



Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

REPRODUÇÃO EQUINA

Ana Isabel Teixeira Ferreira

Orientador – **Luís Miguel Paiva Benites da Silva Atayde**

Co-Orientador – **Mário José Ferreira Barbosa**

Porto 2009



Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

REPRODUÇÃO EQUINA

Ana Isabel Teixeira Ferreira

Orientador – **Luís Miguel Paiva Benites da Silva Atayde**

Co-Orientador – **Mário José Ferreira Barbosa**

Porto 2009

Resumo

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária que realizei, decorreu nas instalações da Fundação Alter Real (FAR), sede da Coudelaria Alter Real em Alter do Chão. Nas 16 semanas de estágio compreendidas entre Fevereiro e Junho de 2009, participei no acompanhamento reprodutivo das éguas da Fundação Alter Real, éguas do Posto Hípico, garanhões da Fundação Alter Real e garanhões externos à instituição.

A realização deste estágio foi de grande importância na minha evolução profissional além de me pôr a par da realidade prática no nosso país, complementando a formação adquirida ao longo dos passados cinco anos de Licenciatura com Mestrado Integrado.

Devido ao grande número de garanhões e éguas que são acompanhadas diariamente e às boas infraestruturas e equipamentos disponíveis, foi possível atingir o objectivo deste estágio, nomeadamente no que respeita ao aprofundar dos conhecimentos ao nível da clínica reprodutiva equina. Em termos práticos, este estágio foi realizado com éguas da Coudelaria Nacional e com aquelas que pertencem a particulares, e que foram para as instalações da FAR para serem acompanhadas reprodutivamente e beneficiadas. Ainda no que respeita às éguas, foi possível praticar inseminação artificial com sémen fresco e participar nos procedimentos envolvidos na manipulação de sémen refrigerado e congelado. Realizei também toda a componente prática no que respeita aos garanhões. A possibilidade de acompanhar o trabalho de um veterinário com grande experiência nesta área, Dr.Vítor Grácio, foi muito enriquecedora, pela contínua aprendizagem prática e teórica, assim como adquirir conhecimentos da experiência de um veterinário com longo palmarés na prática da reprodução equina, Dr.Mário Barbosa. Tive também oportunidade de acompanhar e cooperar em casos pontuais de clínica e cirurgia de equinos na Unidade Clínica da FAR.

Pretendo com este relatório, fazer a descrição das actividades realizadas durante o meu período de estágio na área de reprodução equina.

Agradecimentos

Ao meu Orientador, Professor Luís Atayde por todo o apoio, ajuda, trabalho e grande paciência que teve comigo desde o planeamento até à conclusão deste relatório.

Ao meu Co-orientador, Dr. Mário Barbosa pela simpatia e apoio durante o estágio.

Ao Dr. Vítor Grácio, sem o qual não teria sido possível a realização deste estágio, pela amizade, apoio e motivação nos momentos de maior desespero, pelo óptimo ambiente de trabalho que proporcionou, pela disponibilidade constante e espírito de entre-ajuda que criou no grupo de trabalho. Agradeço também pelas oportunidades únicas de me fazer ver que “sou capaz” e pelo carinho nunca ausente.

A todos os docentes de Medicina Veterinária do ICBAS que pelo seu profissionalismo e competência me permitiram uma aprendizagem de qualidade.

Ao meu namorado, não só pelo apoio, ajuda e carinho, mas acima de tudo pela coragem de se aguentar ao meu lado quando me tornava menos suportável. Agradeço-lhe também pela força e persistência que me transmitiu nos momentos mais difíceis.

À minha irmã, Virgínia Ferreira, pela amizade, carinho, paciência, ajuda incondicional e disponibilidade mesmo quando estava cheia de trabalho.

Aos amigos da quinta (que sabem quem são), por toda a ajuda desde sempre e por todo o carinho que até hoje não faltou. Em especial ao Doutor Martins da Silva, por tudo o que me ensinou especialmente no mundo dos cavalos e por ser uma pessoa com grande responsabilidade na conquista dos meus objectivos.

À família do Pedro, por todo o carinho e força.

Ao Dr. Manuel Torrealba pelo apoio, amizade e espírito crítico sempre presente, pelo que me ensinou e pelas oportunidades que me proporcionou até hoje.

À Cláudia pela amizade e boa disposição.

Aos meus colegas de estágio, por ordem cronológica de estágio, João Teixeira, Paulo, Márcia, Susana, Ana Margarida, João Fragoso, Pedro Paiva, João Marquilhas, Micaela Lucas e Teresa

Capitão pelo companheirismo, partilha de trabalho e momentos divertidos, foram sem dúvida bons tempos passados juntos.

A todas as pessoas que trabalham na FAR e que partilharam a sua simpatia durante todo o período do meu estágio.

Aos meus mafarricos (que também sabem quem são) e que sempre foram solução para aliviar os momentos de *stress*.

À minha querida avó pelo mimo e dedicação sempre presentes.

Aos meus pais, a quem dedico este trabalho, pelo carinho, força, amizade e acima de tudo pelo grande esforço que fizeram para a realização deste curso, e assim tornar real o meu sonho. São sem dúvida eles que merecem o maior agradecimento, MUITO OBRIGADA.

Abreviaturas

CL – Corpo Lúteo

°C – graus centígrados

erLH – Hormona Luteinizante recombinante equina

FAR - Fundação Alter Real

FSH - Hormona Folículo-Estimulante

GnRH - Hormona Libertadora de Gonadotrofinas

IA - Inseminação Artificial

i.m. - administração intra-muscular

i.v. - administração intra-venosa

Kg - Kilograma

LH - Hormona Luteinizante

MHz - MegaHertz

µg - micrograma

mg - miligrama

mL – mililitro

PGF_{2α} - Prostaglandina-F-2-alfa

PSA – Puro Sangue Árabe

PSI – Puro Sangue Inglês

PSL - Puro Sangue Lusitano

SF - Sela Francês

spz - espermatozóides

UI – Unidades Internacionais

Índice Geral

Resumo	iii
Agradecimentos.....	iv
Abreviaturas.....	vi
Índice Geral.....	vii
Introdução	1
1. ÉGUA	1
1.1.Revisão Bibliográfica	1
1.2.Materiais e Métodos	9
1.3.Resultados.....	12
1.4.Discussão	13
2.GARANHÃO	14
2.1.Revisão Bibliográfica	14
2.2.Composição do sémen.....	16
2.3.Avaliação do sémen	17
2.3.1.Volume	18
2.3.2.Motilidade	19
2.3.3.Concentração.....	20
2.4.Materiais e Métodos	23
2.5.Resultados.....	26
2.6.Discussão	28
Conclusões gerais.....	30
Bibliografia	31

Introdução

Hoje em dia, a inseminação artificial (IA) é uma técnica frequentemente usada na reprodução equina, nomeadamente quando a cada garanhão é atribuído um grande número de éguas, como são exemplo, as coudelarias.

Este trabalho é assim dividido em duas partes. A primeira diz respeito à égua onde é realizado um estudo sobre a resposta ao tratamento com a hormona Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) para indução da luteólise e antecipação do cio. Uma vez que a maioria das éguas com que trabalhei foi beneficiada recorrendo à IA, o diâmetro do folículo pré-ovulatório foi um dado útil para a previsão da ovulação e possível indução da mesma, e por isso foi também objecto de estudo neste relatório. A indução da ovulação foi um tratamento frequentemente utilizado no manejo reprodutivo das éguas durante o estágio e por essa razão é também aqui realizado um estudo da resposta à administração da hormona Coriónica Gonadotrófica humana (hCG) como indutora da ovulação.

A segunda parte faz referência ao garanhão, salientando-se algumas características do sémen avaliadas por rotina (volume, motilidade e concentração), uma vez que estas são indicadores da capacidade reprodutiva do garanhão, e compara-se o primeiro ejaculado da época reprodutiva com os restantes, pois aquele é muitas vezes eliminado, sem sequer ser considerado para se utilizar na Inseminação. Faz-se também referência à percentagem de diagnósticos de gestação positivos, associada aos vários valores de motilidade progressiva, uma vez que este é, dos parâmetros normalmente avaliados, o mais correlacionado com a fertilidade.

1. ÉGUA

1.1.Revisão Bibliográfica

A sazonalidade sexual da égua e a consequente limitação de tempo para se obter uma égua em gestação em cada época reprodutiva, leva à necessidade de adoptar determinadas práticas a nível do manejo reprodutivo para que, no final dessa época, o número de éguas gestantes seja o maior possível. Devido à longa duração do estro nas éguas e a imprevisibilidade do dia da ovulação, é de grande utilidade recorrer a métodos que prevejam a ovulação, com o objectivo de realizar o menor número de inseminações possível (Ivkov *et al.* 1999), além das limitações implícitas na inseminação com sémen refrigerado como exemplo, em que é necessário um tempo prévio para que seja realizada a recolha (Brinsko *et al.* 2000) e

envio do sémen para o local onde se encontra a égua. A detecção do cio permite identificar a fase do ciclo éstrico da égua, o acompanhamento ecográfico traduz a dinâmica ovárica, e a partir dessas informações pode-se manipular o ciclo éstrico através de tratamentos hormonais.

As éguas são animais poliéstricos sazonais, existindo uma altura do ano em que a maioria das fêmeas não apresenta actividade reprodutiva (anestro). A fase de actividade reprodutiva, em que ocorrem ciclos regulares e repetidos situa-se nos meses de Primavera, Verão e Outono. A passagem da fase de anestro para a fase de actividade reprodutiva denomina-se transição de Primavera, e nessa altura são evidentes alterações ecográficas como ausência de corpo lúteo (CL) e a presença de vários folículos com ritmo de crescimento lento. A detecção da presença de folículos maiores que 25 mm por mais que 10 dias sem que ocorra ovulação indica que a égua está no período de transição (Ginther 1990). Além disso, segundo Ginther (1990), durante a época de transição, os folículos estão em constante crescimento e regressão, sem que se dê a ovulação. O anestro termina quando ocorre a primeira ovulação do ano (Atayde 2008). Em latitudes idênticas, Affleck *et al.* (1991) e Atayde (2008) verificaram que o início da época reprodutiva ocorre nos primeiros dias de Abril.

O ciclo éstrico é um interrelacionamento sincronizado entre eventos comportamentais, anatómicos e endócrinos que resultam na ovulação (LeBlanc *et al.* 2003). Cada ciclo éstrico pode ser dividido em fase lútea (diestro), em que predomina o corpo lúteo, e em fase folicular (estro), em que predominam os folículos em desenvolvimento. Nesta última, ocorre desenvolvimento folicular nos ovários que culmina na ovulação do oócito do folículo dominante e conseqüentemente forma-se o Corpo Hemorrágico e posteriormente o CL. A ovulação geralmente ocorre 24 – 48 horas antes do final do estro, e corresponde no ciclo, ao dia zero (Morel 2003).

O estro tem a duração média de 5-7 dias, mas pode variar bastante entre éguas (Samper 2008). A presença do garanhão é o melhor meio para detectar o cio (LeBlanc *et al.* 2003), e a maioria das éguas, além de permanecer voluntariamente junto do garanhão (LeBlanc *et al.* 2003) permite a aproximação e cobertura (Samper 2008). Nesta fase, os comportamentos da égua perante o garanhão incluem a elevação da cauda e adopção de posição de urinar mantida por longo período de tempo e sem evidência de esforço, movimentos repetidos de eversão dos lábios vulvares com eversão do clítoris, agachamento e frequente eliminação de urina (normalmente com um odor característico e aparência amarela opaca) (LeBlanc *et al.* 2003). Anatomicamente, na fase de estro, a égua apresenta relaxamento do útero e cérvix, presença de um folículo de grande dimensão (dominante) e edema endometrial (Samper 2008).

O diestro dura em média aproximadamente 15 dias (Samper 2008), e durante esse período, na presença do garanhão, a égua baixa as orelhas, mostra os dentes e morde,

escouceia e afasta-se do garanhão (LeBlanc 2003). A nível ovárico está presente o CL, o cérvix apresenta-se tonificado e não se verifica edema endometrial (Samper 2008).

