



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Principais fatores que afetam um programa de inseminação artificial em éguas de Puro Sangue Lusitano. Estudo Retrospectivo (2016-2023)

Raquel Alexandra de Jesus Ribeiro

Orientador(es) | Elisa Maria Bettencourt

Susana Monteiro

Cristina Rebelo Marques Bravo Cosinha Gomes Machado

Évora 2024



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Principais fatores que afetam um programa de inseminação artificial em éguas de Puro Sangue Lusitano. Estudo Retrospectivo (2016-2023)

Raquel Alexandra de Jesus Ribeiro

Orientador(es) | Elisa Maria Bettencourt

Susana Monteiro

Cristina Rebelo Marques Bravo Cosinha Gomes Machado

Évora 2024



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ricardo Jorge Romão (Universidade de Évora)

Vogais | Elisa Maria Bettencourt (Universidade de Évora) (Orientador)
Tiago Pessanha Guimarães (Universidade do Porto - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar) (Arguente)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, por serem o meu principal exemplo, por confiarem em mim, apoiarem sempre as minhas decisões, embarcarem nas minhas aventuras, nunca duvidarem de mim e me ajudarem a concretizar o meu sonho desde pequenina. Obrigada pelo apoio incondicional.

Aos meus manos, que são os meus melhores amigos e que estão sempre ao meu lado para me ouvirem, aconselharem e apoiarem.

À minha querida avó Lucinda, por todo o seu amor, por todo o seu apoio e pelas temporadas de estudo em Évora, obrigada por toda a tua ajuda, paciência e alegria.

À Cristiana e a Inês, que são e serão para sempre as minhas grandes companheiras de curso e para a vida, sem vocês o curso teria tido o dobro da dificuldade, obrigada por toda a ajuda, momentos, lágrimas e risos que nunca vou esquecer.

Aos meus amigos do coração pelas pessoas incríveis que são e que tive tanta sorte de me cruzar, obrigada por me mostrarem o verdadeiro significado de amizade.

À minha orientadora, Professora Elisa Bettencourt, pela inspiração e ajuda incansável durante todo este processo e ao longo do curso.

À Dra. Helena Guimarães por toda a paciência e disponibilidade para me ensinar e incentivar a paixão pela reprodução equina. À Dra. Madalena Pinto Cardoso, ao Dr. João Cascais e a Dra. Margarida Guedes por toda a ajuda e disponibilidade.

À Professora Susana Monteiro, por ter sido minha coorientadora na tese e por todos os ensinamentos ao longo do meu percurso académico.

À Dra. Cristina Cosinha, por me ter aceitado e recebido sempre com o sorriso, por toda a disponibilidade, calma e paciência para me ensinar e transmitir tanto conhecimento.

Por último, agradecer à Universidade de Évora e a cidade que me acolheu e me fez sentir sempre em casa durante estes anos, que passou a ser um bocadinho minha também e que vou guardar para sempre.

RESUMO

Principais fatores que afetam a fertilidade num programa de inseminação artificial em éguas de Puro Sangue Lusitano. Estudo retrospectivo (2016-2023).

Neste trabalho, estudaram-se diversos fatores que podem afetar a fertilidade num programa de IA, nomeadamente: ano, mês de IA, idade da égua, tipo de cio, estado reprodutivo, lado e tipo de ovulação, edema pré e pós IA, presença de endometrite, consanguinidade na égua e no garanhão, tipo de sémen, efeito do garanhão e a motilidade do sémen.

A fertilidade foi calculada com base em duas fórmulas (ciclo e época). O mês da IA teve um efeito importante na fertilidade, ao ciclo ($p=0,015$) e por época ($p< 0,001$), assim como o tipo de cio, ($p< 0,001$) e ($p= 0,009$), respetivamente por ciclo e por época. A idade da égua teve um efeito importante avaliada à época ($p<0,001$). Quando avaliada ao ciclo, os seguintes fatores apresentaram efeito importante: lado e tipo de ovulação, presença de endometrite e consanguinidade, todos com ($p=0,003$); efeito do garanhão ($p<0,001$) e o tipo de sémen ($p=0,007$).

Palavras chave: Fertilidade; Reprodução; Égua; Puro Sangue Lusitano; Inseminação Artificial;

ABSTRACT

Main Factors Affecting Fertility in an Artificial Insemination Program for Purebred Lusitano Mares. Retrospective Study (2016-2023).

In this work, several factors that can affect fertility in an AI program were studied, namely: year, month of AI, age of the mare, type of heat, reproductive status, side and type of ovulation, pre- and post-AI edema, presence of endometritis, inbreeding in mare and stallion, semen type, stallion effect and semen motility.

Fertility was calculated based on two formulas (cycle and season). The month of AI had an important effect on fertility, by cycle ($p=0.015$) and by season ($p< 0.001$), as well as the type of heat, ($p< 0.001$) and ($p= 0.009$), respectively by cycle and per season. The age of the mare had an important effect assessed at the time ($p<0.001$). When evaluated by cycle, the following factors had an important effect: side and type of ovulation, presence of endometritis and consanguinity, all with ($p=0.003$); effect of the stallion ($p<0.001$) and the type of semen ($p=0.007$).

