; pp.1-30). St. Louis: Mosby

- Blanchard, T.L., Dickson, D.V., Schumacher, J., Love, C.C., Brinsko, S.P. & Rigby, S.L. (2003b). *Manual of equine reproduction*. (2ª ed.; chapter 12, 13 &14; pp.131-177). St. Louis: Mosby
- Blanchard, T.L., Dickson, D.V., Schumacher, J., Love, C.C., Brinsko, S.P. & Rigby, S.L. (2003c). *Manual of equine reproduction*. (2ª ed.; chapter 14; pp.165-177). St. Louis: Mosby.
- Brackett, Benjamin g. Reprodução em Mamíferos do sexo Masculino. In: REECE, W. O. *Dukes - Fisiologia de animais domésticos*. (2006). (12ª Ed.; secção V; pp.623-643), Editora Guanabara Koogan. Rio De Janeiro.
- Brinsko S.P. (2006). Insemination doses: How low can we go?. *Theriogenology*, 66(3), 543-550. 05jun2006
- British Equine Veterinary Association (1991) *Codes of Practice for 1) Veterinary Surgeons and 2) Breed Societies in the United Kingdom and Ireland Using AI for Breeding Equids.* British Equine Veterinary Association, London, 24 pp.
- Brito L. Evaluation of stallion sperm morphology. (2007) *Clinical Techniques in Equine Practice*, vol.6. issue 4, pp.249-264
- Canisso I.F., Souza F.A., Silva E.C.,Carvalho G.R., Guimarães J.D.,Lima A.L. (2008). Artificial insemination in equines: diluted, cooled and transported race sémen. Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba. (v. 6, n. 3, p. 389-398, jul./set. 2008)
- Cary JA., Madill S., Farnsworth K., Hayna J. T., Duoos L. & Fahning M. L. (2004). A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *The Canadian Veterinary Journal*, 2004 january 45(1): 35-41
- Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiery, J. C., Pellicer-Rubio, M. T., & Malpaux, B. (2008, Julho). Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod Domest Anim, 43* (s2), 40-47
- Crowell-Davis, S. L. (2007). Sexual behavior of mares. *Horm Behav, 52* (1), 12-17.
- **C**Cuervo-Arango, J., & Clark, A. (2010). The first ovulation of the breeding season in the mare: the effect of progesterone priming on pregnancy rate and breeding management (hCG response rate and number of services per cycle and mare). *Anim Reprod Sci*, , Abril 2010, *118* (2), 265-269.

- Colenbrander B, Gadella BM, Stout TA. 2003. The predictive value of sémen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, **38**: 305-311.
- Donadeu, F.X. and Pedersen, H.G. (2008) *Follicle Development in Mares*. Reprod Dom Anim 43 (Suppl. 2), 224–231 (2008); doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01166.x. ISSN 0936-6768
- Duarte J.C., 2007. *Reprodução Equina – Evolução do seu controlo em Portugal*. Congresso na Universidade de Évora.
- Duarte J.C. (2008). *Aspectos Actuais da Reprodução Equina*. São Miguel, Açores: XVII Congresso Nacional de Zootecnia
- European Horse Network. (2010). *The european horse indrutry in the european regions*, acedido em 15 Setembro 2016, disponível em: http://www.europeanhorsenetwork.eu/
- Estrada A.J. & Samper J.C. (2007). Evaluation of raw sémen. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. *Current therapy in equine reproduction*. (2º ed.; pp. 253-257). St. Louis, USA: Saunders Elsevier
- Gamboa S.P., (2011). Infertilidade Equina: Múltiplas Fragilidades ou um "Fado" Do Espermatozóide. (cap3, pp.61-65) Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Biologia, na especialidade de Biologia Celular. Orientada pelo Professor Doutor João Ramalho de Sousa Santos, do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
- Garner, D.L., Hafez E.S.E. Espermatozoides e Plasma Seminal. (2004) in: Hafez B., Hafez E.S.E. (2004). *Reprodução Animal.* (7ªed, Cap.7, pp97-110). Editora: Manole.
- Getty R., Grossman J.D. & Sisson S., (1981) Anatomia dos animais domésticos**.** pp. 507-512. Rio de Janeiro: Interamericana).
- Govaere J.L.J.,Hoogewijs M.K., De Schauwer C., De Vliegher S. , Van Soom a., Duchateau L. and de Kruif A. (2014). *Effect of Artificial Insemination Protocol and Dose of Frozen/Thawed Stallion Semen on Pregnancy Results in Mares.* Reprod Dom Anim 49, 487 – 491 (2014); doi: 10.1111/rda.12316, ISSN 0936 – 6768.
- Graham J.K. (1996) "Analysis of stallion semen and its relation to fertility" Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 12 (1), 119-130.