O controlo endócrino do ciclo éstrico deve-se ao eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal que é por sua vez controlado principalmente pelo fotoperíodo, além da importante influência nutricional, da temperatura, ambiente, condição corporal, idade e raça da égua. A duração do período de luminosidade dos dias influencia inversamente a produção da hormona melatonina que controla a actividade do eixo hipotalâmico – hipofisário – gonadal. A melatonina tem um efeito inibidor na produção da Hormona Libertadora de Gonadotrofina (GnRH), estimuladora da produção de duas hormonas que actuam a nível dos ovários - hormona luteinizante (LH) e hormona folículo-estimulante (FSH) (Morel, 2003).

A FSH é a hormona responsável pelo desenvolvimento dos folículos. A sua libertação é bifásica, tendo níveis mais elevados nos dias 9-12 e na altura da ovulação. O pico próximo da ovulação ocorre dois dias antes desta, quando o nível de estradiol produzido pelo folículo dominante diminui (Ginther *et al.* 2008), o que permite completar o desenvolvimento final do folículo pré-ovulatório e iniciar o desenvolvimento de novos folículos (Morel 2003). O declínio dos níveis de FSH ocorre com o aumento da hormona inibina, produzida pelos folículos maiores que 13mm (Ginther 1990).

Além dos efeitos a nível do controlo hormonal, os estrogénios são responsáveis por alterações anatómicas como o edema uterino e relaxamento do cérvix (Samper 1997) e comportamentais, no que respeita à receptividade sexual que a égua apresenta (Morel 2003).

No estro, a concentração de LH aumenta até atingir o pico dois dias depois da ovulação (LeBlanc *et al.* 2003). Como resultado da ovulação, forma-se o CL produtor de progesterona e que tem efeito inibitório na libertação de LH (Morel 2003). Os níveis de progesterona aumentam em 24 – 48 horas no período pós ovulação (Morel 2003) e mantêm-se durante 14 – 15 dias do ciclo éstrico (LeBlanc *et al.* 2003). Se a égua não estiver gestante, por volta do 15^o – 16^o dia ocorre uma diminuição da concentração de progesterona, permanecendo em níveis basais durante o estro. Segundo Handler *et al.* (2004), esse declínio deve-se à secreção de PGF_{2α} a partir do endométrio entre os dias 13 e 16 pós ovulação, que induz a regressão do CL. A secreção de PGF_{2α} precede a diminuição da concentração plasmática de progesterona em 3 ou 4 horas (Handler *et al.* 2004).

Pelo facto de a progesterona atingir níveis basais durante o estro, o seu efeito inibitório sobre a secreção de gonadotrofinas deixa de ocorrer, e assim é iniciado todo o processo hormonal responsável pelo estro e ovulação (Morel 2003).

De um modo geral, uma égua que se encontre a ciclar, entra em cio por volta do dia 15-16 do ciclo éstrico quando a prostaglandina-F_{2α} (PGF_{2α}) é produzida pelo endométrio e induz a luteólise. Aproximadamente ao 5^o dia de cio ocorre a ovulação que resulta na formação de um

corpo lúteo que só responde à $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógena quando está maduro, em média 5 dias depois da ovulação. (Morel 2003; England 2005).

A manipulação do ciclo éstrico é uma prática útil e comum no manejo reprodutivo das éguas. O uso clínico de hormonas para esse fim deve-se em grande parte à cobertura ou inseminações com sémen fresco, refrigerado ou congelado em tempo marcado (McCue 2007). Os dois procedimentos mais comuns no manejo reprodutivo das éguas, envolvem a indução da luteólise e a indução da ovulação (Samper 2008).

Numa égua normal a ciclar, o estro é induzido com a administração de uma injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que põe fim à fase lútea (Samper 2008) quando está presente um CL maduro. Assim sendo, a prostaglandina natural e os seus análogos sintéticos têm sido usados efectivamente para esse fim (Alcántara *et al.* 2005).

Além de ser útil por permitir encurtar o ciclo éstrico (Smith 2007), a $\text{PGF}_{2\alpha}$ também se aplica no tratamento de diestros prolongados causados por um CL persistente (Alcántara *et al.* 2005), sincronização de cio, indução de contracções uterinas para evacuação de fluídos uterinos e indução de aborto (Squires 2008).

O CL da égua é sensível às prostaglandinas por volta do sexto dia depois da ovulação, no entanto há muitas éguas que respondem mais cedo (Smith 2007). Squires (2008) refere que a melhor resposta à administração desta hormona ocorre quando esta é feita 5 a 10 dias após a ovulação. Além disso, o intervalo para o estro e ovulação depende do tamanho do folículo maior quando se administra a prostaglandina. Éguas com folículos maiores que 30mm nesse momento, regressam ao cio rapidamente e ovulam mais cedo no novo ciclo (Squires 2008). Segundo Samper (2008), numa égua em diestro tratada com $\text{PGF}_{2\alpha}$ natural ou um análogo, em média, o intervalo entre o tratamento e o início de cio é de 3 a 4 dias enquanto que a ovulação ocorre 8 a 10 dias depois desse mesmo tratamento, já Alcántara *et al.* (2005) afirmam que os sinais de cio surgem geralmente ao quinto dia após tratamento. No entanto, o intervalo desde a administração até ao início do cio e posterior ovulação pode variar consideravelmente e é importante verificar o estado dos ovários antes da administração (Smith 2007; England 2005). O tamanho do folículo quando se administra $\text{PGF}_{2\alpha}$ é muito importante para determinar esse intervalo. Folículos menores que 25mm normalmente regridem e um novo folículo irá emergir e crescer, até se dar a ovulação em geralmente 7 a 10 dias. Em éguas que têm um folículo maior que 25mm, espera-se que demonstrem sinais de estro mais cedo, depois da administração, e ovulam em 3 a 5 dias. Por outro lado, éguas com folículos muito grandes (35 – 50mm) ovulam rapidamente depois da administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, muitas vezes sem mostrarem sinais de cio (Smith 2007). England (2005) refere ainda que se a administração da prostaglandina luteolítica for feita durante o Verão, a ovulação ocorre 4-6 dias depois da injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, e se for feito no final da época, a ovulação pode ocorrer mais que 10 dias depois da administração.

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ não actua apenas no CL do ovário, mas tem efeitos em órgãos com os mesmos receptores. Consequentemente, pode causar contracção da musculatura lisa do tracto gastrointestinal, respiratório e útero, causando reacções clínicas ou efeitos laterais (Alcántara *et al.* 2005). Sabe-se que esta hormona pode causar aumento da frequência cardíaca e respiratória e por isso causar impaciência ao animal, de forma semelhante à síndrome abdominal aguda, e provocar também sudação profusa no pescoço, peito e abdómen. Esta condição pode levar à descoordenação motora e os movimentos intestinais podem resultar em diarreia aquosa e dor abdominal, no entanto todos estes sinais são de curta duração e transitórios (Alcántara *et al.* 2005).

Os análogos sintéticos da $\text{PGF}_{2\alpha}$, tal como a $\text{PGF}_{2\alpha}$ natural têm o mesmo efeito luteolítico e muitas vezes em menor dose que a hormona natural, além disso, tem-se mostrado que os efeitos laterais deles são mínimos (Alcántara *et al.* 2005).

Está descrito que a dose mínima, efectiva nas éguas, aplicada 5 dias após a ovulação é de $9\mu\text{g kg}^{-1}$ e que a aplicação da dose *standard* ($12\mu\text{g kg}^{-1}$) causa efeitos laterais (Handler *et al.* 2004). Num estudo realizado por Handler *et al.* (2004) com pôneis em que administraram doses de $8\mu\text{g kg}^{-1}$, $4\mu\text{g kg}^{-1}$ e $2\mu\text{g kg}^{-1}$ de Dinoprost, obtiveram efeito luteolítico em todas elas.

Handler *et al.* (2004) refere que uma dose única muito baixa de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1\mu\text{g kg}^{-1}$) não é efectiva, mas duas doses com intervalo entre elas de 24 horas causam luteólise na égua. Smith (2007) obteve o efeito pretendido de lise do CL, quando administrou Dinoprost ou Cloprostenol nas doses de 5mg ou 250 μg por égua, respectivamente. No entanto afirma que trabalho recente mostra que muito menores dosagens podem ser usadas com a mesma eficácia, o que é apoiado por Ginther *et al.* (2009) num estudo com a administração de Dinoprost i.v. na dose 2,5mg por égua.

Uma vez tendo a égua em estro, quer naturalmente, quer por indução hormonal, é importante prever o momento da ovulação. As principais vantagens da previsão da ovulação incluem: um pedido de sêmen por ciclo para garanhões muito requisitados; planejar o transporte da égua, no caso da cobertura ser no local onde está o garanhão, menor número de cobrições e redução de contaminação uterina (especialmente em éguas com baixa *clearance* uterina ou alta susceptibilidade a infecções uterinas); realizar inseminações próximas da ovulação, para sêmen refrigerado ou congelado e para garanhões com baixa fertilidade (Samper 2008). Permite também assegurar intervalos entre cobrições adequados para os garanhões, a sincronização entre dadora e receptoras nos planos de transferência de embriões e reduzir o trabalho e custos veterinários (Samper 2008). Não só quando se pratica a cobertura natural, mas principalmente na IA, a determinação do momento da ovulação é um factor crítico na tentativa de se obter a máxima taxa de gestação (Samper 1997).

A longevidade do oócito de cerca de 18 horas (Loomis & Squires 2005) é muito curta quando comparada com a longevidade dos espermatozoides no tracto reprodutivo da égua, que pode ir de 24 horas até 7 dias (Morel 1999; Pycock 2008). No entanto, quando se trata de sémen congelado, a sua longevidade no tracto reprodutivo da égua está reduzida (Samper 2001; Troedsson *et al.*, 1998; Pycock 2008).

Para as taxas de gestação serem maximizadas, quando se utiliza sémen fresco, a inseminação deve ser realizada nas 48 horas que precedem a ovulação. Quando se pratica IA com sémen refrigerado, esta deve ser realizada nas 12-24 horas antes da ovulação, e no caso de ser sémen de garanhões subférteis (Samper 1997) ou sémen congelado, a máxima fertilidade pode ser conseguida se a inseminação for feita nas 12 horas que antecedem a ovulação e até 6 horas depois da ovulação (Samper 2008).

A determinação do momento da ovulação pode ser apoiada pela detecção de cio, pela consistência e tamanho do folículo pré-ovulatório através da palpação rectal, e pela aparência do folículo e edema uterino a nível ecográfico (Samper 1997; England 2005). Um distinto amolecimento do folículo ocorre cerca de 24 horas antes da ovulação, e com ligeira pressão pela sonda do ecógrafo, apresenta-se aplanado. O aparecimento de edema uterino durante os primeiros dias de estro (Samper 2008) e o seu desaparecimento que ocorre cerca de 24 horas antes da ovulação (England 2005) são fenómenos progressivos na maioria das éguas (Samper 2008). Após o pico de estrogénios e com o aproximar da ovulação, a intensidade do edema começa a diminuir (Samper 1997), até ser inexistente na presença de progesterona (Samper 1997).

Durante o estro, na ecografia do ovário encontram-se folículos em crescimento e a ausência do corpo lúteo. O folículo dominante cresce até ao diâmetro pré-ovulatório, variando este diâmetro ao longo da época reprodutiva, sendo maior no início da época (Abril a Junho), atingindo as menores dimensões no mês de Agosto, aumentando de novo, mas sem atingir os diâmetros iniciais, à medida que a época reprodutiva se aproxima do fim. O diâmetro do folículo pré-ovulatório também pode variar consoante a idade da égua – maior nas mais velhas – a raça – pequenas variações, sendo ligeiramente menor nas raças menores – e com a ocorrência de ovulação dupla – menor quando presente (Atayde 2008).

Pierson & Ginther (1985) concluíram que o folículo pré-ovulatório cresce em média até 45,2mm com uma taxa de crescimento diário de 2,7mm, já Ivkov *et al.* (1999) verificaram que a dimensão média atingida pelo folículo pré-ovulatório um dia antes da ovulação é de 41,75mm (± 4.72 mm).

