

**UNIVERSIDADE DO PORTO**

**INSTITUTO de CIÊNCIAS BIOMÉDICAS de ABEL SALAZAR**

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Reprodução Equina**

Júlio Manuel Teixeira Domingues

**Orientador:** Dr. Paulo Pegado Cortez

**Co-orientadores:** Dr. Luís Miguel Paiva Benites da Silva Athayde  
Dr. Tiago Pessanha Guimarães

**PORTO, 2010**

**UNIVERSIDADE DO PORTO**

**INSTITUTO de CIÊNCIAS BIOMÉDICAS de ABEL SALAZAR**

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Reprodução Equina**

Júlio Manuel Teixeira Domingues

**Orientador:** Dr. Paulo Pegado Cortez

**Co-orientadores:** Dr. Luís Miguel Paiva Benites da Silva Athayde  
Dr. Tiago Pessanha Guimarães

**PORTO, 2010**

## **Resumo**

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária decorreu nas instalações do Centro de Reprodução Animal de Vairão (CRAV) pertencente ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS).

Durante as 16 semanas do estágio, compreendidas entre Maio e Agosto, acompanhou-se o manejo reprodutivo dos equinos do CRAV e de clientes particulares, com particular ênfase na realização exames ginecológicos com recurso sobretudo à ecografia e aplicação das mais recentes tecnologias reprodutivas. A nível laboratorial, participou-se na refrigeração/congelamento e recolha de sémen do epidídimo. De salientar que as datas escolhidas para a realização deste estágio coincidiram com o pico da época reprodutiva dos equinos no nosso país.

Além da área de reprodução equina, foi também possível acompanhar as intervenções cirúrgicas no âmbito da unidade curricular de Cirurgia de Espécies Pecuárias e Equinos. Aqui, destacam-se a realização de laparotomias exploratórias em bovinos, resolução cirúrgica de hérnia umbilical em vitelos e resolução cirúrgica de laceração vaginal em equinos.

De igual forma e no contexto das provas de doutoramento do Dr. Luís Athayde, acompanhou-se a realização de cirurgias experimentais em ovinos.

Este relatório tem como objectivo a descrição das actividades desenvolvidas, com particular relevância para a área da reprodução equina, atestando uma vertente prática que complementou de forma bastante enriquecedora os ensinamentos teóricos adquiridos durante o Mestrado Integrado em Medicina Veterinária.

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Paulo Cortez pelo seu perfil profissional e exigente, pela sua disponibilidade, pelos conselhos, pela formação e pela sua dedicação. A ele, o meu reconhecimento e admiração.

Ao Dr. Luís Athayde e ao Dr. Tiago Pessanha, quero manifestar o meu especial apreço, pela forma alegre e profissional com que encaravam o dia-a-dia, pelos conhecimentos transmitidos e pela sua amizade. Quero aqui também deixar o meu reconhecimento à Professora Dra. Ana Collete Mauricio, à Professora Graça Lopes, à Professora Patrícia Pereira, ao Dr. Tiago Pereira e ao Eng. Paulo Ferreira pelo seu carinho e profissionalismo.

Ao Professor Dr. António Rocha, queria agradecer ter comigo partilhado os seus conhecimentos, simpatia e a sua jovialidade.

Ao Professor Dr. Américo Afonso, pelo seu inesgotável apoio e pela amizade.

Ao Pedro e ao Cláudio pelo companheirismo e pela sua disponibilidade.

À Costelinha, por se ter “voluntariado” para ser a minha primeira cobaia.

Aos meus colegas de “barricada” (deve ler-se “de curso”), em especial aos meus amigos Caminha, Duarte, Eme, Gusto, Marcelo e Nandinho.

Aos meus amigos o meu sincero reconhecimento. Especialmente à Andreia, Elsinha, ao Pedro, Sá, Videira, Xavier, Zabe, Zé João e ao Zeca por terem ajudado a tornar este sonho possível.

Ao Tiago, entrei a conhece-lo como colega e sai a admira-lo como amigo.

Gijo, parece que já cá estou....

Ao meu irmão Pedro e à minha cunhada Manuela, por todo o seu apoio.

Ao meu sobrinho Tiago. Os teus sorrisos sempre me animaram e me empurraram para a frente.

Aos meus Pais, pelos seus ensinamentos e pela sua eterna paciência. Mais importante que vencer é nunca desistir.

À minha Lau, que a meu lado nunca me deixou esmorecer mesmo nas alturas mais difíceis. Sem ti, nada disto seria possível....

# Índice

Resumo.....	iii
Agradecimentos.....	iv
1. Introdução.....	1
1.1. Casuística.....	2
2. Revisão bibliográfica.....	6
2.1. Égua.....	6
2.2. Garanhão.....	12
2.3. Doenças Venéreas.....	15
3. Materiais e Métodos.....	16
4. Resultados.....	22
5. Discussão.....	23
6. Bibliografia.....	25
Anexos.....	31

## 1- Introdução

O estágio em reprodução equina foi realizado no Centro de Reprodução Animal de Vairão (CRAV) localizado no Campus Agrário de Vairão do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) no período compreendido entre 4 de Maio a 28 de Agosto de 2009. A orientação deste estágio esteve a cargo do Dr. Paulo Cortez, tendo o Dr. Luis Athayde e o Dr. Tiago Guimarães assumido a co-orientação.

Durante este estágio pretendeu-se acompanhar o dia-a-dia no Centro de reprodução equina, desde o maneio (rufiação, preparação da égua/garanhão para colheita de sémen e a colheita), passando pela realização de ecografias (avaliação do folículo pré-ovulatório, diagnóstico de gestação e detecção de metrites). Paralelamente, acompanhou-se a aplicação das tecnologias reprodutivas usadas no centro, tais como: inseminação artificial (IA) com sémen fresco, refrigerado e congelado; “flushing” para colheita de embriões; transferência embrionária (TE); e recolha e refrigeração/congelamento de sémen do epidídimo. A nível laboratorial, participou-se também na avaliação do sémen (volume, cor, motilidade e concentração) a ser utilizado nas IA e em todo o processo de congelamento do mesmo.

O facto de o estágio ter decorrido numa instalação universitária, permitiu ainda acompanhar outras actividades no âmbito da medicina veterinária.

- Cirurgia de Espécies Pecuárias e Equinos
- Avaliação da qualidade do leite em explorações leiteiras;
- Cirurgia experimental em ovinos para testagem de novos biomateriais.



**Figura I-** Artrodese da articulação metacarpo-falângica

## 1.2 - Casuística

Aqui faz-se um breve resumo das actividades desenvolvidas na área da reprodução equina.

<b>Inseminação Artificial (IA)</b>	
Sémen fresco	9
Sémen refrigerado	5
Sémen congelado	5
<b>IA para recolha de embriões</b>	
Sémen fresco	3
Sémen congelado	2
<b>“Flushing”</b>	5
<b>Transferência de embriões (TE)</b>	4
<b>Exame ginecológico por ecografia</b>	791
<b>Colheita e congelação de sémen do epidídimo</b>	3

**Tabela I-** Actividades na área da reprodução equina

Ao longo do estágio acompanharam-se outras situações que, embora não estando directamente relacionadas com a reprodução equina, contribuíram para o seu enriquecimento académico. Assim, destacam-se:

<b>Resolução cirúrgica de cólica por encarceramento nefro-esplénico</b>	1
<b>Resolução cirúrgica de laceração vaginal</b>	1
<b>Artrodese da articulação metacarpo-falângica de uma burra (Fig. I)</b>	5
<b>Cirurgia experimental em ovinos (Fig. II)</b>	6
<b>Resolução cirúrgica- hérnia umbilical em vitelos (Fig. III)</b>	3