- Guimarães, T.P. Técnicas De Reprodução Assistida Em Equinos. (2014). (Introdução Geral, pp.9 -31). Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. Orientada pelo Professor Doutor António Rocha, Professor Catedrático afiliado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.
- Hafez B. & Hafez E.S.E. (2004). *Reprodução Animal* (7ªed, Cap.14 "Equinos", pp193-218). Editora: Manole.
- Hafez B. & Hafez E.S.E. (2004a). *Reprodução Animal* (7ªed, Cap.2 "Anatomia Da Reprodução Feminina; pp13-29). Editora: Manole.
- Hafez E.S.E. Anatomia Da Reprodução Masculina. (2004). In: Hafez B., Hafez E.S.E. *Reprodução Animal* (7ªed, Cap.1, pp3-13). Editora: Manole.
- Hafez E.S.E. (2004b). Preservação e Criopreservação de Gametas e Embriões. In Hafez E.S.E. & Hafez B. *Reprodução Animal*. (7ª edição, capitulo 30, pp. 435 - 446), Kiawah Island. South Carolina, USA: Manole.
- Janett F., Thun R., Niederer D., Burger D. & Hassig M., (2003). "Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion", Theriogenology. 2003 Aug; 60 (3): 453 – 61.
- Jasko D.J. (1992)."Evaluation of stallion semen".Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 8 (1): 129-148.
- Konig H.E., Liebich H.-G. (2011). *Anatonia de los animales Domesticos*.(2ºed., Tomo 2, pp 135-151). Editorial Medica: panamericana.
- Konig H.E., Liebich H.-G. (2011b). *Anatonia de los animales Domesticos*.(2ºed., Tomo 2, pp 119-134). Editorial Medica: panamericana
- Katila T. (2001). In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica,* 42:199. DOI: 10.1186/1751-0147-42-199. © BioMed Central Ltd. 2001.
- Katila, T. (1997) Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology* 48 (7), 1217 – 1227.
- Kenney, R.M., Bergman, R.V., Cooper,W.L. and Morse, G.W. (1975) Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proceedings of 21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, pp. 327–335.

- Landim-Alvarenga F.C., Fernandes C.B., Devito L.G., Derussi A.A.P., Blanco I.D.P. & Alvarenga M.A. (2008). New assisted reproductive technologies applied to the horse industry: successes and limitations. *Animal Reproduction* (vol. 5, 67- 82.)
- Ley, W.B. Broodmare reproduction for the equine practitioner. (2003). (Section 4: Anatomy and Physiology, pp.55-78) Wyoming, U.S.A.: Teton NewMedia.
- Ley, M.B., Reprodução em Éguas para veterinários de equinos. (2006). 1ª Ed. Roca, São Paulo, 2006, p.184-191.
- Love CC. 1992. *Semen collection techniques*. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice,1992 Apr, 8 (1): 111-128.
- Lopes da Costa L., Duarte A.F. & Robalo Silva J. (2007). Biotechnology of Reproduction and Development: from the Biomedical model of enterprise innovation.
- Loomis P.R., Squires E.L. (2005). *Frozen semen management in equine breeding programs.* Theriogenology 64 (2005) 480 – 491.
- Mann T., Minotakis C.S. & Polge C. (1963) "Semen Composition and Metabolism the Stallion and Jackass", *Journal of Reproduction and Fertility*, 5, 109-122.
- Meijer, J.C. & Van Vlissingen, J.M.F. (1993). Gross structure and development of reproductive organs. In G.J. King (Ed.), *World animal science: Reproduction in domesticated animals* (pp. 9-53). Netherlands: Elsevier Science Publishers.**)**
- Meyers, S.A. "Sperm Physiology". In: Samper J.C., Equine breeding management and artificial insemination. (2009) 2ªEd:Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri USA (Cap.5, pp. 47- 56).
- Miller C.D. (2008). *Optimizing the use of frozen–thawed equine semen*. Equine Medical Center of Ocala, 7107 West Highway 326, Ocala, FL 34482, United States. Theriogenology 70 (2008) 463 – 468.
- Morrell J.M., Richter J., Martinsson G., Stuhtmann G., Hoogewijs M., Roels K., Dalin A.-M.(2014). *Pregnancy rates after artificial insemination with cooled stallion spermatozoa either with or without Single Layer Centrifugation.* Theriogenology 82 (2014) 1102 – 1105.
- Morel D., M.C.G. and O'Sullivan, J.A.M. (2001). *Ovulation rate and distribution in the thoroughbred mare, as determined by ultrasonic scanning: the effect of age*. Animal Reproduction Science 66, 59–70.