A ovulação pode ocorrer nas éguas a partir de folículos pré-ovulatórios com diâmetro entre 34 e 70mm (Cuervo-Arango & Newcombe 2008). Por outro lado, Samper (1997) afirma que muitas éguas ovulam de folículos entre 40 e 45mm de diâmetro, 24-48 horas antes do fim do

cio. O diâmetro folicular é utilizado para estimar a altura em que a égua vai ovular, e grande parte ovula quando as dimensões estão entre os 40 e 45mm, no entanto, muitas éguas ovulam fora destes limites e pode-se perder um ciclo se se considerar apenas este intervalo (Cuervo-Arango & Newcombe 2008). Por isso, além de ter em conta o diâmetro do folículo pré-ovulatório, podem-se considerar outras alterações características com o aproximar da ovulação: aumento do tamanho, alteração da forma, diminuição da pressão interna do folículo e separação das camadas da parede folicular (Bragg *et al.* 2001) além da ausência de tonicidade do cérvix e das alterações uterinas já referidas. Num estudo realizado por Bragg *et al.* (2001) em que se administrou hCG (indutora da ovulação) em éguas, quando o folículo dominante apresentava mais que 35 mm de diâmetro e se avaliaram as alterações no folículo pré-ovulatório, concluiu-se que esta hormona acelera a maturação folicular e cria alterações de pressão e histomorfológicas como a separação, na parede folicular. Um aumento nos vasos sanguíneos, edema, hemorragia e hiperémia foram também detectados no mesmo estudo, entre as camadas de células da teca e granulosa nessas éguas, surgindo irregularidades na camada granulosa (Gastal *et al.* 2006). Além destas evidências, está descrito que as éguas tendem a ovular com folículos de diâmetros semelhantes em dois ciclos consecutivos, se não for feito nenhum tratamento para a sua indução (Cuervo-Arango & Newcombe 2008). Ginther *et al.* (2008) referem também que há repetibilidade em muitos aspectos do ciclo, população folicular e concentrações de gonadotrofinas entre ciclos éstricos.

A indução da ovulação é um procedimento essencial nos programas de IA, permite otimizar o uso do sémen e reduzir o número de inseminações (Carluccio *et al.* 2006).

A ovulação pode ser induzida pela hCG, pela GnRH (um análogo – Deslorelina) ou pela LH recombinante equina (erLH). Qualquer um destes agentes tem o máximo efeito quando administrado em éguas com edema endometrial, cérvix relaxado e um folículo com 35 mm ou mais (Samper 2008).

A hCG é uma hormona proteica com actividade de LH (Samper 2008) e provoca maturação e ovulação do folículo dominante (McCue *et al.* 2007).

O tratamento convencional com hCG resulta num aumento de LH em 24 horas, e que é semelhante ao aumento que ocorre nas ovulações espontâneas (Ginther *et al.* 2008).

Segundo Samper (2008), a ovulação ocorre aproximadamente 36 horas após o tratamento com hCG, mas a sua eficácia é afectada pela fase do ciclo éstrico, o tamanho e maturidade folicular.

A hCG na dose de 1500-3000 UI administrada por via intravenosa (i.v.) (LeBlanc 2006) ou intramuscular (i.m.) (Samper 2008) induz a ovulação em 24 a 48 horas em éguas com folículo maior que 35mm de diâmetro (Ginther *et al.* 2008; LeBlanc 2006, Pycock 2008). Brinsko *et al.* (2000) afirmam que após a indução da ovulação com 1500 UI ou 3000 UI por via i.m. ou i.v.

quando o folículo dominante pré-ovulatório apresenta mais que 35 mm, resulta na ovulação em 36 – 48 horas.

Gastal *et al.* (2006) refere um estudo que concluiu que a administração de uma dose de 1500UI ou 2500UI nas mesmas circunstâncias induz a cessação do crescimento folicular e assim, reduz o diâmetro do folículo pré-ovulatório nas éguas tratadas.

O tempo desde a administração da hCG até à ovulação parece ser influenciada pela estação do ano, pois maior número de éguas ovula em 12-24 horas quando a administração é feita entre Maio e Julho do que entre Fevereiro e Abril (LeBlanc 2006). Por outro lado, mais que 3 administrações na época reprodutiva estão associadas a uma quebra na resposta (não ovulam em 48 horas) (LeBlanc 2006), no entanto, esta informação é contrariada por um estudo onde se fez a administração de hCG em 3 ciclos na época reprodutiva e se concluiu que não há alteração na eficácia da hormona (Gastal *et al.* 2006). Quando se fazem múltiplas administrações de hCG na época reprodutiva, está descrito o estímulo ao desenvolvimento de anticorpos que podem reduzir a eficácia desta hormona (Gastal *et al.* 2006). A produção de anticorpos contra a hCG, está também associada à sua administração por via intramuscular (Smith 2007). A éguas com idade avançada (mais que 16 anos), está associada uma distribuição da ovulação mais ampla relativamente a éguas mais jovens, e também uma diminuição da eficácia da ovulação induzida desta forma (LeBlanc 2006).

A dose de hCG administrada também influencia o tempo que medeia desde a sua administração até à ovulação, sendo este em média menor quando se administra 2500UI ou 1500UI comparativamente com 500UI (Gastal *et al.* 2006). Apesar desta última dose não ser adequada para induzir uma alta taxa de ovulação em 24-48 horas, reduz o tempo para a ovulação quando comparado com éguas sem tratamento (Gastal *et al.* 2006).

Um problema que surge quando se faz inseminação artificial com sémen refrigerado, é o dia em que deve ser feito o pedido deste. Há muitos ganhões que não estão disponíveis diariamente para as recolhas de sémen, e o veterinário deve estar informado acerca dos dias em que o poderá receber. Além disso, a monitorização da dinâmica folicular a partir do momento em que a égua inicia o estro é essencial, para que o sémen seja pedido no momento certo (Brinsko *et al.* 2000). Tendo em conta que a inseminação com sémen refrigerado deve ser realizada dentro das 12-24 horas (Samper 2008) que precedem a ovulação é boa prática que o sémen seja pedido quando a égua está em cio e apresenta um folículo de 30 a 35mm no ovário. O tempo que medeia entre o pedido e a recepção do sémen é geralmente de cerca de 24 horas (tempo necessário para o transporte rápido do sémen), por isso, é importante que esse mesmo pedido seja feito pelo menos 48 horas antes do momento previsto para a ovulação. O uso de agentes indutores da ovulação potencia a sincronia entre a inseminação e a ovulação (Brinsko *et al.* 2000). Assim sendo, quando o folículo dominante atinge 35mm de

diâmetro, a maioria das éguas ovula de 36 a 48 horas após administração de hCG, quer na dose 1500 UI ou 3000UI por via i.v. ou i.m. (Brinsko *et al.* 2000). Por essa razão, se não há dúvida que o sémen é recebido no dia seguinte, nesse momento pode ser feita a indução da ovulação. No caso de não haver certeza da recepção do sémen, é preferível não induzir a ovulação e evitar assim que esta ocorra a ovulação antes da chegada do sémen (Brinsko *et al.* 2000).

Os objectivos propostos para este trabalho são a determinação do tempo de resposta à PGF_{2α} e à hCG, em que nesta última se compara a resposta a duas doses administradas, bem como o diâmetro do folículo maior no dia anterior à ovulação nas éguas que acompanhei durante o período do meu estágio.

1.2. Materiais e Métodos

Para este estudo foram utilizadas 55 éguas de raça Puro Sangue Lusitana (PSL) (n=47), Puro Sangue Árabe (PSA) (n=4) e Cruzadas Portuguesas (n=4). As idades destas estavam compreendidas entre os 4 e os 19 anos. Todas elas estavam alojadas na FAR durante o maneio reprodutivo até à ovulação e todas eram alimentadas com o mesmo tipo de ração duas vezes por dia, palha e água *ad libitum*.

Depois da detecção de cios, eram feitas palpações rectais e posterior controlo ecográfico, de modo a verificar a fase do ciclo éstrico em que se encontravam. Para a detecção do cio, recorria-se ao uso do “rufião” (Fig.1), um garanhão da coudelaria previamente seleccionado para o efeito. Cada égua permanecia na respectiva boxe e era permitido ao garanhão aproximar-se desta através da janela e assim ser detectado e registado o interesse ou desinteresse da égua em relação ao cavalo. Considerava-se uma égua em cio, quando esta se apresentava fortemente interessada no garanhão, com eversão vulvar e exteriorização do clítoris, urinava, elevava a cauda e baixava a garupa (Fig.2,3,4). Pelo contrário, uma égua com comportamento agressivo perante o garanhão, que atacava, colocava as orelhas para trás, mordida, dava coices e mãozadas, considerava-se fora de cio.



Fig 1. Utilização do garanhão na detecção do cio



Fig 2. Abaixamento da garupa

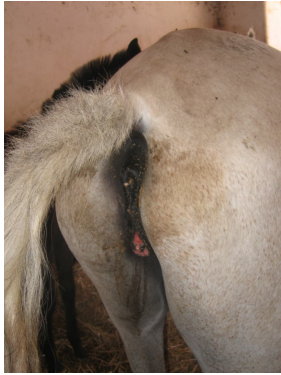


Fig 3. Elevação da cauda, eversão vulvar e exteriorização do clítoris



Fig 4. Elevação da cauda, abaixamento da garupa, eversão vulvar e exteriorização do clítoris

Era feita uma palpação, via rectal, sistemática (Fig. 5) que iniciava no útero onde era avaliada a posição e tonicidade, percorria-se cada corno uterino individualmente e respectivo ovário e aferia-se a sua posição, tamanho, forma, consistência, mobilidade e sensibilidade. Por rotina ecografavam-se (ecógrafo Esaote PieMedical® Aquila, Servive, com sonda de 6.0MHz) (Fig. 6) éguas recém-chegadas e éguas com desenvolvimento folicular, até à ovulação. Mediasse e registava-se o diâmetro folicular, sendo considerado o maior valor obtido em várias medições.



Fig 5. Palpação rectal



Fig 6. Controlo ecográfico

Quando o diâmetro folicular era igual ou superior a 35mm (Fig. 7), era feita a administração de hCG (Chorulon® 1500 - 3000 U.I., i.v. ou i.m., Intervet) para induzir a ovulação, tendo sido o diâmetro folicular médio no momento da administração de 43.15mm (± 3.15 mm), o menor diâmetro de 36.20mm e o maior de 50.60mm. A administração de hCG era acompanhada da IA com sémen fresco, e o controlo ecográfico realizava-se nos dias seguintes até se verificar ovulação. Caso não houvesse detecção do CL nas 48 horas pós inseminação com sémen fresco, era efectuada uma nova IA. Em 4 casos nos quais se utilizou sémen congelado, a

administração de hCG era realizada nas mesmas condições, embora a IA fosse feita apenas após detecção do CL.

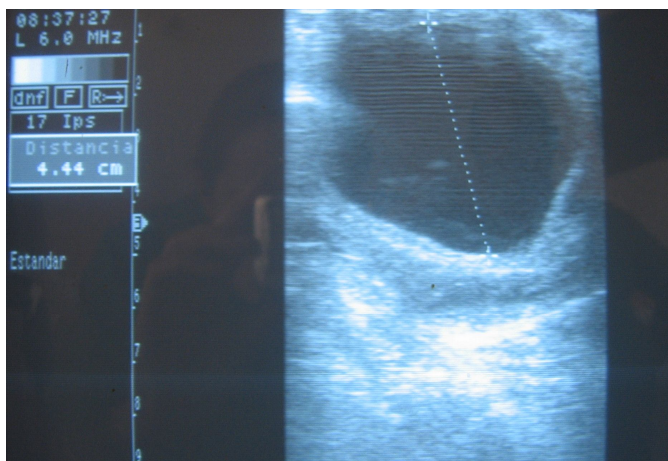


Fig 7. Ecografia de um folículo com diâmetro superior a 35mm

Às éguas em diestro, 5 dias após ter surgido o CL, ou quando na ausência de história existia um ou mais CL nos ovários, administrava-se $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Dinolytic[®] 1,5 mL, i.m. (7,5mg/égua), Pfizer) (Fig. 8 e 9) e o controlo ecográfico iniciava-se dos 3 dias pós-administração em diante. Era feito o registo da presença do CL na respectiva data. Era observada a presença ou ausência de efeitos laterais nas éguas após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, apenas por precaução.