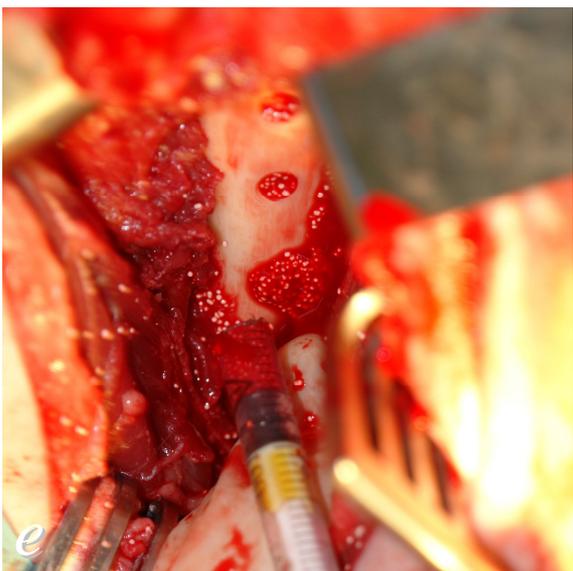
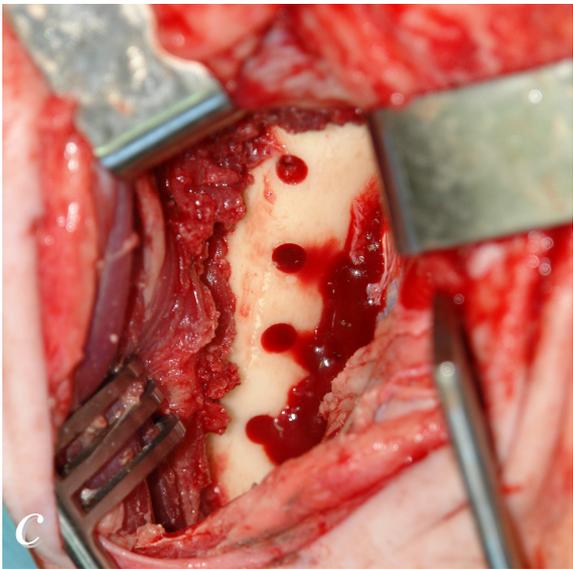
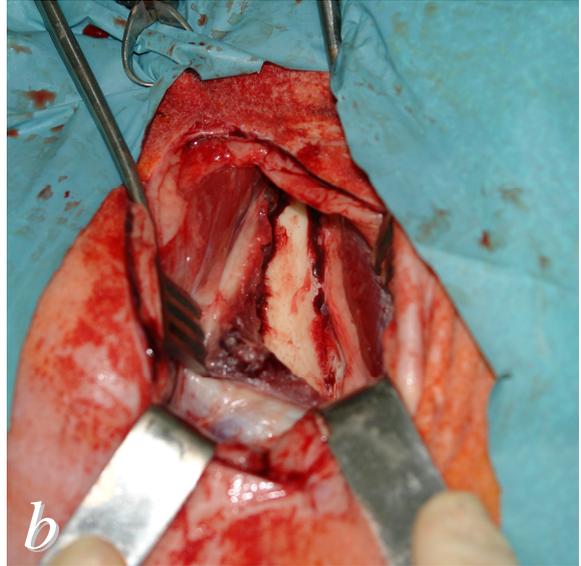
<b>Laparotomia exploratória em bovinos</b>	3
<b>Acompanhamento técnico de uma exploração leiteira com problemas de mamites</b>	2

**Tabela II-** Outras actividades

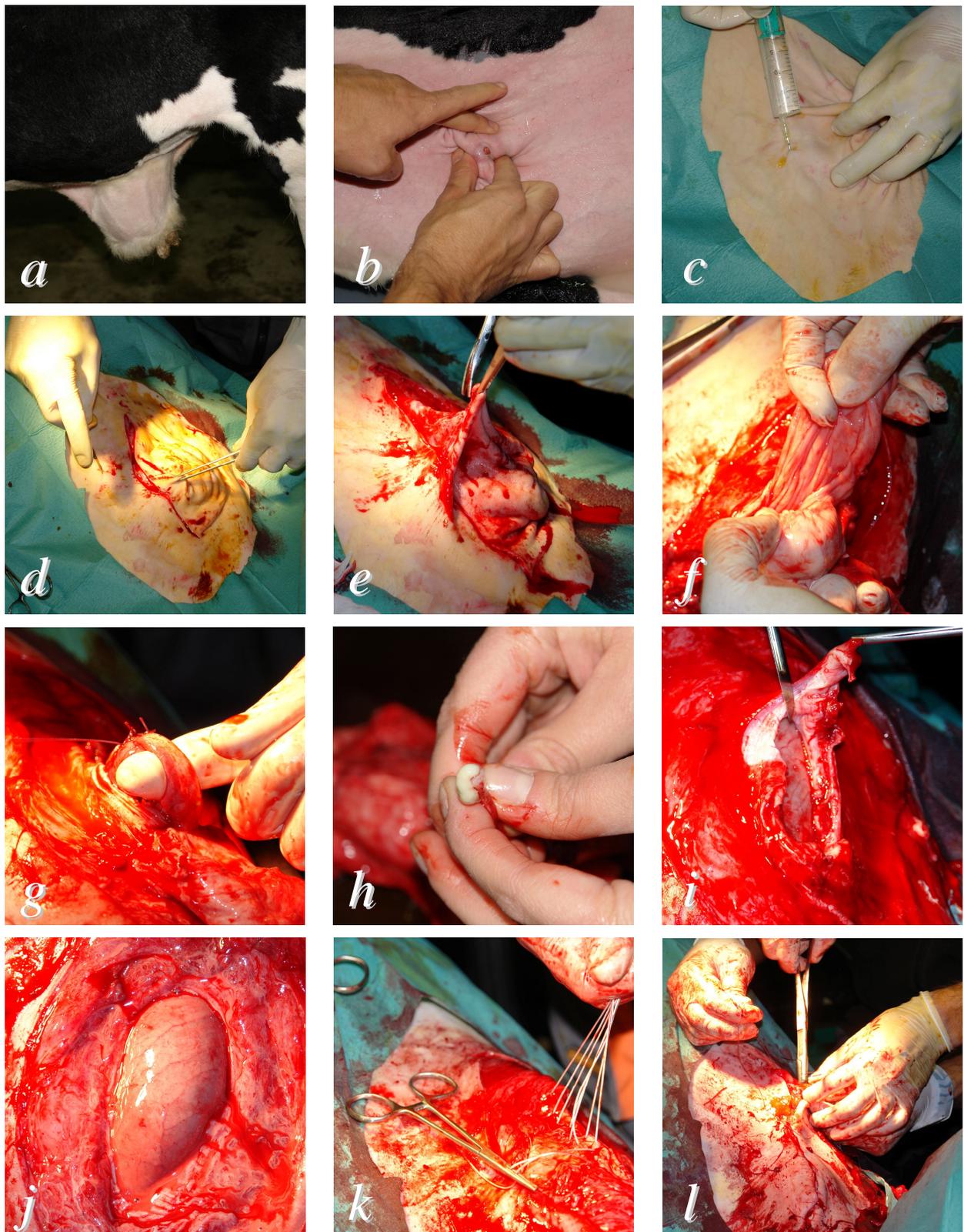
## **Cirurgia experimental**

Para realizar estas cirurgias recorreu-se a ovinos que se encontravam em jejum hídrico e alimentar por 12 e 24 horas respectivamente. Na sedação dos animais utilizava-se xilazina (Rompum<sup>®</sup>) por via endovenosa (EV) na dose de 0.11 mg/KgPV. Na anestesia utilizava-se a combinação tiletamina-zolazepam (Zoletil<sup>®</sup>) endovenoso na dose 6.6 mg/KgPV. A preparação cirúrgica de pele era realizada com povidona iodada a 10%, após a respectiva tricotomia. O primeiro passo consistia na recolha da medula do osso ilíaco com recurso a uma agulha própria para o efeito (Fig. II.a). O acesso ao fémur era realizado através de uma incisão na pele e na fascia lata, expondo-se o fémur com o afastamento craneal do músculo *vastus lateralis*. Seguidamente realizava-se uma incisão no perióstio para expor o osso (Fig. II.b). Com o recurso a uma broca de 3,15 mm de diâmetro perfurava-se o osso até à medula, criando-se 5 defeitos (Fig. II.c). De seguida e após centrifugação da medula colhida, esta era misturada com Bonelike<sup>®</sup> (Fig. II.d). O passo seguinte consistia no preenchimento dos defeitos, sendo que um destes ficava vazio para servir de controlo, enquanto que os outros 4 eram preenchidos com diferentes combinações à base de Bonelike<sup>®</sup> (Fig. II.e).