- Morel, M.D. *Equine Artificial Insemination***.** (1999). Cabi Publishing.. Welsh Institute of Rural Studies, University of Wales, UK. ISBN 0-85199-315-X
- Morel, M.D. Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management, (2003). 2ªEd. Oxon, UK: CABI Publishing, . ISBN 0-85199-643-4.
- Mouguelar H., Diaz T., Borghi D., Quinteros R., Bonino F., Andrea Apichela S. & Aguilar J.J. (2015). *Morphometric Study of the Mare Oviductal Mucosa at Different Reproductive Stages*. The Anatomical Record 298:1950–1959 (2015)
- Nagy P, Guillaume D, Daels P (2000) "*Seasonality in mares*" Animal Reproduction Science 60-61, 245-262
- Oliveira G.C., Oliveira B.M.M., Celeghini E.C.C., Fernandes C.B., Mattos C.B. (2013). *Cryopreservation of equine semen: a review*. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28.
- Papa F.O., Alvarenga M.A., Dell'Aqua Jr. J.A., Monteiro G.A., Sancler-Silva Y.F.R., Neto C.A. (2014). Manual de andrologia e manipulação de sémen equino. Edição: Botupharma. (cap.7, pp-28 – 40).
- Pycock J.F. (2007). Therapy for mares with uterine fluid. In: Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction.* (2º ed. section II, Chapter 14, pp. 93-104). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha, Maria Helena Tavares de Matos, Laritza Ferreira de Lima, Márcia Viviane Alves Saraiva1, Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves, Ana Paula Ribeiro Rodrigues, et al. (2011). *Melatonin and animal reproduction: implications on ovarian physiology.* In: Acta Veterinaria Brasilica (v.5, n.2, p.147-157)
- Ricketts S. & Troedsson M.H.T. (2007). Fertility expectations and management for optimal fertility. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). *Current therapy in equine reproduction.* (2º ed.). (section II. pp. 53-69). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Robalo Silva J.R.; Agrícola R.; Barbosa M. & Costa L.L. "Seasonal variation of testicular size, semen production and sexual behaviour of Lusitano stallions". (2007). RPCV, 102 (561-562) 119-125.
- Rocha A., Atayde L., Guimarães T., McDonnell S. (2008). Use of high temperature and penis manipulation in a stallion unresponsive to standard artificial vaginas: a Case Report. *Proceedings.* IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, pp: 123.