Fig 8. Dinolytic[®] (Pfizer)



Fig 9. Administração intramuscular de Dinolytic[®] (7,5mg/égua)

Para analisar os dados a partir dos registos obtidos, calculou-se: (1) a média, desvio padrão, mínimo e máximo do número de dias desde a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ até se detectar o início do cio, e calculou-se os mesmos parâmetros para o número de dias desde a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ até se detectar a ovulação por ecografia; (2) a média, desvio padrão,

mínimo e máximo dos valores do diâmetro do folículo pré-ovulatório, sendo o valor do diâmetro do folículo pré-ovulatório considerado, aquele que foi verificado por ecografia um dia antes do aparecimento do CL; (3) a média, desvio padrão, mínimo e máximo para o número de dias desde a administração de hCG até à ovulação. Os dados referentes ao número de dias desde a administração de hCG até à ovulação para as duas doses de hCG utilizadas – 1500 e 3000UI - foram analisados no programa estatístico SPSS 15.0 for Windows (2006), e tendo-se verificado que os dados não apresentavam distribuição normal, recorreu-se ao teste não paramétrico Kolmogorov – Smirnov. Este teste foi utilizado para avaliar as diferenças no número de dias desde a administração de hCG até à ovulação, entre cada dose desta hormona.

Para o número de dias desde a administração de PGF_{2α} até se detectar o início do cio, foram utilizados dados de 5 éguas; para o número de dias desde a administração de PGF_{2α} até se detectar a ovulação por ecografia, dados de 21 éguas; para o diâmetro do folículo pré-ovulatório um dia antes da detecção do CL, dados de 36 éguas, para os valores do diâmetro do folículo maior no dia da administração de hCG e o número de dias desde a administração de hCG até à ovulação, foram utilizados dados de 24 éguas, para o número de dias desde a administração de 1500UI e 3000UI de hCG até à ovulação dados de 8 e de 18 éguas respectivamente.

1.3.Resultados

No estudo realizado, o valor médio do diâmetro do folículo pré-ovulatório 24 horas antes de se detectar a ovulação foi de 45.22mm (\pm 4.48mm), variando de 29.50mm até 52.10mm. A média do número de dias desde a administração de PGF_{2α} até ao início de cio foi de 5.67 dias (\pm 1.36 dias), variando de 4 dias a 8 dias, a média do número de dias desde a administração de PGF_{2α} até à ovulação foi de 9.50 dias (\pm 2.21 dias) variando de 5 dias a 13 dias. Obteve-se um valor médio de 2.11 dias (\pm 0.51 dias) desde a administração de hCG até à ovulação, variando entre 1 e 3 dias. O número de dias médio desde a administração de 1500UI de hCG até à ovulação foi de 2.25 (\pm 0.71 dias) variando de 1 a 3 dias, e o número médio de dias desde a administração de 3000UI de hCG até à ovulação foi de 2.05 (\pm 0.4 dias) variando de 1 a 3 dias. Não se observou diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) no número de dias desde a administração de hCG até à ovulação, entre as duas doses administradas. Verificou-se sudação pós administração de PGF_{2α} na maioria das éguas, e num caso descoordenação motora, no entanto, todas as observações foram situações transitórias.

1.4. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com a maioria dos dados descritos na bibliografia. Relativamente ao número de dias desde a administração de PGF_{2α} até ao início do cio, o valor obtido está ligeiramente acima do intervalo descrito por Samper (2008) de 3-4 dias, e aproxima-se do que foi referido por Alcántara *et al.* (2005), por volta do 5º dia após administração da hormona. Já no que respeita ao número de dias desde a administração de PGF_{2α} até à ovulação, o resultado coincide com aquele que Samper (2008) concluiu, entre os 8 e 10 dias, no entanto, é bastante superior aos 4-6 dias verificados por Alcántara *et al.* (2005).

Estando descrito que na dose de 12µg por égua, (que corresponde a cerca de 6mg para uma égua de 500Kg) ocorrem efeitos laterais (Handler *et al.* 2004), com a administração de 7.5mg por égua, seria de esperar que esses efeitos se verificassem nas éguas deste estudo tal como aconteceu, tendo a maioria apresentado sudação após a administração e num dos casos, descoordenação motora.

O diâmetro do folículo pré-ovulatório coincide com o valor referido por Pierson & Ginther (1985) e é ligeiramente superior ao obtido por Ivkov *et al.* (1999), de 41.75mm (± 4.72mm). No entanto, encontra-se dentro dos valores referidos por Cuervo-Arango & Newcombe (2008) – 34 a 70mm. 12 das 40 observações encontram-se dentro dos limites referidos por Samper (1997) de 40-45mm. Em 31 das 40 observações, verificou-se que o diâmetro do folículo pré-ovulatório se encontra entre 40 e 50mm, sendo portanto este intervalo o que compreende maior número de observações. O menor valor do diâmetro do folículo pré-ovulatório foi verificado numa égua de 7 anos de idade, por outro lado, o maior folículo pré-ovulatório foi encontrado numa égua de 17 anos, o que está de acordo com o que é referido por Atayde (2008), a égua mais velha apresenta um folículo pré-ovulatório maior que o da mais nova.

Embora a administração de hCG nas éguas estudadas, tenha sido realizada quando o diâmetro do folículo se encontrava dentro dos valores descritos e nas doses referidas na bibliografia para que a ovulação ocorresse em 24-48 horas pós indução da ovulação, verificou-se que em média a ovulação ocorreu ligeiramente mais tarde que o previsto, no entanto, em 20 das 27 observações detectou-se a ovulação 48 horas pós indução. Este resultado ligeiramente superior ao descrito na bibliografia, pode dever-se ao facto da administração de hCG ter sido feita com base maioritariamente no diâmetro do folículo maior. Como refere Samper (2008), o efeito da hCG é máximo quando o diâmetro do folículo é maior ou igual a 35mm, mas também tem em conta o edema uterino e o relaxamento do cérvix, além das alterações a nível do próprio folículo (Gastal *et al.* 2006) com o aproximar da ovulação. Estas três últimas características foram critério secundário na escolha do momento para administrar a hCG. Num estudo realizado por Gastal *et al.* (2006), em ecografias efectuadas a cada 24 horas após detecção do folículo com 35mm de diâmetro, a irregularidade da camada granulosa verificou-se

apenas em 37% das éguas, e em ecografias realizadas de 12 em 12 horas, já 59% das éguas apresentavam irregularidade da camada granulosa na última ecografia antes de ser detectada a ovulação. O mesmo se verificou em relação à pressão intrafolicular, perda da forma esférica e aparecimento de pontos ecogénicos flutuantes no antro folicular. Tendo em conta o que Gastal *et al.* (2006) verificaram, as alterações foliculares referidas poderiam ser menos frequentemente observadas neste estudo, uma vez que as ecografias eram realizadas de 24 em 24 horas, no entanto, a sua presença era um grande contributo para a previsão da ovulação.

Neste estudo, as duas observações cuja ovulação ocorreu 24 horas após a administração de hCG verificaram-se no mês de Maio, o que está de acordo com LeBlanc (2006) que afirma que a maioria das éguas ovula de 12 a 24 horas após a administração de hCG nos meses de Maio e Junho, no entanto, verificou-se também que duas ovularam 72 horas após o tratamento e três, 48 horas depois do mesmo.

Apesar de terem sido administradas duas doses diferentes de hCG, e de numericamente a média do número de dias desde a administração de hCG até à ovulação ter sido menor para a dose de 3000UI, não houve variação estatisticamente significativa ($p < 0.05$) no número de dias até à ovulação que se possa relacionar com a dose de hormona administrada.

2.GARANHÃO

2.1.Revisão Bibliográfica

A avaliação das características do sémen é primariamente efectuada para se obter uma indicação da capacidade dos espermatozóides produzidos por determinado garanhão fecundarem um óvulo (Morel 1999).

A recolha de sémen com vagina artificial permite a avaliação do sémen antes da Inseminação Artificial (IA), e apoia uma detecção precoce de problemas de infertilidade do garanhão. Por sua vez, o uso da IA traz vantagens higiénicas e sanitárias que podem aumentar as taxas de fertilidade em muitos garanhões subférteis (Gamboa *et al.* 2008).

É recomendado que a frequência de ejaculação nos garanhões cujo sémen se destina à IA, seja um ejaculado em dias alternados (Sieme *et al.* 2004).

A avaliação do sémen (espermograma) assim como a avaliação do garanhão, devem ser feitas antes do início de cada época reprodutiva (Morel 1999).

No garanhão, a idade em que atinge a puberdade não é exacto (Morel 1999), mas considera-se que seja entre as 56 e 97 semanas, em média 83 semanas (Gamboa *et al.* 2008;

Roser 2008), e tem-se definido como sendo a idade em que este tem a capacidade de produzir 50×10^6 espermatozoides (spz) por ejaculado e com mais de 10% de motilidade (Morel 1999).

Morel (1999) refere que garanhões com 3 anos de idade ou mais jovens são capazes de fertilizar éguas. Aos 4 anos os garanhões são capazes de produzir um número de espermatozoides capaz de cobrir tantas éguas como um garanhão adulto, no entanto, a capacidade de suportar o trabalho exigido na época reprodutiva não é a mesma que nos outros.

O máximo de capacidade reprodutiva, ou seja, a maturidade sexual é atingida entre os 3.5 e 5.5 anos, em que o tamanho testicular e a produção diária de espermatozoides aumenta desde a puberdade até essa altura (Gamboa *et al.* 2008).

Aos 5 anos de idade os garanhões são considerados capazes de aguentar uma época reprodutiva completa. A função reprodutiva em termos de qualidade do sémen começa a diminuir por volta dos 20 anos de idade, e pensa-se que é devido à redução no *output* de espermatozoides evidente após os 15 anos, acompanhado por um aumento de incidência de anomalias morfológicas (Morel 1999).

Tal como a égua, o garanhão tem actividade reprodutiva condicionada pela sazonalidade (Janett *et al.* 2003; Morel 1999). No hemisfério Norte a produção de espermatozoides e a função endócrina testicular são mais elevadas durante a Primavera/Verão do que durante o Outono/Inverno e independentemente da estação do ano, a produção de espermatozoides e a fertilidade variam amplamente entre garanhões individuais (Robalo Silva *et al.* 2007). Janett *et al.* (2003) referem que a época reprodutiva em termos fisiológicos tem início em Abril e término em Outubro, época essa em que se verifica um aumento da produção de espermatozoides e da função testicular endócrina.

A duração da época reprodutiva depende de vários factores, entre eles, a raça, as condições ambientais e o maneio. 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). A produção de espermatozoides é um processo contínuo, no entanto a estação do ano afecta vários parâmetros do sémen e as características comportamentais (Agrícola *et al.* 2008; Morel 1999; Robalo Silva *et al.* 2007). O volume seminal, concentração de espermatozoides, número de espermatozoides por ejaculado, número de montas por ejaculação e o tempo de reacção perante uma égua em estro são características alteradas fora da época reprodutiva, tornando por isso o garanhão menos eficiente reprodutivamente (Morel 1999).

Fora da época habitual de reprodução, está descrito um aumento da percentagem de espermatozoides com anomalias morfológicas. Ocorre também a redução da libido do garanhão durante a época não reprodutiva, o que se pode explicar pela diminuição do número

de células de Leydig e conseqüentemente pela redução dos níveis de testosterona em circulação, que é responsável pelo padrão comportamental exibido pelos garanhões (Morel 1999). O garanhão é um animal com características reprodutivas sazonais, tendo um ciclo circanual endógeno influenciado pelos níveis de luminosidade (Pycock 2008), e o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular é responsável pelo controlo reprodutivo deste. O hipotálamo é por sua vez fortemente controlado pela hormona melatonina de natureza antigonadotrófica e que tal como na égua, é produzida pela glândula pineal e secretada nas horas de escuridão. Esta domina este sistema e suprime a actividade do hipotálamo durante os períodos de secreção. Na época reprodutiva, há ausência do efeito inibitório pela melatonina a nível do hipotálamo devido à maior duração do tempo de luminosidade dos dias, o que leva a que os níveis de GnRH sejam significativamente elevados (Morel 1999). Um garanhão necessita de um período de dias curtos, seguido de um aumento diário de luz, caso contrário pode ter um declínio de libido e produção de espermatozóides (Pycock 2008).