Este substituto ósseo é composto por uma mistura de hidroxiapatite e fosfato tricálcico. O mesmo procedimento cirúrgico era realizado no membro contra-lateral. Após a cirurgia, eram realizadas mensalmente avaliações radiográficas (Fig. II.f).



**Figura II** a) Recolha de medula óssea do osso ílaco com punção ao nível da tuberosidade coxal; b) Acesso ao fêmur; c) Defeitos ósseos; d) Preparação de Bonelike® com centrifugado da medula; e) Aplicação de Bonelike®; f) Radiografia do fêmur no dia da cirurgia.



**Figura III.** Resolução de hérnia umbilical no âmbito das aulas de Cirurgia das Espécies Pecuárias e Equinos. a) Hérnia umbilical; b) Redução manual da hérnia; c) Anestesia; d) Incisão; e) Desbridamento da pele; f) Desbridamento de aderências ao omento; g) Ligadura de transfixação do cordão umbilical; h) Onfalite purulenta; i) Excisão do anel herniário; j) Aspecto após excisão do anel herniário; k) Sutura horizontal em “U”; l) Sutura subcutânea de aproximação.

## 2-Revisão Bibliográfica

### 2-1 ÉGUA

Em termos de ciclicidade reprodutiva, as éguas são poliéstricos sazonais, existindo uma altura do ano em que a maioria das fêmeas não apresenta actividade reprodutiva (anestro) e um restante período, onde ocorrem ciclos regulares e repetidos, enquanto a égua não ficar gestante (Athayde 2008). No entanto, 10 a 20% das éguas apresentam actividade cíclica durante todo o ano (Athayde 2008; Ginther *et al.* 2004).

O fotoperíodo decrescente durante o Outono e o Inverno resulta num crescimento folicular reduzido, conduzindo a um período anovulatório. O aumento do período de luz durante a Primavera conduz à retoma do crescimento folicular e, eventualmente, a um período ovulatório (Donadeu & Watson. 2006). O início da época reprodutiva está assim associado a um aumento do fotoperíodo, bem como a um aumento da temperatura e da disponibilidade de alimento. No hemisfério norte, a época reprodutiva ocorre geralmente desde Abril até Setembro (Freedman *et al.* 1979; Nagy *et al.* 2000). Assim, é compreensível que a falta de actividade ovulatória durante o Inverno tenha consequências para a economia dos criadores de cavalos desejosos de cobrir as éguas mais cedo durante o ano (Donadeu & Watson 2006).

A transição de Primavera representa a passagem do anestro para a fase de actividade reprodutiva (estro/diestro). Os ovários, até este ponto inactivos, respondem desenvolvendo novos folículos (Youngquist & Threlfall 2007). No entanto, os folículos de transição crescem em tamanho e em número mas regridem sem ovular, mesmo que atinjam tamanho pré-ovulatório (> 30 mm) (Ginther 1990).

Al-zi`abi e colaboradores (2003) apresentaram um estudo em que indicavam que o folículo pré-ovulatório possuía um aumento da vascularização comparativamente aos folículos de transição, sendo este facto essencial para crescimento e saúde do folículo.

Os órgãos envolvidos na função reprodutora das éguas não apresentam apenas alterações fisiológicas mas também são morfologicamente dinâmicos. Os ovários e a genitália tubular (oviducto, útero, cérvix e vagina), são funcionalmente dependentes de uma ligação hormonal com o Sistema Nervoso Central (SNC). A comunicação hormonal entre estes órgãos do sistema reprodutivo e o SNC é essencial para que os eventos que ocorrem na vida reprodutiva de uma égua sejam atempados e rítmicos (Youngquist & Threlfall 2007).

Como já foi referido, o fotoperíodo influencia a actividade dos ovários maioritariamente devido à acção da melatonina. Esta hormona é sintetizada e excretada na hipófise,

predominantemente de noite e pensa-se que actua reduzindo a síntese da hormona libertadora das gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo. No Outono, a redução do número de horas de luz, origina uma diminuição de GnRH e reduz a secreção da hormona luteinizante (LH) e da hormona folículo estimulante (FSH) pela adenohipófise. Os baixos níveis de GnRH resultam numa secreção reduzida de gonadotrofinas que, por sua vez, resultam num crescimento folicular reduzido, com um conseqüente período anovulatório (Donadeu & Watson 2007). Durante o Inverno, a GnRH está na sua concentração mais baixa, devido à diminuição do fotoperíodo e ao conseqüente aumento da síntese de melatonina. Estes eventos são acompanhados por comportamento sexual passivo por parte das éguas em anestro (Youngquist & Threlfall 2007). No entanto, durante este período poderão existir éguas que exibam comportamentos erráticos de estro (McKinnon 2009)

Por outro lado, o aumento do fotoperíodo resulta numa diminuição gradual da síntese de melatonina e aumento da secreção pulsátil de GnRH. A secreção de FSH é conseqüentemente estimulada e a foliculogênese é iniciada.

Na égua, o ciclo éstrico normal dura em média 22 dias, e a duração normal do estro e do intervalo entre estros varia entre 3 a 7 dias e entre 15 a 17 dias, respectivamente (Pycock 2008). Obviamente que um conhecimento profundo do ciclo éstrico da égua é necessário para se elaborar um programa reprodutivo eficiente (Youngquist & Threlfall 2007).

Os eventos da ovulação e conseqüente formação do corpo lúteo (CL), envolvem hormonas sistémicas e locais que sinalizam a degeneração e a morfogênese da teca, da granulosa e de outras células associadas ao folículo pré-ovulatório (Samper *et al.* 2007).

O estradiol de origem folicular é o esteroide predominante no sangue no início do estro. Nesse momento, a progesterona encontra-se em valores basais e a égua deverá começar a evidenciar sinais comportamentais de cio quando estimulada, destacando-se a eversão do clítoris e a micção frequente. Enquanto o folículo predominante cresce e produz mais estradiol (Youngquist & Threlfall 2007), os restantes folículos começam a atrofiar devido à produção de inibina (induzida pelo estradiol) pelas células da granulosa do folículo dominante (Ginther 2000, Ginther *et al.* 2009). Devido à influência do estradiol, a frequência dos pulsos de GnRH aumenta, favorecendo a secreção de LH relativamente à FSH. À medida que a concentração de LH aumenta e o folículo se aproxima da ovulação, as células da teca começam a degenerar e a produção de estradiol começa a decrescer mesmo antes da ovulação (Samper *et al.* 2007)

Segundo McKinnon e Voss (1993), o diestro é o período durante o qual a égua não se encontra receptiva ao garanhão, e por norma começa 24 a 48h após a ovulação. Durante esta

fase, a hormona predominante é a progesterona. Sob a influência da progesterona, os pulsos de GnRH são pouco frequentes e a amplitude de pulso de FSH aumenta relativamente à de LH.

Como já foi referido, a onda folicular primária do ciclo éstrico é caracterizada por um folículo dominante e por vários folículos menores. Para se distinguir entre o folículo em crescimento e os restantes folículos é necessário realizar mais do que uma ecografia (Samper *et al.* 2007). A ovulação ocorre como resultado da resposta do folículo dominante ao aumento da concentração de LH circulante (Youngquist & Threlfall 2007). A ovulação é um processo complexo que envolve uma sequência de eventos que conduzem à ruptura do folículo dominante (>30 mm) na fossa ovulatória e à extrusão do fluído folicular, de células da granulosa e do complexo *cumulus*/ovócito.

A avaliação do diâmetro folicular é um dos principais métodos usados de forma a prever a ovulação. No entanto, as variações do diâmetro folicular pré-ovulatório entre éguas podem tornar este critério pouco rigoroso. O grau de edema uterino pode assim auxiliar, pois a intensidade do edema tende a dissipar-se à medida que a ovulação se aproxima (Cuervo-Arango & Newcombe 2008). O aumento da sensibilidade à palpação dos folículos também é um bom indicador da aproximação da ovulação.