- Romano M.A., Mucciolo R.G. & Feliciano e Silva A.E.D. (1998). *Reproductive biology of the mare: oestrous cycle and ovulation time*. In: *Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo (v. 35, n. 1, p. 25-28, 1998).*
- Roser JF; "Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. (2008). *Animal Reproduction Science*, 107 (3-4):179 – 96.
- Roser J.F. "Reproductive Endocrinology of The Stallion". In: Samper J.C., Equine breeding management and artificial insemination. (2009) 2ªEd:Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri USA (Cap.2, pp. 17- 32).
- Rousset H., Chanteloube P., Magistrini M. & Palmer E. (1987) "Assessment of fertility and sémen evaluation of stallions". Journal of Reproduction and Fertility Supplement. 35: 25-31
- Samper, J.C. (2001). "Management and fertility of mares bred with frozen semen". Animal Reproduction Science 68 (3-4):219-28.
- Samper, J. C., Techniques for artificial insemination. (2007) In: Youngquist, R. S., Threlfall, W. R., *Current therapy in large animal theriogenology*. (Section 1, capther 5) 2nd ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007.
- Samper, J.C., Estrada A.J. & Mckinnon A.O. (2007). semen collection and evaluation.(section V, pp.253-288) In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. *Current therapy in equine reproduction.* (2º ed.). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Samper J.C., Equine breeding management and artificial insemination. 2ªEd:Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri USA (Cap.6 "Semen evaluation", pp. 57-75 & Cap.14 "Artificial Insemination with fresh and Cooled Semen", pp.165-174).
- Samper, J.C., Estrada A.J. & Mckinnon A.O. (2007). Insemination with frozen semen. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. *Current therapy in equine reproduction.* (2º ed., section V; pp. 285-288). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Samper, J.C. (1995). *Stallion semen cryopreservation: male factors affecting pregnancy rates*. Proceedings of the Society for Theriogenology. San Antonio Texas, pp. 160–165.
- Sharma, S., Morel, D., Dhaliwal G.S. and Dadarwal, D.(2010) *The Pattern of Embryonic Fixation and its Relationship to Pregnancy Loss in Thoroughbred Mares*. Reprod Dom Anim 45, e61–e67 (2010); doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01523.x. ISSN 0936-6768.

- Sieme H, Katila T, Klug E. (2004). "*Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions*", Theriogenology, 61 (4), 769 – 784.
- Sieme,H., Bonk, A., Hamann, H., Klug,E., Katila, T. (2004a). *Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history*. Theriogenology 62 (2004) 915–928.
- Sieme, H., Scha¨fer, T., Stout., T.A.E., E. Klug, E., Waberski, D. (2003). *The effects of different insemination regimes on fertility in mares*. Theriogenology 60 (2003) 1153–1164
- Squires E.L. Integration of future biotechnologies into the equine industry. (2005). *Animal Reproduction Science,* 2005 Oct;89(1-4):187-98.
- Tompson, F. N. (2004). Reprodução em Mamíferos do sexo feminino. In: William O. Reece. *DUKES – Fisiologia Dos Animais Domésticos*. (12ªedição, cap.39, pp.644 – 669).
- Torres, A.M.R. & Sánchez, A.G. (2008). *Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo: Revisión*. Técnica Pecuaria en México, 46(2), pp. 159-182.
- Traça, Ana Barbara B.A. Evolução Do Controlo Reprodutivo Equino Em Portugal e as Suas Repercussões Na Produtividade. (2010). Tese apresentada á faculdade de Medicina Veterinária Da Universidade Técnica De Lisboa para obtenção do grau Mestre, orientada pelo Doutor José Carlos Migueis Nunes Duarte.
- Trischner, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. Journal of Reproduction and Fertility Suppl, v. 27, p. 53-59, 1979.
- Valle, G.R., da Silva Filho, J.M., Nunes de Oliveira, H., Silveira Palhares, M., Avelar de Mello, M., Goloubeff, B..(1999). *Efeito da Idade sobre a Fertilidade de Éguas Inseminadas com Sêmen Diluído, Resfriado a 14ºC e Transportado*. Rev. bras. zootec., v.28, n.5, p.1031-1036, 1999.
- Vidament, M. (2005). *French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen*. Animal Reproduction Science 89 (2005) 115–136.
- Watson, E.D. and Nikolakopoulos, E. (1996) *Sperm longevity in the mare's uterus*. Journal of Equine Veterinary Science 16(9), 390–392.
- Warmutha V., Erikssona A., Bowerb M.A., Barkerb G, Barrettb E., Hanksc B.K., et al. (2012). *Reconstructing the origin and spread of horsedomestication in the Eurasian step.*

ANEXO 1

LUSO PECUS

Controlo Reprodutivo – 2016

Nome Da Égua: Proprietário: GARANHÃO:

Coudelaria: Contactos: Sémen:

Data/ hora	Ovario		Utero	Observações	Produtos	Notas
	Direito	Esquerdo				