O nível final do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal são os testículos, constituídos por dois tipos de células principais: células de Leydig e células de Sertoli (Morel 1999).

A GnRH que é produzida pelo hipotálamo, estimula a secreção de LH e FSH as quais actuam ao nível dos testículos, nas respectivas células principais. A LH liga-se a receptores nas células de Leydig para estimular a produção de testosterona e estrogénios, sendo a primeira, o principal produto hormonal destas células. A FSH liga-se às células de Sertoli para estimular a produção de estrogénios, inibina e provavelmente activina. A testosterona, estrogénios e inibina são secretadas para a corrente sanguínea e actuam como reguladoras por *feedback* a nível do hipotálamo e pituitária (Roser 2008).

A testosterona é o principal androgénio esteróide produzido pelas células de Leydig e é essencial para a espermatogénese (Hess & Roser 2005). A sua concentração circulante varia com a estação do ano, sendo maior nos meses de Primavera/Verão (Morel 1999), coincidente com a época reprodutiva. Actua a nível sistémico no desenvolvimento e manutenção da genitália masculina, a exibição das características do comportamento do garanhão incluindo a libido e o crescimento muscular diferencial. Tem um efeito de feedback negativo no hipotálamo e hipófise, reduzindo a concentração de GnRH libertada e a sensibilidade da pituitária ao estímulo pela GnRH (Morel 1999).

2.2.Composição do sémen

O sémen produzido pelo garanhão é constituído por dois componentes principais: plasma seminal e espermatozóides. O plasma seminal 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). Tem várias funções,

funciona como substrato para o transporte de espermatozóides para a égua, permite e inicia a maturação dos espermatozóides indicada pela motilidade (pois os espermatozóides permanecem imóveis antes de contactarem com o plasma seminal), assegura a sobrevivência e motilidade dos espermatozóides pelo fornecimento de energia principalmente sob a forma de glucose e protege-os de flutuações da pressão osmótica. Além disso, previne a oxidação dos componentes bioquímicos através da ergotionina, um dos seus constituintes (Morel 1999).

Cada ejaculado pode ser subdividido em três fracções: pré-espermática, rica em esperma, e pós-espermática (Mann *et al.* 1963).

A porção pré-espermática não possui geralmente espermatozóides, e caso possua são velhos e inviáveis. Tem origem nas glândulas prostática e bulbouretrais (possivelmente nas ampolas seminais também) e tem função lubrificante e de limpeza da uretra, sendo libertada antes de o garanhão penetrar a égua. A sua consistência é aquosa e normalmente de 10-20mL de volume. A segunda fracção é a maior e é rica em espermatozóides. Contém 80-90% de espermatozóides e 80-90% de componentes bioquímicos do sémen. Tem aspecto leitoso e consiste em vários jactos de ejaculado que em média constituem 40-80mL do volume total. A porção de fluido tem maioritariamente origem nas ampolas seminais e nas glândulas bulbouretrais, com possível contribuição da próstata e glândulas vesiculares (Morel 1999).

A terceira fracção, pós espermática, é também denominada fracção de gel e é depositada após a porção rica em espermatozóides. Tem origem nas glândulas vesiculares e o seu volume pode ser desde nulo a 80mL variando com a estação do ano e individualmente em cada garanhão especialmente de acordo com a idade, sendo menor na época não reprodutiva e em garanhões mais jovens. Morel (1999) descreve uma quarta fracção, a pós coital, que é constituída apenas por poucos mililitros, tem consistência aquosa e virtualmente sem espermatozóides. Pensava-se inicialmente ter origem nas ampolas seminais, mas estudos ecográficos indicam que estas se esvaziam antes e não depois da ejaculação, não estando portanto bem esclarecida a sua origem.

No acto ejaculatório, os primeiros três jactos contêm a maioria dos espermatozóides e compostos bioquímicos do plasma seminal, os restantes jactos (geralmente num total de 6-9) diminuem nos dois componentes (Morel 1999).

2.3.Avaliação do sémen

A qualidade do sémen do garanhão tem um efeito directo na sua capacidade de cobrir as éguas com sucesso durante toda a época reprodutiva (Morel 2003). Idealmente, para uma avaliação exacta devia-se optar por um de dois procedimentos úteis para se determinar o potencial reprodutivo do garanhão: (1) análise de dois ejaculados obtidos com uma hora de intervalo entre eles; (2) análise de dois ejaculados obtidos com uma hora de intervalo entre

eles, depois de seis ou sete dias com uma recolha diária. O último é considerado mais informativo, e poderá predizer com razoável exactidão a produção diária de espermatozóides e consequentemente o número de éguas com que se poderá cruzar o garanhão, quer por monta natural, quer por Inseminação Artificial (Gamboa *et al.*, 2008; Morel 2003). No entanto, este regime não é economicamente viável, e sabe-se que uma amostra interpretada com cuidado pode fornecer informação adequada para a maioria das práticas de rotina (Morel 2003).

Os parâmetros avaliados por rotina são a cor/aspecto, volume, motilidade, concentração e morfologia. O último parâmetro não foi avaliado durante o estágio, portanto não será aqui abordado.

Relativamente ao aspecto, o sémen do garanhão é leitoso, não deve evidenciar coloração sanguinolenta, contaminação por urina ou grumos (Morel 2003). Pode variar de aquoso a cremoso (Morel 1999) consoante a concentração de espermatozóides seja menor ou maior, respectivamente.

2.3.1. Volume

O volume normal por ejaculado varia consideravelmente de 30 a 250mL, mas em média, muitos garanhões produzem 100mL e destes, cerca de 20-40mL são a fracção de gel que é descartado, resultando portanto num volume de sémen livre de gel de cerca de 60-80mL. Por outro lado sabe-se que há uma variação evidente entre garanhões e entre diferentes colheitas ao longo do ano (Morel 2003).

De um modo geral, o volume ejaculado varia com a estação do ano, frequência de ejaculação, idade, raça, efeito da provocação com éguas em cio e com as condições clínicas do animal (Morel 1999).

Robalo Silva *et al.* (2007) verificaram num estudo com garanhões Puro Sangue Lusitano (PSL) que o volume ejaculado no Inverno é menor que no resto do ano. Concluíram também que o volume total médio de ejaculados diminui progressivamente desde a Primavera até ao Inverno e por sua vez, a fracção de gel varia ao longo do ano, sendo a sua proporção no ejaculado, maior no Inverno e no Outono do que na Primavera e Verão. O volume seminal total foi de 64,60mL e 55,20mL na Primavera e Verão respectivamente, e o volume livre de gel foi de 56.80mL e 48.40 nas mesmas épocas respectivamente.

Gamboa *et al.* (2008) verificaram que no Outono, o volume médio de ejaculado livre de gel em garanhões PSL é de 46.78mL, maior que o valor encontrado por Robalo Silva *et al.* (2007), de 43.60mL.

Janett *et al.* (2003) realizaram um estudo em garanhões *warmblood* e concluíram também que o volume total ejaculado é maior no Verão relativamente ao Inverno e por sua vez, Sieme *et al.* (2004) concluíram que em garanhões do mesmo tipo de sangue e de idade compreendida

entre os 4 e 23 anos, apresentam na época reprodutiva o volume médio dos ejaculados de 47.0mL.

O maior efeito do aumento da frequência de ejaculação no garanhão verifica-se no volume da fracção de gel produzida, em que na primeira ejaculação o volume dessa fracção é invariavelmente maior que nas subsequentes (Morel 1999; Sieme *et al.* 2004). Morel (1999) refere que quer seja realizada apenas uma ou seis recolhas por semana, o volume total ou livre de gel não varia muito na maioria dos garanhões.

A idade do garanhão afecta o volume da fracção livre de gel (Dowsett & Knott 1996; Gamboa *et al.* 2008; Morel 1999), o volume seminal total e o pH do ejaculado, mas não o volume de gel (Gamboa *et al.* 2008), sendo esta última afirmação contrariada por Morel, (1999). Dowsett & Knott (1996) num estudo em cavalos *warmblood* concluíram que a fracção livre de gel é menor em cavalos com menos de 3 anos e mais que 11 anos. Por outro lado, Morel (1999) refere que há um aumento no volume total desde os 2 aos 16 anos de idade, e que é particularmente evidente em dois intervalos, desde 4 aos 6 anos e dos 9 aos 16 anos onde os volumes aumentam em 120%.

O tempo de provocação do garanhão por uma égua em cio antes da recolha de sémen condiciona o volume produzido, sendo este maior, quanto mais tempo durar a provocação (Sieme *et al.* 2004). Por isso, pode ser contra indicado usar garanhões reprodutores como provocadores de éguas para detectar cios, uma vez que o aumento de volume de ejaculado não é acompanhado por um aumento de *output* de espermatozóides, o que pode reduzir a fertilidade num programa de IA (Sieme *et al.* 2004).

Um aumento no volume pode ser devido a contaminação com urina (urospermia), sangue (hemospermia) ou pus (piospermia), no entanto estas situações não são normais e são identificadas na avaliação do aspecto do sémen. Por outro lado, foram já identificadas situações de volume seminal diminuído, devido a ejaculação incompleta e também rotações testiculares (Morel 1999).

2.3.2.Motilidade

A motilidade é outro parâmetro rotineiramente avaliado e possivelmente o mais subjectivo. A percentagem de espermatozóides móveis, particularmente aqueles que demonstram motilidade progressiva é um bom indicador do número de espermatozóides viáveis (Morel 1999). Há duas formas comuns de determinar este parâmetro, visualmente com recurso ao microscópio óptico e que implica bastante subjectividade, ou através de sistemas computadorizados de análise da motilidade. Para se aprovar um garanhão na avaliação reprodutiva (*breeding soundness evaluation*), o sémen deve apresentar uma motilidade progressiva maior que 60% (Rouge, 2003), no entanto, sémen com motilidade progressiva de

pelo menos 40% pode ser considerado adequado para a Inseminação Artificial (Morel 2003). No que respeita à conservação de sémen, Samper (2008) refere que ganhões que não tenham pelo menos 50% de espermatozóides com motilidade progressiva, não são bons candidatos a programas para sémen refrigerado e congelado.

Num estudo realizado por Robalo Silva *et al.* (2007) com cavalos Puro Sangue Lusitano, verificou-se que a motilidade progressiva dos espermatozóides é idêntica em todas as estações do ano. Os mesmos autores verificaram que na Primavera e Verão, a motilidade progressiva é de 42% e 50% respectivamente e por sua vez no Outono e Inverno 50% e 51% respectivamente. Gamboa *et al.* (2008), num estudo realizado no Outono, concluíram que a motilidade progressiva em cavalos PSL é aproximadamente 50%. Em cavalos *warmblood* está descrito por Sieme *et al.* (2004) que a motilidade é de 66%.

No entanto, segundo Janett *et al.* (2003) num estudo em cavalos *warmblood*, há variação consoante a época do ano, tendo tido resultados de motilidade mais elevada no Verão e Outono que no Inverno.

A baixa frequência de ejaculação tem um efeito negativo na motilidade, por sua vez o estímulo do ganhão com uma égua em cio antes da recolha eleva os valores da motilidade (Sieme *et al.* 2004).

A correlação da motilidade progressiva com a fertilidade é considerada variável, rondando 0.7 (Morel 2003). No entanto, a fertilidade do sémen não deve ser avaliada discriminadamente pela motilidade progressiva sem ter em conta os restantes atributos dos espermatozóides (Varner 2008), de qualquer modo, é o parâmetro mais correlacionado com a fertilidade, comparativamente com os outros (Morel 2003).