Como o desempenho reprodutivo das éguas é baixo, a terapia hormonal é importante para assegurar a fertilidade e o correcto manejo da prenhez (Squires & McKinnon 1987). Alguns factores do ciclo reprodutivo da égua podem contribuir para a baixa eficiência reprodutiva: a ovulação sazonal, os ciclos erráticos durante o período de transição entre o anestro e o período de ciclicidade normal e ainda a longa fase folicular necessária para o desenvolvimento do folículo ovulatório. Segundo McKinnon (2009), o controlo hormonal do estro e da ovulação numa égua a ciclar normalmente resulta numa resposta mais previsível.

## **Manipulação do ciclo éstrico**

Actualmente existem três métodos básicos de sincronização do estro numa égua: luteólise; prolongamento da fase lútea e indução da ovulação (Samper *et al.* 2007).

### **1- Luteólise**

A Prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) é usada para terminar a fase lútea, causando assim a lise do CL e permitindo o regresso ao estro. Para que a prostaglandina seja eficaz na lise do CL, é necessário que este seja “maduro”, ou seja, que apresente sensibilidade completa à

prostaglandina, a partir do 6º dia pós ovulação. Em média, as éguas regressam ao estro 5 a 7 dias após a administração de prostaglandina e a ovulação ocorre passados 9 a 11 dias (Samper *et al* 2007). Segundo McKinnon, após a administração de prostaglandina, as éguas regressam ao cio 2 a 5 dias depois. Ainda segundo este autor, a PGF<sub>α</sub> pode ser usada como indutor de aborto. Originalmente o uso mais comum dado às prostaglandinas era o de indução do estro em éguas com CL persistente, bem como abreviar o próprio ciclo éstrico (McKinnon 2009). Será conveniente referir que o uso de prostaglandinas podem levar uma contracção da musculatura lisa do aparelho digestivo e de outros órgãos, tendo como consequência o surgimento de diarreias, bem como uma hipersudorese (Mcue 2009).

## **2- Prolongamento da fase lútea**

As progesteronas exógenas são normalmente usadas em programas de sincronização de forma a prolongar a fase lútea (Samper *et al* 2007). Além disso, também podem ser utilizadas para controlo da fase de transição, supressão do comportamento de cio e manejo de gestações de alto risco (Mcue 2009).

## **3- Indução da ovulação**

Para a indução da ovulação e também para encurtar o ciclo éstrico, recorre-se frequentemente ao uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG). O seu uso permite prever mais eficazmente o momento da ovulação (McKinnon 2009). A administração de hCG quando se encontra presente um folículo pré-ovulatório igual ou maior do que 35 mm numa égua em estro, resulta, geralmente numa ovulação passadas 36 +/- 4 horas (Samper *et al.* 2007). No entanto, a eficácia deste tratamento pode depender da fase do ciclo éstrico, do tamanho do folículo e do seu grau de maturação (Samper 2008). Quando o folículo aumenta em tamanho (>30 mm), vai ficando gradualmente menos denso à palpação e, recorrendo-se à ecografia, observa-se que vai ficando cada vez menos circular adoptando uma forma de pêra, com o seu apêx voltado para a fossa de ovulação do ovário (Ricketts 2008).

Prever o momento de ovulação é altamente desejável pois permite: reduzir o nº de inseminações por ciclo; aumentar a precisão da previsão do momento da ovulação quando se usa sémen congelado ou se usa sémen com pouca longevidade; diminuir o número de inseminações

em éguas problemáticas; e maximizar o uso de garanhões com problemas de sub-fertilidade (Samper 2001).

Desde que se provou que a hCG tem propriedades antigénicas, tem-se usado GnRH como alternativa para a indução da ovulação. Deste modo, não se aconselha o uso repetido de hCG em ciclos éstricos sucessivos (McKinnon 2009).

O objectivo da IA é a deposição de um adequado nº de espermatozóides, no momento certo no útero de uma égua (Samper 2008). Após o sémen ser depositado, os espermatozóides têm de ser transportados até ao oviducto, ser mantidos no trato reprodutivo da égua até que ocorra a ovulação, e têm de ser capazes de fertilizar o oócito. A motilidade espermática, as contracções do miométrio e a reacção inflamatória pós-inseminação são factores essenciais para o transporte e sobrevivência dos espermatozóides. Aproximadamente 4 horas após a inseminação, espermatozóides com capacidade fertilizante já se encontram presentes no oviduto (Troedson *et al.* 1998).

Assim, torna-se evidente a importância da previsão do momento da ovulação pois, sobretudo quando se insemina com sémen refrigerado ou congelado, deve ser efectuada o mais próximo possível do momento de ovulação (Samper *et al* 2007). Quando a IA é feita com sémen refrigerado, é essencial que a ovulação ocorra nas 24 horas seguintes. Variações individuais dos garanhões, diferentes diluidores e diferentes sistemas de refrigeração podem causar variações na longevidade do sémen refrigerado não só durante o acondicionamento como no trato reprodutivo da égua (Pycock 2008). As taxas de fertilidade utilizando sémen refrigerado apontam para uma percentagem de gestações entre 60 a 90% (Loomis 2001).



**Figura IV**- Recipientes para sémen refrigerado

A qualidade do sémen, estado sanitário da égua e o seu maneio têm uma importância fulcral quando se recorre à IA com sémen congelado. Nos programas de IA com sémen congelado, não é frequente os veterinários poderem controlar a qualidade do sémen que recebem e, infelizmente, verifica-se que muitas vezes a qualidade desse sémen é inferior à desejada. De forma a aumentar as possibilidades de prenhez, um correcto maneio reprodutivo é crucial (Samper 2001). Nas IA com sémen congelado, é imperativo o uso de um indutor de ovulação de forma a maximizar o uso do sémen através da redução no número de inseminações (Loomis & Squires 2005; Samper 2001).

Embora haja uma melhoria das técnicas de congelamento, cerca de 20% dos ganhões produzem sémen que não cumpre os requisitos mínimos para ser congelado (Samper *et al.* 2007).

Como o sémen congelado deve manter-se viável no tracto reprodutivo da égua por aproximadamente 12 horas, recomenda-se inseminar num período compreendido entre as 12 horas antes da ovulação e 6 horas pós ovulação de forma a não haver um decréscimo da capacidade fertilizante (Samper *et al.* 2007). Segundo Loomis e Squires (2005), o protocolo de inseminação com sémen congelado deve envolver a realização de ecografias diárias durante o estro, indução da ovulação após ser detectado um folículo com dimensões iguais ou superiores a 35 mm e inseminação às 24 e 40 horas pós indução. Usando este esquema, as éguas que ovularem 18 a 52 horas após a administração do indutor de ovulação terão espermatozóides depositados no tracto reprodutivo da égua nas 12 horas que antecedem a ovulação ou nas 6 horas após a ovulação.

Quando se pretende realizar apenas uma inseminação com sémen congelado, é necessário realizar ecografias de 6 em 6 h, para que a inseminação seja realizada 6 h após a ovulação. Tudo isto porque a viabilidade do sémen congelado é reduzida, e a do oócito é de 18 h (Loomis & Squires 2005; Miller 2008).

As palhinhas com sémen congelado podem ser descongeladas de várias maneiras: com baixas temperaturas por um período maior de tempo; ou com temperaturas mais altas num espaço de tempo mais curto. Geralmente as palhinhas de 0,5 ml são descongeladas a 37° durante 30 a 60 segundos (Samper *et al.* 2007).

A descongelação do sémen de uma maneira imprópria (muito rápido ou muito lento para o protocolo de congelamento usado) reduz a sua viabilidade e diminui as hipóteses de se obter uma gestação (Loomis e Squires 2005). Loomis (2001) refere como maiores obstáculos ao desenvolvimento da indústria do sémen congelado: a baixa fertilidade quando comparado com sémen refrigerado; o aumento dos custos associados com o maneio das éguas para IA com sémen congelado; e práticas de marketing desfavoráveis do sémen congelado (Loomis 2001).

Segundo Samper (2008), uma égua que falhe a concepção através de IA com sémen de boa qualidade, mas consiga emprenhar recorrendo à monta natural, é um exemplo de um inadequado manejo reprodutivo de quem realiza a IA.

A Inseminação Artificial deve ser uma técnica eficaz para melhorar a utilização de um garanhão, mantendo na mesma as taxas de prenhez nas éguas (Yates e Whitacre 1988).