Segundo Gamboa *et al.* (2008) a idade do ganhão não influencia a motilidade dos espermatozóides do ejaculado, nem a sua concentração, no entanto Morel (1999) refere haver influência da idade na motilidade. Este parâmetro é afectado por períodos de inactividade sexual – machos que não ejacularam por longos períodos de tempo muitas vezes têm a motilidade diminuída no primeiro ejaculado (Rouge 2003, Samper 2008).

2.3.3. Concentração

A concentração de espermatozóides numa colheita de sémen, é um dos parâmetros mais importantes a avaliar uma vez verificada a viabilidade. Não indica apenas se a colheita é útil e informa sobre a capacidade reprodutiva do ganhão, mas também determina o número de éguas que podem ser inseminadas com um ejaculado (Morel 1999). A concentração pode ser determinada de duas formas: através de um hemocítmetro (Câmara de Neubauer) ou num espectrofotómetro (Morel 1999).

O intervalo normal para a concentração de espermatozóides em sémen não diluído é de 30-600x10⁶ espermatozóides por mililitro (spz mL⁻¹), no entanto as concentrações variam significativamente (Morel 2003).

Em garanhões de porte leve, está descrita uma concentração de 135x10⁶ spz mL⁻¹ (Stewart & Roser 1997).

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 (incluindo temperatura, radiação, nutrição e produtos químicos tóxicos e fármacos), anomalias físicas e hormonais, doenças e infecções. A mesma autora afirma que a estação do ano, além de influenciar a libido e o volume de sémen, afecta a produção diária de espermatozóides, sendo que o número de espermatozóides produzidos por ejaculado em Janeiro ronda os 10x10⁹ spz e em Julho 22x10⁹ spz, o que é apoiado por Janett *et al.* (2003) no que respeita ao volume ejaculado e número total de espermatozóides.

Robalo Silva *et al.* (2002) verificaram que em garanhões PSL o número de espermatozóides por ejaculado é de 6.27x10⁹ spz no Verão.

Robalo Silva *et al.* (2007) concluíram que em cavalos PSL a concentração dos ejaculados na Primavera e Verão é de 156.7x10⁶ spz mL⁻¹ e 164.9x10⁶ spz mL⁻¹ respectivamente, e de 155.6x10⁶ spz mL⁻¹ e 166.3x10⁶ spz mL⁻¹ no Outono e Inverno respectivamente, não havendo portanto grande variação neste parâmetro apesar de ser ligeiramente menor na época reprodutiva. Já Gamboa *et al.* (2008) concluíram que a concentração de espermatozóides nos ejaculados de cavalos PSL fora da época reprodutiva ronda os 241.26 x10⁶ spz mL⁻¹, valor muito superior ao obtido por Robalo Silva *et al.* (2007). Em cavalos *warmblood*, a concentração de espermatozóides nos ejaculados da época reprodutiva ronda 186x10⁶ spz mL⁻¹ (Sieme *et al.* 2004).

Janett *et al.* (2003) verificaram que em cavalos *warmblood*, a concentração é menor no Verão que nas restantes épocas do ano.

Múltiplas montas e a provocação do garanhão com uma égua em cio antes da recolha de sémen levam à diminuição da concentração do ejaculado (Sieme *et al.* 2004).

Morel (1999) afirma que a idade afecta várias características seminais, entre elas a concentração e número total de espermatozóides. A produção de espermatozóides aumenta desde a puberdade (17-22 meses) até atingir um pico por volta dos 4-5 anos de idade e declina quando atingir os 20 anos (Morel 1999). Dawsett & Knott (1996) num estudo realizado em cavalos *warmblood*, concluíram que a concentração e número total de espermatozóides é menor em cavalos com menos de 3 e mais de 11 anos. A diminuição do número de células de

Sertoli explica esta evidência (Morel 1999). No entanto, Gamboa *et al.*, (2008), referem que a idade não afecta a concentração de espermatozóides por ejaculado.

O tamanho testicular é um bom indicador da capacidade produtora de espermatozóides pelo garanhão. Está descrita uma correlação de 0,89 entre o peso do parênquima e a produção diária de espermatozóides tendo em conta que o tamanho dos testículos é indicativo do volume de parênquima no seu interior (Morel, 1999). Existe uma correlação positiva entre o volume testicular e a produção de espermatozóides (Robalo Silva *et al.* 2007; Agrícola *et al.* 2008). Agrícola *et al.* (2008) concluíram que em cavalos PSL, o volume testicular é máximo em Março e mínimo em Outubro e Junho.

Relativamente à frequência de ejaculação, há uma diferença significativa entre 6 recolhas numa semana (142×10^6 spz mL⁻¹) e 3 recolhas numa semana (248×10^6 spz mL⁻¹), mas não se verifica grande diferença entre 3 e 1 recolha por semana (288×10^6 spz mL⁻¹) (Morel 1999).

Um trabalho de investigação concluiu não haver diferenças no volume ejaculado, motilidade e concentração dos espermatozóides e o pH do sémen entre seis raças distintas, incluindo entre outros, cavalos Árabes, Appaloosa e Puro Sangue Inglês (PSI) (Morel 1999).

A concentração de espermatozóides e o número total destes por ejaculado depende em grande parte do uso prévio do garanhão, aumentando estes parâmetros proporcionalmente ao tempo de intervalo entre recolhas (Morel 1999).

Os garanhões incluídos em programas de IA necessitam de recolhas regulares, preferencialmente uma vez por dia ou duas vezes por dia em dias alternados durante toda a época reprodutiva (Sieme *et al.* 2004).

Garanhões sexualmente activos têm sémen com melhor qualidade que aqueles em descanso sexual. Sémen do primeiro ejaculado do ano ou da primeira recolha após um longo período de descanso sexual, em geral tem maior número de anomalias morfológicas, maior concentração e menor motilidade (Samper 2008). Também Brinsko *et al.* (2004) concluíram que o número de espermatozóides é maior no primeiro ejaculado após descanso sexual e a motilidade neste é diferente dos subsequentes e menor. Além disso, os espermatozóides apresentam menor longevidade, portanto esse sémen não deve ser usado para preservar durante muito tempo entre a recolha e a inseminação, apenas cerca de 15 minutos após a colheita e preferencialmente usando todo o ejaculado, e que este tenha pelo menos 25 a 30% de espermatozóides com motilidade progressiva (Samper 2008).

Sabe-se que a frequência de ejaculação pode afectar significativamente a qualidade de sémen dos garanhões. O segundo ejaculado reflecte de forma mais correcta a qualidade do sémen do cavalo quando este está sexualmente activo (Brinsko *et al.* 2004).

Embora a motilidade seja dos parâmetros mais considerados para verificar a qualidade do sémen, causa apenas cerca de 20% de variação na fertilidade. Por outro lado, apesar do

número de espermatozóides ser maior no primeiro ejaculado após descanso sexual, fica a dúvida se a qualidade dos espermatozóides desse ejaculado é comparável com os subsequentes (Brinsko *et al.* 2004). Brinsko *et al.* (2004) referem que a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides prediz mais exactamente a fertilidade do sémen que a própria motilidade.

Ao contrário de outras espécies, no garanhão não está definida uma forte ligação entre a qualidade do sémen e a fertilidade, provavelmente porque os garanhões não são escolhidos pela sua capacidade reprodutiva, mas principalmente pela sua performance atlética (Lopate *et al.* 2003).

A bibliografia acerca das características dos ejaculados dos cavalos Lusitanos é escassa, e os trabalhos que existem apresentam alguns resultados contraditórios. Além disso, a utilização do primeiro ejaculado da época reprodutiva para inseminação gera alguma controvérsia entre os veterinários que praticam reprodução equina. Por estas razões, a realização deste trabalho procura contribuir para o enriquecimento da informação existente no que respeita às características do sémen dos garanhões PSL, à comparação entre os valores do primeiro ejaculado do ano com os restantes e à comparação entre os ejaculados dos meses de Janeiro, Fevereiro e Março com os de Abril e Maio. É feita a mesma comparação relativamente a todos os garanhões avaliados, que compreendem as raças SF e PSL. Faz-se também referência à fertilidade associada a cada valor de motilidade progressiva, obtido nos garanhões das duas raças.

2.4. Materiais e Métodos

Para este estudo, foram utilizados dados de 18 garanhões de raça Puro Sangue Lusitano e 2 de raça Sela Francês, com idades compreendidas entre os 4 e 23 anos. Destes, 13 eram residentes nas instalações da FAR, e os restantes 7 eram exteriores a esta. Foram realizadas 71 recolhas de sémen entre 30 de Janeiro e 19 de Maio, das quais 16 foram a primeira recolha da época reprodutiva de 2009. Foram também utilizados dados do diagnóstico de gestação de 35 éguas acompanhadas reprodutivamente na FAR, entre elas 26 PSL, 3 PSA e 5 cruzadas portuguesas. Os garanhões da FAR eram alimentados com o mesmo tipo de ração e palha e a água era fornecida *ad libitum*, e praticavam exercício físico diariamente, dos restantes não se obteve informação. As colheitas de sémen (Fig. 11) eram realizadas quando era necessário sémen para inseminar éguas acompanhadas na FAR, ou pontualmente em casos de venda de sémen para fora da coudelaria.

Para cada recolha, utilizava-se como manequim, uma égua que estava quase continuamente receptiva ao garanhão por ter um tumor das células da granulosa no ovário direito, e sempre devidamente peada.

Todo o processo decorria na sala de recolha de sêmen, onde se peava a égua manequim (Fig. 10) e assim que o garanhão estivesse com o pénis erecto, era-lhe permitido saltar para a égua e assim ser feita a recolha. Toda a avaliação do sêmen era realizada no laboratório da Unidade de Reprodução e Obstetrícia da FAR, contíguo à sala de recolha de sêmen.



Fig. 10 – Égua utilizada como manequim



Fig. 11 – Recolha de Sêmen

Antes de cada recolha era ligado o banho - Maria a 37°C, o espectrofotómetro (SpermaCue, Minitub™) (Fig. 12), o microscópio óptico (Olympus CX31®) (Fig. 13), e a placa de aquecimento (Fig. 13) a 31°C para lâminas e lamelas.

Utilizava-se uma vagina artificial de modelo INRA® (Fig. 14), mangas estéreis de tamanho adequado, copos de recolha de sêmen e filtros (Fig. 15), adaptadores da manga ao copo, vaselina líquida e luvas não estéreis para aplicação desta na extremidade de introdução do pénis. Era colocada água quente no interior da vagina de modo a ser atingida uma temperatura (45 – 48°C) e pressão interna capazes de simular a vagina da égua.



Fig. 12 – Espectrofotómetro

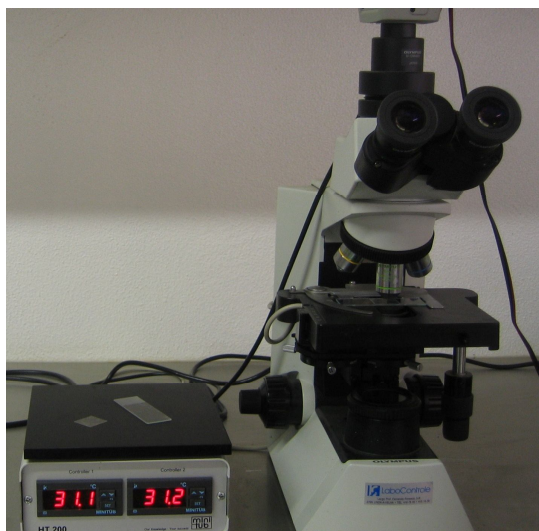


Fig. 13 – Placa de Aquecimento e Microscópio Óptico



Fig. 14 – Vagina Artificial preparada



Fig. 15 – Copo de recolha de sémen e filtro

Após cada recolha, era filtrada a fracção de gel e o copo com o sémen era introduzido no banho aquecido a 37°C até ser utilizado para a inseminação. Imediatamente após a recolha e filtragem era observado e registado o volume e cor do sémen. A leitura da concentração do sémen desprovido de gel era efectuada por fotometria em microcuvete. Para a avaliação da motilidade, colocava-se uma gota de sémen na lâmina, cobria-se esta com uma lamela, ambas previamente aquecidas (31°C), e recorrendo ao microscópio óptico (ampliação de 200x) fazia-se a avaliação. Atribuía-se um valor de 0% a 100%, tendo em conta que os espermatozóides considerados eram os que mostravam motilidade progressiva, ou seja, que se moviam rapidamente em movimento aproximadamente rectilíneo, através do campo de visão. Era sempre a mesma pessoa a definir esse valor.

O diagnóstico de gestação era realizado por ecografia 14 dias após detecção do CL.

Para analisar os resultados recorreu-se ao programa estatístico SPSS 15.0 for Windows (2006), foi calculada a média, desvio padrão, mínimo e máximo dos valores de cada parâmetro (volume, motilidade e concentração): (1) de todos os ejaculados avaliados; (2) do primeiro ejaculado da época; (3) de todos os ejaculados à excepção do primeiro; (4) dos ejaculados dos

meses de Janeiro, Fevereiro e Março; (5) dos ejaculados de Abril e Maio; (6) dos ejaculados dos cavalos de raça Puro Sangue Lusitano, no que respeita a todos os ejaculados, ao primeiro ejaculado do ano, restantes ejaculados, ejaculados dos meses de Janeiro, Fevereiro e Março e dos meses de Abril e Maio.

Foi calculada a percentagem de diagnósticos positivos para cada valor de motilidade dos ejaculados de 12 garanhões.

Tendo-se verificado que os dados referentes às características do sémen não apresentavam distribuição normal, recorreu-se ao teste não paramétrico Kolmogorov – Smirnov. Este teste foi utilizado para avaliar as diferenças entre o primeiro ejaculado do ano e restantes, assim como para comparar ejaculados dos meses de Janeiro, Fevereiro e Março, com os ejaculados de Abril e Maio. Avaliaram-se os resultados de todos os garanhões em conjunto e só dos garanhões de raça PSL.

2.5.Resultados

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1 no que respeita a todos os garanhões avaliados, e na Tabela 2 em particular dos garanhões PSL. Na tabela 3 está apresentada a percentagem de diagnóstico de gestação positivo associada à motilidade progressiva.

Parâmetro	n	Média ± dp	Limites
Volume total (mL)	73	48.21 ± 27.71	20 – 120
Volume 1º ejac. (mL)	16	48.75 ± 23.34 ^a	20 – 100
Volume restantes ejac. (mL)	57	48.05 ± 29.0 ^a	20 – 120
Volume Jan. – Mar. (mL)	35	50.54 ± 34.71 ^a	20 – 100
Volume Abr. – Mai. (mL)	38	46.05 ± 19.42 ^a	30 – 120
Motilidade total (%)	73	39.04 ± 23.18	5 – 80
Motilidade 1º ejac. (%)	16	34.06 ± 19.43 ^a	5 – 70
Motilidade restantes ejac. (%)	57	40.44 ± 24.10 ^a	5 – 80
Motilidade Jan. – Mar. (%)	35	30.71 ± 18.52 ^a	5 – 70
Motilidade Abr. – Mai. (%)	38	46.71 ± 24.58 ^d	5 – 80
Concentração total (spz mL ⁻¹)	73	256.90 ± 81.33	119 – 428
Concentração 1º ejac. (spz mL ⁻¹)	16	258.31 ± 84.31 ^a	126 – 428
Concentração restantes ejac. (spz mL ⁻¹)	57	256.53 ± 81.24 ^a	119 – 419
Concentração Jan. – Mar. (spz mL ⁻¹)	35	247.51 ± 83.951 ^{a*}	143 – 428
Concentração Abr. – Mai. (spz mL ⁻¹)	38	265.58 ± 78.96 ^{d*}	119 – 419

Médias com letras diferentes diferem estatisticamente para $p < 0.05$; Médias com letras diferentes e asterisco diferem significativamente para $p < 0.1$.

Tabela 1 – Valores obtidos dos parâmetros avaliados para os ejaculados de garanhões SF e PSL

Parâmetro	n	Média ± dp	Limites
Volume total (mL)	62	46.85 ± 22.38	20 – 120
Volume 1º ejac. (mL)	14	48.57 ± 23.81 ^a	20 – 100
Volume restantes ejac. (mL)	48	46.35 ± 22.19 ^a	20 – 120
Volume Jan. – Mar. (mL)	28	46.43 ± 25.31 ^a	20 – 100
Volume Abr. – Mai. (mL)	34	47.21 ± 20.04 ^a	30 – 120
Motilidade total (%)	62	42.66 ± 23.08	5 – 80
Motilidade 1º ejac. (%)	14	36.43 ± 19.06 ^a	10 – 70
Motilidade restantes ejac. (%)	48	44.48 ± 24.00 ^a	5 – 80
Motilidade Jan. – Mar. (%)	28	33.57 ± 19.04 ^a	5 – 70
Motilidade Abr. – Mai. (%)	34	50.15 ± 23.66 ^b	5 – 80
Concentração total (spz mL ⁻¹)	62	258.85 ± 80.28	119 – 428
Concentração 1º ejac. (spz mL ⁻¹)	14	261.29 ± 90.10 ^a	126 – 428
Concentração restantes ejac. (spz mL ⁻¹)	48	258.15 ± 78.21 ^a	119 – 419
Concentração Jan. – Mar. (spz mL ⁻¹)	28	255.21 ± 81.13 ^a	143 – 428
Concentração Abr. – Mai. (spz mL ⁻¹)	34	261.85 ± 80.67 ^a	119 – 419

Médias com letras diferentes diferem estatisticamente para p<0.05

Tabela 2 – Valores obtidos dos parâmetros avaliados para os ejaculados de garanhões PSL

Existe diferença estatisticamente significativa na motilidade (p<0.05) e na concentração (p<0.1) dos ejaculados entre os meses de Janeiro, Fevereiro e Março e os meses de Abril e Maio no que respeita a todos os garanhões. E, existe diferença estatisticamente significativa (p<0.05) na motilidade dos ejaculados entre os meses de Janeiro, Fevereiro e Março e os meses de Abril e Maio dos garanhões PSL.

Motilidade (%)	n	Diagnóstico positivo (%)
5	5	60
10	4	75
20	4	75
30	6	83
40	5	40
50	1	0
60	8	75
70	2	50

Tabela 3 – Percentagem de diagnóstico de gestação positivo associada à motilidade progressiva

2.6. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram grande variabilidade nas características do sémen entre os garanhões estudados e apresentam valores congruentes com os obtidos em estudos prévios, no entanto encontraram-se algumas divergências.

No que respeita aos ejaculados de todos os garanhões, verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) entre o primeiro ejaculado do ano e os restantes, nos três parâmetros do sémen avaliados. No entanto, no que respeita à comparação entre os ejaculados dos meses de Janeiro, Fevereiro e Março com os de Abril e Maio, verifica-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) na motilidade média entre estes dois grupos de meses, e a diferença na média da concentração aproxima-se da significância ($p < 0.05$).

Comparando o primeiro ejaculado do ano relativamente aos restantes quer de todos os garanhões, quer dos garanhões PSL, embora não haja diferença estatisticamente significativa, verificou-se que o volume livre de gel médio e concentração média são numericamente maiores neste do que nos restantes ejaculados do ano e a motilidade média é em termos numéricos menor de acordo com o que Samper (2008) descreve e o que Brinsko *et al.* (2004) tinham verificado no que respeita à motilidade média. Verifica-se que de um modo geral, as características do sémen dos cavalos Puro Sangue Lusitano avaliados neste estudo apresentam variações relativamente aos resultados obtidos por Robalo Silva *et al.* (2007). A maior diferença verificou-se na concentração média do sémen, numericamente maior neste estudo ($258.85 \text{ spz mL}^{-1}$) do que no realizado pelo autor referido, relativamente à Primavera ($156.7 \text{ spz mL}^{-1}$).

No que respeita à comparação entre ejaculados dos cavalos PSL nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março com os meses de Abril e Maio, é na motilidade média que se verifica a maior diferença numérica, tendo um valor superior no segundo grupo de meses. O valor que corresponde aos meses de Abril e Maio, grupo mais representativo da Primavera, é muito superior (50.15%) quando comparado com os dados de Robalo Silva *et al.* (2007), que verificou uma motilidade de 42% na mesma estação do ano. No entanto, o volume livre de gel médio obtido nos meses de Abril e Maio (47.21 mL) é bastante inferior ao obtido no estudo realizado por Robalo Silva *et al.* (2007) (56.8 mL) na Primavera.

Devido à limitação do período de estágio, não foi possível obter os registos das características do sémen relativos aos meses de Verão da época reprodutiva, pelo que a comparação com o estudo de Robalo Silva *et al.* (2007) não poderá ser linear, e além disso, a metodologia utilizada nos dois trabalhos foi distinta, uma vez que as recolhas de sémen realizadas no estudo de Robalo Silva *et al.* (2007) foram previamente programadas e, no estudo que realizei, as recolhas eram feitas de acordo com a necessidade do sémen para inseminar as éguas, portanto, aleatoriamente durante todo o período.

Apesar do cavalo PSL ter grande proximidade genética com o cavalo de Pura Raça Espanhola, as características do sémen não foram semelhantes em todos os parâmetros avaliados, pois embora o volume se encontre entre os 40-50mL e a concentração maior que 200 spz mL^{-1} , a motilidade foi numericamente muito menor que os dados referidos por Gamboa *et al.* (2008) para essa raça (60 – 70%). De acordo com o que refere Morel (2003), pode-se considerar que o sémen dos cavalos deste estudo, está apto para ser utilizado em programas de IA, uma vez que o valor da motilidade média é maior que 40%. Partindo desta afirmação, sendo a motilidade média do primeiro ejaculado do ano nos garanhões PSL inferior a 40%, poderá não ser boa prática segundo a autora referida, a utilização destes ejaculados nos programas de IA.

O baixo valor da motilidade média obtido nos cavalos PSL, pode dever-se à influência dos ejaculados de um garanhão que apresentava motilidade continuamente inferior a 10%, o qual contribuiu com 11 ejaculados para o valor médio final. Valores médios de motilidade tão baixos como estes, Samper (2008) afirma que não são bons candidatos para refrigeração nem congelação.

O mesmo se verificou na motilidade de todos os cavalos, em que, além desse garanhão PSL, existe outro garanhão, um SF que apresenta motilidades tendencialmente menores que os restantes, a maioria inferiores a 30%.

Relativamente aos resultados dos diagnósticos de gestação associados aos valores da motilidade do sémen, seria de esperar que a IA com sémen de baixa motilidade progressiva resultasse num grande número de diagnósticos de gestação negativos. Inesperadamente, motilidades progressivas de 5, 10 e 20% resultaram numa grande percentagem de diagnóstico de gestação positivo (39.0% de todos os diagnósticos positivos, comparado com 30.4% para motilidade entre 30 e 40% e 30.4% para motilidade entre 50 e 70%) . O ejaculado com motilidade de 50% resultou em 0% de prenhes, mas apenas uma égua foi inseminada com esse sémen. Numa tentativa de explicar este facto, poderia considerar-se a idade das éguas, pois tendo em conta que o intervalo ideal para a vida reprodutiva da égua é entre os 5 e os 12 anos (Morel 2003), seria de esperar que os diagnósticos de gestação negativos correspondessem a éguas fora deste intervalo, no entanto, tal não se verificou. Não se encontra uma explicação lógica para estes resultados, pois tendo em conta que o protocolo de inseminação é o mesmo para todas as éguas, o que varia são as características individuais de cada égua. E, uma vez que baixa motilidade progressiva dos espermatozóides resultou em altas percentagens de diagnóstico positivo, não parece correcto atribuir responsabilidade às características do sémen do garanhão. Não foi registado o volume da dose inseminante, mas esta poderia eventualmente ter o número de espermatozóides necessários para se obter uma gestação, de qualquer modo, não se encontra uma explicação lógica para estas observações.

Conclusões gerais

Pode-se concluir deste estudo que de um modo geral as éguas avaliadas durante o período do meu estágio na FAR apresentam valores relativos ao diâmetro do folículo pré-ovulatório semelhantes aos verificados por outros autores e verificou-se que as respostas aos tratamentos hormonais com $\text{PGF}_{2\alpha}$ e hCG foram na globalidade as esperadas. Tendo em conta que os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os de outros autores, poderá subentender-se que realizando a Inseminação Artificial no *timing* certo, poder-se-ão obter taxas de gestação satisfatórias, atingindo o objectivo de, no final da época reprodutiva, se conseguir o máximo de éguas gestantes.