## **2-2 GARANHÃO**

Com o rápido desenvolvimento da IA na indústria equina, a avaliação do sémen tornou-se numa parte essencial do conhecimento básico dos veterinários envolvidos na reprodução equina.

De uma forma geral, para um garanhão ser considerado satisfatório deverá: ser livre de defeitos potencialmente hereditários; desordens comportamentais ou doenças sexualmente transmissíveis; não possuir limitações físicas que interfiram com a sua habilidade de cobrição; e ter sémen de qualidade. Deverá no mínimo possuir  $1,1 \times 10^9$  espermatozóides (spz) vivos e morfolologicamente normais no ejaculado para ser considerado como tendo uma fertilidade adequada (Pycock 2008).

Muitos destes problemas, se diagnosticados precocemente e tratados correctamente, resultam num regresso à fertilidade normal (Murchie 2005). A subfertilidade tem um difícil manejo pois existem vários factores que podem estar na sua origem. Sazonalidade, idade, nutrição, obesidade, dinâmicas de grupo e condições ambientais podem interferir com a reprodução (Leblanc 2008).

Historicamente, o garanhão é classificado como “reprodutor de dias longos”, pois a sua capacidade reprodutiva máxima é atingida durante os períodos de aumento de luz natural. Assim, durante a Primavera e o Verão, há um aumento do tamanho e peso testicular, da produção de esperma, da libido e das concentrações plasmáticas de LH, FSH, testosterona, inibina e prolactina (Samper 2000). Assim sendo, o garanhão tem um ciclo endógeno influenciado pela luz natural (Pycock 2008). A avaliação dos testículos em garanhões jovens como exame de compra, seguro de fertilidade no primeiro ano ou fazendo parte do “breeding soundness” é vulgarmente requerido (Blanchard *et al.* 2001).

Embora o eixo hipotalâmico-hipófise do garanhão seja estimulado pelo fotoperíodo de uma maneira semelhante à da égua, não é perceptível o porquê de os garanhões continuarem a sua capacidade reprodutiva durante o Inverno ao contrário do que sucede com as éguas (Samper 2000).

A idade em que os garanhões atingem a puberdade varia dos 12 aos 24 meses (Varner 2008). Por outro lado e segundo Samper (2001), a fertilidade dos garanhões decresce a partir dos 15 anos.

Na fecundação, o espermatozóide e o oócito têm de se fundir antes de dar origem a uma célula diplóide. Esta fusão depende de mudanças complexas na membrana plasmática do espermatozóide. Quando o espermatozóide atinge o trato reprodutivo da égua, são activados factores de capacitação que levam a uma reorientação das moléculas da membrana plasmática, permitindo que este (espermatozóide) se ligue à matriz extracelular do ovócito. Este processo permite a penetração do espermatozóide na zona pelúcida (Gadella *et al.* 2001).

A infertilidade ou a subfertilidade são as queixas relacionadas com a reprodução mais frequentes por parte dos proprietários (Murchie 2005).

Quando a colheita de sémen é pouco frequente, alguns garanhões têm uma redução dramática da longevidade espermática. Para manter a qualidade do sémen num grau óptimo, é recomendado realizar 2 a 3 colheitas por semana. Por outro lado, se as colheitas são feitas diariamente, a concentração espermática pode baixar de forma a levar a um insuficiente número de espermatozoides (Samper 2000).

O uso de vaginas artificiais para recolha de sémen permite a avaliação do sémen antes de se proceder à inseminação (Gamboa *et al.* 2008).

Não existe nenhuma avaliação ou parâmetro que isoladamente sirva para determinar o grau de fertilidade potencial de um garanhão, pelo que é recomendado o uso de vários testes para avaliar uma amostra (Graham 1996; Pycocock 2008). As avaliações de rotina devem incluir no mínimo: volume, concentração e uma estimativa da motilidade progressiva (Graham 1996).

Existem muitas situações em que o sémen deve ser avaliado, entre as quais se destacam (Samper *et al.* 2007): Após a recolha e antes do envio; como parte de um exame de compra; antes de começar a época de cobrição; quando suspeitamos de problemas de fertilidade; e para prever a adequabilidade do sémen ser refrigerado ou congelado.

Para ter uma ideia aproximada da qualidade de um determinado ejaculado, este deve ser avaliado macroscopicamente e microscopicamente.

### **Avaliação do sémen**

Depois do sémen ser recolhido, este deve ser filtrado (partindo do princípio que isso não ocorreu durante a recolha). A avaliação deve ser feita a olho nu para descartar variações de cor

ou de aparência. O sémen deve ser de cor branca a “branco sujo”. Outras cores sugerem alterações patológicas do trato reprodutivo do garanhão (Samper *et al.* 2007).

### **Volume**

O volume médio produzido por um garanhão é bastante variável de indivíduo para indivíduo e durante o ano, podendo ser afectado por vários factores. Um desses factores é o efeito da época. Existem diferenças de até 50% entre o pico da época reprodutiva e a época não reprodutiva. A frequência das recolhas de sémen pode também diminuir o volume produzido, pois um garanhão que é utilizado muito frequentemente evidencia um decréscimo do volume produzido. A idade do garanhão também afecta o volume, aumentando este desde os 2 anos até aos 16 anos (Samper *et al.* 2007). O aumento da frequência de recolhas de sémen pode levar a um aumento do volume e a uma diminuição da concentração e da motilidade progressiva (Sieme *et al.* 2004). Segundo Gamboa e colaboradores 2008, o volume médio nos Puro Sanguê Lusitano (PSL) é de 41,72 +/- 23,72 ml.

### **Motilidade**

A motilidade, é provavelmente o teste mais subjectivo na avaliação do sémen (Rousset *et al.* 1987).

Segundo Robalo Silva e colaboradores (2007), nos cavalos PSL a motilidade mantém-se praticamente inalterada em todas as estações do ano. A percentagem de motilidade progressiva é calculada logo após a recolha de sémen utilizando um microscópio óptico (Jasko 1992).

No entanto e segundo Brinsko e colaboradores (2004), a integridade da membrana citoplasmática dos espermatozóides traduz melhor a fertilidade do sémen que a própria motilidade.

Uma correcta diluição não pode ser conseguida se a motilidade não for determinada, pois são precisos 500 milhões de espermatozóides móveis para uma dose inseminante. De referir que é de grande importância que todas as superfícies, que vão entrar em contacto com o sémen, estejam a uma temperatura aproximada de 37° pois qualquer variação de temperatura pode afectar a motilidade e levar a cálculos incorrectos (Samper *et al.* 2007). Segundo Gamboa e colaboradores 2008, a motilidade progressiva nos PSL é de 41,60 +/- 16,58%.

## **Concentração**

A correcta avaliação da concentração dos ejaculados representa um importante parâmetro pois o número total de espermatozóides está directamente relacionado com a concentração espermática e com o volume (Rigby *et al.* 2001).

As dimensões testiculares (circunferência, altura, largura e profundidade) encontram-se correlacionadas positivamente com a produção espermática diária (DSO) (Kavak *et al.* 2003, Samper *et al.* 2007). A qualidade do sémen é superior quando o garanhão se encontra sexualmente activo (Samper 2008).

Para avaliar a concentração podemos recorrer a um hemocitómetro (câmara de contagem) ou a um espectrofotómetro (Jasko 1992). Segundo Gamboa e colaboradores 2008, a concentração situa-se 241,26 +/- 166,35 x10<sup>6</sup>/ml.

## **2-3 DOENÇAS VENÉREAS**

Muitas bactérias comensais, incluindo a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp* e *Klebsiella spp* encontram-se na parte exterior do pénis do garanhão e não são consideradas patogénicas, podendo ser isoladas no ejaculado (Samper & Tibary 2006). Segundo Blanchard e colaboradores (1992), as infecções venéreas mais importantes incluem a *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e a *Taylorella equigenitalis*.

Segundo um estudo realizado por Ataee (2006), a realização de exames microbiológicos demonstrou a presença de *Pseudomonas spp* (3,2%) e *Klebsiella spp* (2,4%) no clítoris. No útero esses valores eram de 2,9% para os dois agentes.