O procedimento efectuado, na realização da IA com sémen fresco associada à administração de 1500 – 3000UI de hCG quando o folículo maior apresentar 35mm de diâmetro ou mais, parece ser uma boa prática, embora tenha sido necessária uma segunda IA nos casos em que o CL se detectou apenas 72 horas após inseminação.

Poderia por isso ser vantajosa a realização da IA 24 horas após administração da hCG, pois tendo-se verificado que a ovulação ocorreu tendencialmente próximo das 48 horas e em alguns casos das 72 horas, seria mais fácil obter em simultâneo e durante mais tempo no tracto reprodutivo da égua, os espermatozóides e o oócito aptos para a ocorrência da fecundação. Além do diâmetro do folículo, será importante ter em conta o nível de edema uterino e também a laxidão do cérvix, pois poderá ser necessário alterar a indução da ovulação, para que se reúnam condições anatómicas e fisiológicas, e seja suficiente apenas uma IA. Por outro lado, interessa muito ter em conta as características do sémen inerentes ao sucesso deste procedimento, e como verificado, embora seja de grande importância, o valor da motilidade não é critério exclusivo na previsão da fertilidade do sémen.

Se nas éguas os parâmetros avaliados estão de acordo com a bibliografia, já no que respeita aos garanhões, o mesmo não se poderá dizer. Os resultados obtidos reforçam a ideia inicial, de que ainda não existem dados coerentes entre os poucos estudos até hoje realizados com sémen dos cavalos Puro Sangue Lusitano. É ainda de salientar que relativamente à influência do garanhão nos resultados dos diagnósticos de gestação, tendo em conta que sémen com baixa motilidade resultou em diagnósticos de gestação positivos, não se deve pôr de parte a hipótese de realizar IA quando o sémen apresentar baixa motilidade. Uma vez que os resultados deste estudo compreendem apenas os valores dos parâmetros avaliados até ao final do período do meu estágio, não pude fazer uma comparação completa no que respeita às características do sémen em toda a época reprodutiva em Portugal do cavalo PSL, mas seria um trabalho interessante a realizar no futuro, de modo a enriquecer a escassa e por vezes contraditória informação existente sobre as características do sémen do garanhão Puro Sangue Lusitano e relacionar essas características com a fertilidade desse mesmo sémen.

Bibliografia

Affleck KJ, Conbov HS, Fitzgerald BP (1991), "A negative feedback role for the ovaries of the mare on tonic LH secretion before the first ovulation of the breeding season", **Journal of reproduction and fertility**, Supplement 44, 241-7

Agrícola R, Chaveiro A, Robalo Silva JR, Horta A, Silva FM (2008), "Seasonal changes in semen quality and freezability in Lusitano stallions: A flow cytometric study", **Proceedings of the 5th International Symposium on Stallion Reproduction**, Anim. Reprod. Sci.,107, 302-303

Alcántara B, Boeta M, Porras A (2005), "Luteolysis, Estrus Induction, and Clinical Side Effects in Mares Treated With a PDF2 α Analog, Cloprostenol (Sinocrel 11-21)", **Journal of Veterinary Science**, 25, 384-386

Atayde LM (2008), "Características do ciclo reprodutivo da égua no norte de Portugal", **Trabalho de Síntese, Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica**, ICBAS, 1-64

Bragg ND, Pierson RA, Buss DG, Card CE (2001), " Transrectal Tonometric Measurement of Follicular Softening and Computer Assisted Ultrasound Image Analisis of Follicular Wall Echotexture During Estrus in Mares", **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, 47, 242-245

Brinsko S, Varner DD, Blanchard TL (2000), "Transported Equine Semen", **Recent Advances in Equine Reproduction**, B. A. Ball Ed

Brinsko SP, Spooner JA, Blanchard TL, Love CC, Varner DD (2004), "Relationships among Sperm Membrane Integrity, Motility, and Morphology in First and Third Ejaculates of Sexually Rested Stallions", **Proceedings of 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Denver

Carluccio A, Tosi U, Contri A ,De Amicis I, Faustini M, Veronesi MC (2006), "Correlation between follicular Size and ovulation induction in Martina franca jennies" **Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association**, Marrakech, 245-246

Cuervo-Arango J, Newcombe JR (2008), “ How to reliable is to use the preovulatory follicular diameter of a previous cycle as a guide to optimize breeding time in the mare?”, **Proceedings of the European Equine Meeting of the Year SIVE FEEVA Congress**, Italy, 357-358

Dowsett KF, Knott LM (1996), “The influence of age and breed on stallion semen”, **Theriogenology**, 46, 397-412

England GCW (2005), “Manipulation of Cyclical Activity”, **Fertility and Obstetrics in the Horse V**, 3rd Ed, Blackwell Publishing, 43-50

England GCW (2005), “The Optimum Time for Breeding and the Mating Procedure”, **Fertility and Obstetrics in the Horse VI**, 3rd Ed, Blackwell Publishing, 52-59

England GCW (2005), “Examination of the Stallion for Breeding Soundness”, **Fertility and Obstetrics in the Horse XXVI**, 3rd Ed, Blackwell Publishing, 212-22

Gamboa S, Faria MM, Santos JR (2009) “Seminal traits, suitability for semen preservation and fertility in the native Portuguese horse breeds Puro Sangue Lusitano and Sorraia: Implications for stallion classification and assisted reproduction”, **Animal Reproduction Science**, 113, 102-113

Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ (2006), “Serrated Granulosa and Other Discrete Ultrasound Indicators of Impending Ovulation in Mares”, **Journal of Equine Veterinary Science**, 26, 67-73

Gastal EL, Silva LA, Gastal MO, Evans MJ (2006), “Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares”, **Animal Reproduction Science**, 94, 186-190

Ginther OJ (1990), “Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares”, **Journal of Reproduction and Fertility**, 90, 311-320

Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Cooper DA (2008), “Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17-estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares”, **Animal Reproduction Science** (*in press*), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.08.026

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA (2008), "Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Periovulatory Hormones: What's New?", **Journal of Equine Veterinary Science**, 28, 454-460

Ginther OJ, Siddiqui MAR, Beg MA (2009), "Physiologic and nonphysiologic effects of exogenous prostaglandinF2 α on reproductive hormones in mare", **Theriogenology** (*in press*), doi:10.1016/j.theriogenology.2009.03.014

Handler J, Wustenhagen A, Schams D, Kindahl H, Aurich C (2004) "Estrous cycle characteristics, luteal function, secretion of oxytocin (OT) and plasma concentrations of 15-keto-13,14-dihydro-PGF2a (PGF2a-metabolite) after administration of low doses of prostaglandin F2a (PGF2a) in pony mares", **Theriogenology**, 61, 1573–1582

Hess MF, Roser JF (2005), "A comparison of the effects of equine luteinizing hormone (eLH), equine growth hormone (eGH) and human recombinant insulin-like growth factor (hrIGF-I) on steroid production in cultured equine Leydig cells during sexual maturation", **Animal Reproduction Science**, 89, 7-19

Ivkov V, Ivancev N, Veselinovic S, Grubac S, Vesekinovic S, Dovenski T, Mickovski G, Kocoski L, Popovski K (1999), "Ultrasonic Measurement of Follicle's Diameter in Estrus of Mares", **Proceedings of the Meeting: " 7th Conference for Ovine and Caprine Production & 5th Symposium on Animal Reproduction** , Ohrid, 1-3

Janett F, Thun R, Niederer D, Burger D, Hassig M (2003), "Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion", **Theriogenology**, 60, 453–461

LeBlanc M, Lopate C, Knottenbelt D, Pascoe R (2003), "The Mare" **Equine Stud Farm Medicine and Surgery** V, 1^o Ed, Saunders Elsevier Science, 113-212

LeBlanc MM (2006), "Reproduction Deduction – Part 2", **Proceedings of North America Veterinary Conference**, Orlando

Loomis P.R, Squires E.L. (2005) "Frozen semen management in equine breeding programs" **Theriogenology**, 64, 480-491

Lopate C, LeBlanc M, Knottenbelt D (2003), "The Stallion" **Equine Stud Farm Medicine and Surgery IV**, 1^o Ed, Saunders Elsevier Science, 43-112

Mann T, Minotakis CS, Polge C (1963), "Semen Composition and Metabolism the Stallion and Jackass", **Journal of Reproduction and Fertility**, 5, 109-122

McCue PM, Magee C, Gee EK (2007), "Comparison of Compounded Deslorelin and hCG for Induction of Ovulation in Mares" **Journal of Equine Veterinary Science**, 27, 58-61

Morel MD (1999), "Stallion Reproductive Anatomy and Control", **Equine Artificial Insemination III**, Cabi Publishing, 37-77

Morel MD (1999), "Production of Spermatozoa", **Equine Artificial Insemination IV**, Cabi Publishing, 78-150

Morel MD (1999), "Semen evaluation", **Equine Artificial Insemination VI**, Cabi Publishing, 190-233

Morel MD (1999), "Mare Insemination", **Equine Artificial Insemination VIII**, Cabi Publishing, 302-336

Morel MD (2003), "Artificial Isemination", **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management XX**, 2nd Ed, Cabi Publishing, 295-309

Morel MD (2003), "Endocrine Control of Reproduction in the Mare", **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management III**, 2nd Ed, Cabi Publishing, 28-39

Morel MD (2003), "Selection of the Mare and Stallion for Breeding", **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management XIV**, 2nd Ed, Cabi Publishing, 28-39

Morel MD (2005), "Putting your Mare in Foal" **Breeding horses IV**, 1st Ed, Blackwell Publishing Ltd, 79-109

Pierson RA, Ginther OJ (1985), "Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare", **Theriogenology**, 24, 359-368

Pycock JF (2008), "Artificial Insemination" **Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, Moscow**, 224-234

Pycock J (2008), "Management of the breeding stallion", **Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, Moscow**, 216-223

Robalo Silva JR, Barbosa M, Agrícola R (2002), "Variação sazonal da produção de sémen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos com 6-8 anos de idade: resultados preliminares", **Proceedings of the Veterinary Congress SPCV, Oeiras**, 357

Robalo Silva JR, Agrícola R, Barbosa M, Costa LL, (2007), "**Seasonal variation of testicular size, semen production and sexual behaviour of Lusitano stallions**", *RPCV*, 102 (561-562) 119-125

Roser JF (2008), "Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems", **Animal Reproduction Science**, 107, 179–196

Rouge M (2003), "Sperm motility". Recuperado em 19 de Maio, 2009, em <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/motility.html>

Samper JC (1997), "Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares", **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, 43, 189-191

Samper JC (2001), "Management and fertility of mares bred with frozen semen", **Animal Reproduction Science**, 68, 219-228

Samper JC (2007), "How to Interpret Endometrial Edema in Brood Mares", **Proceedings of the 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, 571-572

Samper JC (2008), "Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not" **Theriogenology**, 70, 445-447

Samper JC (2008), "Artificial Insemination with fresh and Cooled Semen", **Equine Breeding Management and Artificial Insemination XIV, 2nd**, Elsevier Health Sciences, 165-174

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, 769–784

Smith JD (2007), "Drugs in equine reproduction: what you need to know and more", **Proceedings of the North American Veterinary Conference**, 21, Orlando

SPSS (2006). SPSS 15.0 for Windows User Guide, version 2

Squires EL (2008), "Hormonal Manipulation of the Mare: A Review", **Journal of Equine Veterinary Science**, 28, 627-634

Stewart BL, Roser JF (1998), "Effects of Age, Season, and Fertility Status on Plasma and Intratesticular immunoreactive (IR) Inhibin Concentrations in Stallions", **Domestic Animal Endocrinology**, 15(2), 129-139

Troedsson MHT, Liu IKM, Crabo BG (1998), "Sperm Transport and Survival In The Mare", **Theriogenology** 49, 905-915

Varner DD (2008), "Advancements in Semen Evaluation of Stallions", **Proceedings of European Veterinary Conference**, Voorjaarsdagen, 312-318