No entanto, as alterações da flora normal podem originar o crescimento de bactérias oportunistas tais como, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* que se se encontrarem no ejaculado, podem originar redução da fertilidade nas éguas (Samper & Tibary 2006).

A metrite contagiosa equina (CEM) é uma doença provocada pela *Taylorella equigenitalis*. Esta doença caracteriza-se como sendo uma infecção aguda com descarga purulenta durante 2 a 3 semanas, resultando em infertilidade temporária (Del Piero 2007). A *T. equigenitalis* é um coco-bacilo Gram negativo (Carter & Davis 2007, Samper & Tibary 2006). Os garanhões são portadores assintomáticos e podem transmitir a infecção à maioria das éguas que cobrem. A reacção inflamatória inicia-se aproximadamente 24 horas após a colonização pelo agente e atinge uma maior morbidade aos 10/15 dias.

Esta patologia é transmitida pelo coito, pela inseminação artificial ou através de vectores mecânicos (Anónimo 2004).

Como maneo, quando surge um surto de doenças contagiosas devemos (Conboy 2005): Isolar os animais doentes; animais que estiveram em contacto com os animais doentes não devem entrar em contacto com outros animais; diagnosticar a causa da doença o mais rapidamente possível e iniciar uma terapia adequada; limitar o movimento de equipamento e de pessoal ao mínimo indispensável; usar equipamento descartável e pé-dilúvios com desinfectante adequado; evitar o contacto de outros animais com as camas ou os dejectos dos animais infectados; quando obrigatório, reportar o surto às entidades competentes; e notificar todos aqueles que possam ser afectados pelo surto.

### 3- MATERIAIS e MÉTODOS

Durante o estágio, propôs-se avaliar as taxas de concepção dos diferentes regimes de inseminação (sémen fresco, refrigerado e congelado), bem como acompanhar o dia-a-dia do pessoal que intervêm na reprodução equina no Campus Agrário de Vairão do ICBAS UP.

Neste estudo foram utilizadas 11 éguas de raça Cruzada pertencentes ao ICBAS, 5 éguas de raça PSL e 2 de raça Holstein pertencentes a clientes. Estes animais encontravam-se em pasto numa área aproximada de 4 hectares e eram alimentadas com ração duas vezes ao dia, feno e água *ad libitum*. Nas instalações existiam três garanhões: um residente de raça PSL, um temporário de raça Holstein e um usado para detecção de cios.

Os valores obtidos nos resultados finais baseiam-se nas seguintes fórmulas:

**Fertilidade por Ciclo** = N° de gestações / N° de Ciclos explorado

**Percentagem de Éguas gestantes** = Éguas Gestantes / Éguas Totais

**Taxa de Recolha de Embriões** = Éguas Inseminadas / Éguas com Flushing positivo

**Taxa de Gestação (aos 15 dias)** = N° Éguas Receptoras Gestantes / N° Éguas Receptoras

Todas as éguas novas que chegavam eram avaliadas ecograficamente, testado o cio e rastreadas para doenças venéreas através de um exame microbiológico do clítoris (*Taylorella equigenitalis*). Se surgissem éguas positivas, estas seriam colocadas em isolamento e tratadas

com lavagens uterinas, podendo também ser administrado 1 mg de ceftiotur (Excenel®). Seriam realizadas duas lavagens diárias num máximo até dois dias pós ovulação. No caso de se utilizar ceftiotur seria administrada oxitocina 6 horas após o tratamento. Se só se realizassem as lavagens uterinas, a oxitocina era administrada imediatamente após o tratamento. Só reentrariam no manejo reprodutivo após 3 microbiologias uterinas negativas. De referir que não surgiu nenhum caso positivo.



**Figura V-** Zaragatoa para despiste de *T. equigenitalis*



**Figura VI-** Componentes para lavagem uterina



**Figura VII-** Descarga purulenta

Às segundas, quartas e sextas-feiras todas as éguas eram rufiadas com um garanhão designado para o efeito. As éguas eram levadas ao garanhão individualmente de forma a observar os sinais de cio (interesse no garanhão; urinar frequentemente; eversão vulvar; elevação da cauda e abaixamento da garupa) ou ausência destes. Todos os dados eram posteriormente registados. As éguas eram apresentadas ao garanhão primeiro face a face, e depois apresentando-lhe a garupa. Muitas vezes as éguas apresentavam sinais de cio com comportamentos agressivos, o que poderia indicar que estariam a entrar ou a sair do estro. Como regra bastava apresentarem três sinais de cio para se considerarem em estro, desde que não se mostrassem agressivas.



**Figura VIII-** Rufiação

As éguas que se encontrassem em cio eram submetidas diariamente a uma palpação rectal e a um exame ecográfico até à ovulação. O seu diâmetro folicular era definido pela média entre o maior diâmetro e uma linha perpendicular a esta. Durante o período do estágio realizamos 791 ecografias, o que resulta numa média 50 por semana.

No seguimento deste controlo ecográfico, avaliava-se diariamente a evolução do diâmetro folicular e, quando este atingisse um valor igual ou superior a 35 mm, era administrado hCG (Chorulon<sup>®</sup> 1500 U.I., i.v, Intervet) para induzir a ovulação.

No caso de na avaliação ecográfica ser detectado a presença de líquido, era administrado oxitocina (Placentol<sup>®</sup> 3ml i.v.). Nos casos mais crónicos, eram realizadas lavagens uterinas com ou sem administração de antibiótico. Nestes casos, era norma proceder-se a uma citologia e microbiologia uterina.



**Figura IX-** Imagem ecográfica de um folículo pré-ovulatório

Quando se recorria ao sémen fresco, a hCG era administrada aquando da IA. No caso de se utilizar sémen refrigerado, a hCG era administrada 24 h antes da chegada do sémen. De notar que nas IAs com sémen refrigerado é essencial ter a confirmação da data de chegada do sémen de forma a não perder uma ovulação. Quando se utilizava sémen congelado, a hCG era administrada nas mesmas condições, mas a IA apenas ocorria após a ovulação.

Periodicamente ou quando era necessário sémen para inseminar as éguas, procedia-se à sua colheita. Para isso utilizava-se uma égua “manequim” em estro previamente lavada com Betadine® solução espuma (Zona perineal e perivulvar) e contida com peias. Este processo era realizado na sala de recolha, imediatamente contígua ao laboratório. O pénis do garanhão era lavado com água fria e toalhetes de papel. Primeiro deixava-se que o garanhão mostrasse o seu interesse pela égua e, só depois de ter o pénis erecto, lhe era permitido o salto.



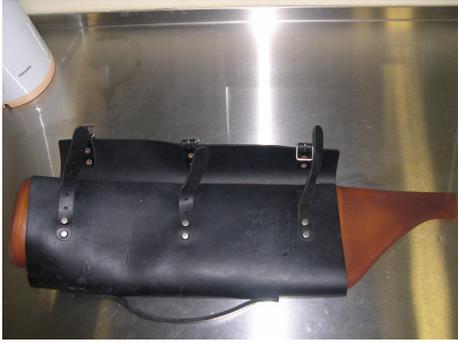
**Figura X-** Preparação da égua para recolha de sémen



**Figura XI-** Recolha de sémen

Na recolha era usual a utilização de uma vagina artificial do modelo Missouri, onde era introduzida água quente de forma a que se atingisse uma temperatura de 45 a 50<sup>0</sup>, simulando assim o interior da vagina da égua. Como curiosidade realçamos a presença nas instalações, de um garanhão que necessitava de temperaturas substancialmente mais altas (60°) para poder ejacular.

Após a recolha, era retirado o filtro com a fracção de gel e o copo de recolha era introduzido no banho Maria ou então sobre a placa de aquecimento de lâminas e lamelas. De seguida era anotado o volume recolhido e a cor.

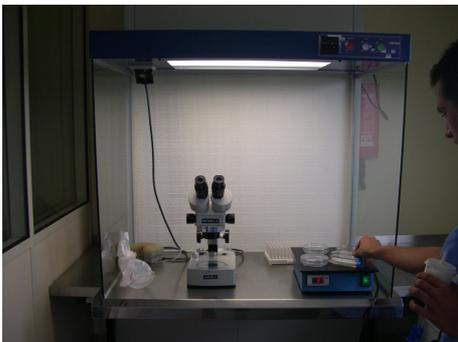


**Figura XII-** Vagina artificial de modelo “Missouri”

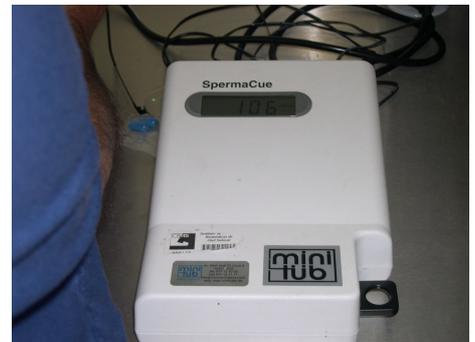


**Figura XIII-** Filtro de sémen

Após a remoção do filtro, procedia-se à avaliação do sémen. A motilidade era calculada em termos percentuais após a visualização da lâmina. Para isso, colocava-se uma gota de sémen numa lâmina que era coberta por uma lamela, sendo ambas previamente aquecidas. O conjunto lâmina-lamela era depois observado ao microscópio, avaliando-se a motilidade em termos percentuais (0 a 100%). Como motilidade progressiva entende-se a percentagem de espermatozóides moveis e que se desloquem progressivamente na mesma direcção pelo campo de observação. Para se obter um valor relativo à concentração colocava-se um pouco de sémen no espectrofotómetro.



**Figura XIV-** Câmara de fluxo laminar, lupa e placa térmica



**Figura XV-** Espectrofotómetro

De seguida, o sémen era utilizado para IA ou então procedia-se à sua refrigeração ou congelação. A refrigeração era realizada com a adição de um “extender” de refrigeração de modo a que a concentração final fosse de 50 milhões de spz por ml. De seguida era colocada num recipiente específico à temperatura de 4°C. Em relação à congelação existem vários tipos de protocolos, sendo que o que utilizamos se encontra descrito no anexo.



**Figura XVI-** Preparação das palhetas para sêmen congelado



**Figura XVII-** Recipiente de nitrogénio

Durante o estágio, também se realizaram algumas colheitas de embriões, transferências e vitrificação dos mesmos seguindo o protocolo proposto por Carnevale 2006. No entanto, as transferências não obtiveram os resultados pretendidos.



**Figura XVIII-** “Flushing” uterino



**Figura XIX-** Filtro para recolha



**Figura XX-** Embrião

## 4- RESULTADOS

### Inseminações Artificiais

Nestes resultados foram incluídas as éguas inseminadas entre 4 de Maio e 30 de Agosto, sendo o seu diagnóstico de gestação realizado 12 a 14 dias após ovulação e, repetido aos 30 dias após ovulação.

	Sémen fresco	Sémen refrigerado	Sémen congelado
N.º de éguas inseminadas	9	5	5
N.º de IAs	13	6	7
N.º de gestações confirmadas	9	2	2
Fertilidade por ciclo	0,76	0,33	0,28
Percentagem (%) de gestações no final da época	78%	16%	28%

**Tabela III.** Resultados (IAs) em 18 éguas

### Transferência de embriões (TE)

Nestes resultados foram incluídas as éguas inseminadas para posterior recolha de embriões, bem como as éguas receptoras e a sua taxa de gestação aos 15 dias.

	<b>Sémen fresco</b>	<b>Sémen congelado</b>
N.º de IAs para recolha de embriões*	3	2
Taxa de recolha (%)	100%	50%
Taxa de gestação aos 15 dias	0%	0%

\* Algumas éguas foram inseminadas repetidamente de forma a proceder-se à recolha de embriões. Outras éguas foram inseminadas com sémen fresco e congelado no mesmo ciclo.

**Tabela IV-** Resultados (TE) em 4 éguas

## 5- DISCUSSÃO

Para se poder fazer uma correcta avaliação dos resultados da época reprodutiva no Campus experimental de Vairão, temos de considerar 2 parâmetros: fertilidade por ciclo e percentagem de gestações aos 15 dias. De referir que algumas éguas foram inseminadas com diferentes modalidades de sémen (fresco, refrigerado e congelado) em diferentes ciclos. Estes resultados referem-se apenas ao período do estágio, não podendo assim ser extrapolados valores concretos da época reprodutiva no Campus Agrário de Vairão.

Segundo Samper (2001) a fertilidade por ciclo com sémen congelado varia entre 30 a 40%. Os resultados obtidos neste estudo (28%), foram ligeiramente inferiores. No entanto, devido à reduzida casuística não se pode extrapolar qualquer conclusão definitiva.

Segundo Sieme e colaboradores (2004) a percentagem média de gestações utilizando sémen refrigerado é de 56,5%. Os resultados obtidos utilizando sémen refrigerado (33%) foram consideravelmente inferiores aos referenciados por estes investigadores (56,5%). Para isso terá contribuído, além da menor casuística, a qualidade do sémen, uma vez que esta se encontrava longe de ser a ideal pois algumas doses apresentavam motilidade progressiva na ordem dos 10%. Se estes cálculos fossem realizados retirando duas éguas PSL de 3 anos que não ficaram gestantes e uma égua cruzada com mais de 25 anos, os valores obtidos seriam aproximadamente de 66 %.

Segundo informações não oficiais recolhidas durante a presente época reprodutiva, não tivemos conhecimento que alguma égua fora do CRAV tivesse ficado gestante utilizando o mesmo sémen refrigerado. Supõem-se que o processo de refrigeração de origem externa ao

CRAV não terá sido o ideal, uma vez que esse mesmo sémen em estado fresco apresentava taxas de fertilidade normais.

A fertilidade por ciclo com sémen fresco situou-se nos 76 %, o que pode ser considerado satisfatório pois nesta modalidade entraram algumas éguas consideradas problemáticas. São assim denominadas porque são éguas velhas, com vários problemas articulares e sem história de gestações prévias. Nestes animais, foram realizadas biópsias do útero. De referir, a presença nas instalações de um garanhão que possui um sémen que levou a uma taxa de gestações muito próxima dos 100%. Este é um caso evidente de que o efeito “garanhão dependente” influencia enormemente as taxas de fertilidade de uma exploração.

As taxas de recolha de embriões apresentaram também valores satisfatórios, uma vez que as recolhas com sémen fresco atingiram os 100%, enquanto que as recolhas com sémen congelado atingiram os 50%. Assim, é fácil perceber que se estes dados fossem calculados em conjunto com as taxas de fertilidade por ciclo, estes apresentariam valores superiores.

Os resultados mais decepcionantes foram os das taxas de gestação após transferência embrionária, onde não se conseguiu nenhum sucesso. No entanto e mais uma vez, a pouca casuística e a utilização de éguas virgens não permite retirar muitas conclusões.

## **Bibliografia**

Al-zi'abi MO, Watson ED, Fraser HM (2003) "Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum" **Reproduction** 125, 259-270

Anónimo (2004) "Animal Disease Factsheets" **The Center for Food Security & Public Health** Iowa State University, Ames, EUA

Ataee O (2006) "A study on microbial flora of clitoris and uterus in Caspian pony mares" **Veterinary European Equine Meeting of the Year 2008**, Veneza, Itália

Athayde 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

Blanchard TL, Kenney RM, Timoney PJ (1992) "Venereal disease" **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 8, 191-203

Blanchard TL, Brinsko SP, Varner DD, Hurtgen JP (2001) "Evaluation of testicular size and function in 1-3-year-old stallions" **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 2001**, San Diego, EUA, 47, 232-23

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" **50<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Denver, EUA

Carnevale EM (2006) "Vitrification of equine embryos" **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 22, 831-841

Carter GR, Davis E (2007) "A concise guide to the microbial and parasitic diseases of horses" **International Veterinary Information Service**, Ithaca, EUA

Conboy HS (2005) "Preventing contagious equine diseases" **51 Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners – AAEP**, Seattle, EUA

Cuervo-Arango J, Newcombe JR (2008) “How reliable is the use of 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 2008 SIVE FEEVA Congress**, Veneza, Itália, 357-358

Cuervo-Arango J, Newcombe JR (2008) “Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors” **Theriogenology** 69, 681-687

Del Piero F (2007) “Infectious diseases – Part 1 and 2” **Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians**, Bolonha, Itália

Donadeu FX, Watson ED (2007) “Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse” **Animal Reproduction Science** 100, 225-242

Freedman LJ, Garcia MC, Ginther OJ (1979) “Influence of Photoperiod and ovaries on seasonal reproductive activity in mares” **Biology of Reproduction** 20, 567-574

Gadella BM, Rathi R, Brouwers JF, Stout TA, Colenbrander TB (2001) “Capacitation and the acrossome reaction in equine sperm” **Animal Reproduction Science** 68, 249-265

Gamboa S, Machado-Faria M, Ramalho-Santos J (2008) “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

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

Ginther OJ (2000) “Selection of the dominant follicle in cattle and horses” **Animal Reproduction Science** 60-61, 61-79

Graham JK (1996) “Analysis of stallion semen and its relation to fertility” **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 12, 119-130

Jasko DJ (1992) "Evaluation of stallion semen" **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 8, 129-148

Leblanc MM (2008) "The chronically infertile mare" **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, San Diego, EUA, 391-407

Loomis PR (2001) "The equine frozen semen industry" **Animal Reproduction Science** 68, 191-200

Loomis PR, Squires EL (2005) "Frozen semen management in equine breeding programs" **Theriogenology** 64, 480-491

Kavak A, Lundeheim N, Aidnik M, Einarsson (2003) "Testicular measurements and daily sperm output of Tori and Estonian breed stallions" **Reproduction in Domestic Animals** 38, 167-169

McCue P (2009) "Advanced topics in hormone therapy" **Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians**, Bolonha, Itália, 105-108

Mckinnon AO (2009) "Hormonal Control of Equine Reproduction" **Proceedings of the AAEP Annual Resort Symposium**, Vail, EUA, 138-174

Mckinnon AO, Voss JL (1993) "The Estrous Cycle" **Equine Reproduction**, 1° Ed, Williams & Wilkins, Baltimore, EUA 114-172

Miller CD (2008) "Optimizing the use of frozen-thawed equine semen" **Theriogenology** 70, 463-468

Murchie T (2005) "Stallion infertility" **Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference**, Orlando, EUA, 267-269

Nagy P, Guillaume D, Daels P (2000) "Seasonality in mares" **Animal Reproduction Science** 60-61, 245-262

Ponthier J, Franck T, Detilleux J, Mottart E, Sertheyn D, Deleuze S (2009) “Association between myeloperoxidase concentrations in equine frozen semen and post-thawing parameters” **Reproduction in Domestic Animals** DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01357

Pycock JF (2008) “Artificial insemination” **Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association**, Moscovo, Rússia, 224-234

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

Ricketts S (2008) “Reproduction Management of the broodmare” **Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association**, Moscovo, Rússia, 212-215

Rigby SL, Varner DD, Thompson JA, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL (2001) “Measurements of sperm concentration in stallion ejaculates using photometric or direct sperm enumeration techniques” **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 2001**, San Diego, EUA 47, 236-238

Robalo Silva J, Agrícola R, Barbosa M, Lopes da Costa L (2007) “Variação Sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sêmen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos” **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** 102, 119-125

Rousset H, Chanteloube P, Magistrini M, Palmer E (1987) “Assessment of fertility and semen evaluation of stallions” **Journal of Reproduction and Fertility Supplement** 35, 25-31

Samper JC (2000) “Reproductive Endocrinology of the Stallion” **Equine Breeding Management and Artificial Insemination** W.B. Saunders Company, Filadélfia, EUA, 41-52

Samper JC (2000) “Stallion Sexual Behavior” **Equine Breeding Management and Artificial Insemination** W.B. Saunders Company, Filadélfia, EUA, 53-61

Samper JC (2000) “Semen Evaluation” **Equine Breeding Management and Artificial Insemination** W.B. Saunders Company, Filadélfia, EUA, 91-108

Samper JC (2000) "Artificial Insemination" **Equine Breeding Management and Artificial Insemination** W.B. Saunders Company, Filadélfia, EUA, 109-131

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

Samper JC, Tibary H (2006) "Disease transmission in horses" **Theriogenology** 66, 551-559

Samper JC, Pycock JF, Mckinnon AO (2007) "The Normal Female Reproductive System" **Current therapy in equine reproduction**, Saunders Elsevier, St Louis, EUA, 1-44

Samper JC, Pycock JF, Mckinnon AO (2007) "Semen Collection and Evaluation" **Current therapy in equine reproduction** Saunders Elsevier, St Louis, EUA, 253-288

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

Samper JC (2008) "Breeding the problem mare by artificial insemination" **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, San Diego, EUA, 408-413

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

Squires EL, Mckinnon AO (1987) "Hormone therapy for control of reproduction in mares and stallions" **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 3, 81-99

Troedsson MHT, Liu IKM, Grabo BG (1998) "Sperm transport and survival in the mare" **Theriogenology** 50, 807-818

Troedsson MHT, Desvouses A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi WC (2005) "Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination" **Animal Reproduction Science** 89, 171-186

Yates DJ, Whitacre MD (1988) "Equine artificial insemination" **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 4, 291-304

Youngquist RS, Threlfall WR (2007) "Clinical Reproductive Anatomy and Physiology of the Mare" **Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2**, 2° Ed, Saunders Elsevier, St Louis, EUA, 47-67

Youngquist RS, Threlfall WR (2007) "Clinical Aspects of Seasonality in Mares" **Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2**, 2° Ed, Saunders Elsevier, St Louis, EUA 68-73

Youngquist RS, Threlfall WR (2007) "Clinical Examination of the Non-pregnant Female Reproductive Tract" **Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2**, 2° Ed, Saunders Elsevier, St Louis, EUA, 74-90

Varner DD (2003) "Methods for evaluation of stallion for breeding soundness" **Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians**, Pisa, Itália

## Anexos

### CONGELAÇÃO DE SÉMEN DE GARANHÃO

- Após a colheita do sémen registrar o volume, motilidade, concentração (spermacue ou hemacitómetro )
- Lâmina para morfologia ( Diff-quick )
- Dois a cinco minutos após a colheita diluir o sémen com o meio de centrifugação (diluyente 1) (1:1).
- Centrifugar em tubos de 50 ml (900 x g durante 15 minutos). Nunca mais de 25 ml por tubo para minimizar as perdas de sémen.
- Preparar as palhinhas -nome do garanhão, laboratório, data.
- Nº de palhinhas =(Concentração total de sémen x 70% de taxa de recolha x % motilidade) / 200 x 10 por palhinha (0,5ml).
- Após centrifugar, retirar o sobrenadante com uma pipeta Pasteur estéril e ressuspender com o meio de congelação (diluyente 2), (volume diluyente 2 = N° palhinhas x 2), toda a amostra para um tubo. Cuidado para não diluir a amostra.
- Preparar caixa com gelo ou acumuladores de frio, colocar o suporte das palhinhas (4 cm de altura).
- Encher as palhinhas, deixando uma coluna de ar (+/- 1 cm), e tapar com esferas metálicas a outra extremidade. Colocar as palhinhas no suporte, deixando um espaço entre elas.
- Encher caixa com azoto líquido (pelo menos 6 cm de altura). Colocar o suporte com as palhinhas durante 20 minutos e depois mergulhá-las no azoto.
- Transferir as palhinhas para um goblet e depois para o contentor de armazenamento.

### DESCONGELAR AS PALHINHAS

- Em banho Maria a 37°C mergulhar as palhinhas durante 1 minuto. Secar as palhinhas com papel. Observar a motilidade ao microscópio.

## PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

### MERK EXTENDER

Diluyente 1:

D-Glicose 60.00 g

Citrato trisódio dihidratado 3.70 g

EDTA sódio 3.70 g

Bicarbonato de sódio 1.20 g

Sulfato de gentamicina 0.25 g

Água desionizada até 1000 ml

Filtrar com filtro de copo 0.2 µm

Diluyente 2:

Diluyente 1 25 ml

Solução de lactose (11 % peso/volume) 50 ml

Gema de ovo 20 ml

Glicerol 5 ml

Equex SMT 0.25 ml