Keywords: Fertility; Reproduction; Mare; Purebred Lusitano; Artificial Insemination.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	- 1 -
RESUMO	- 2 -
ABSTRACT	- 3 -
ÍNDICE	- 4 -
ÍNDICE DE FIGURAS	- 7 -
ÍNDICE DE GRÁFICOS	- 9 -
ÍNDICE DE TABELAS	- 10 -
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	- 11 -
I. Introdução	- 12 -
II. Revisão Bibliográfica	- 13 -
1. Fisiologia reprodutiva e exame da égua reprodutora	- 13 -
1.1. Ciclo éstrico	- 13 -
1.2. Regulação do ciclo éstrico	- 14 -
1.3. Época reprodutiva – sazonalidade reprodutiva e períodos de transição	- 17 -
1.4. Exame da égua reprodutora	- 20 -
1.4.1. História reprodutiva	- 20 -
1.4.2. Avaliação da genitália externa	- 21 -
1.4.3. Exame físico	- 24 -
1.4.4. Exame vaginal	- 24 -
1.4.4.1. Inspeção vaginal com espéculo	- 25 -
1.4.5. Palpação transretal	- 28 -
1.4.6. Avaliação ultrassonográfica	- 31 -
2. Maneio do garanhão para utilização num programa de inseminação artificial	- 35 -
2.1. Recolha de sémen	- 35 -
2.2. Análise de sémen	- 38 -
2.3. Processamento do sémen	- 45 -
2.4. Sazonalidade reprodutiva no garanhão	- 50 -
3. Maneio reprodutivo	- 52 -
3.1. Seguimento da égua para IA com sémen fresco, refrigerado e congelado	- 52 -
3.2. Práticas de maneio e manipulação do ciclo reprodutivo da égua	- 55 -
4. Como avaliar a eficácia e eficiência de um programa de IA	- 57 -
5. Descrição de fatores com potencial impacto num programa de IA	- 60 -
5.1. Fatores relacionados com a égua	- 60 -

5.1.1. Época do ano	- 60 -
5.1.2. Idade da égua	- 60 -
5.1.3. Tipo de cio	- 62 -
5.1.4. Estado reprodutivo	- 64 -
5.1.5. Lado e tipo de ovulação	- 65 -
5.1.6. Endometrite	- 66 -
5.1.7. Consanguinidade	- 68 -
5.2. Fatores relacionados com o garanhão	- 69 -
5.2.1. Parâmetros sazonais	- 69 -
5.2.2. Processamento do sémen	- 70 -
5.2.3. Idade do garanhão	- 70 -
5.2.4. Doenças do garanhão que afetam a fertilidade	- 71 -
5.3. Consanguinidade	- 74 -
III- Estudo de caso	- 75 -
1. Objetivos	- 75 -
2. Material e métodos	- 75 -
3. Resultados	- 78 -
3.1. Efeito do ano	- 78 -
3.2. Efeito do mês em que ocorreu a inseminação	- 79 -
3.3. Efeito da idade da égua	- 81 -
3.4. Efeito do tipo de cio	- 82 -
3.5. Número de ciclos seguidos e o número de inseminações	- 83 -
3.6. Efeito do estado reprodutivo	- 84 -
3.7. Efeito do lado e tipo de ovulação	- 85 -
3.8. Efeito da presença de edema pré e pós-IA	- 85 -
3.9. Efeito de endometrite	- 86 -
3.10. Efeito da consanguinidade	- 87 -
3.11. Efeito do garanhão	- 87 -
3.12. Efeito do tipo de sémen	- 90 -
3.13. Efeito da motilidade do sémen	- 90 -
4. Discussão	- 92 -
4.1. Efeito do ano	- 92 -
4.2. Efeito do mês de IA	- 93 -
4.3. Efeito da idade da égua	- 94 -

4.4. Efeito do tipo de cio	- 95 -
4.5. Efeito do estado reprodutivo	- 97 -
4.6. Efeito do lado e tipo de ovulação	- 98 -
4.7. Efeito da presença de edema pré e pós-IA	- 99 -
4.8. Efeito da presença de endometrite	- 99 -
4.9. Efeito da consanguinidade	- 100 -
4.10. Efeito do garanhão	- 101 -
4.11. Efeito do sémen	- 101 -
4.12. Efeito da motilidade do sémen	- 102 -
5. Conclusão	- 103 -
BIBLIOGRAFIA	- 106 -
VI. Anexos	- 117 -
Anexo 1- Folha de registo das éguas	- 117 -
Anexo 2- Descrição do estágio curricular	- 118 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Ilustração da duração e da alteração hormonal existente durante o estro e o diestro no ciclo éstrico da égua. (adaptado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D, 2011).	14 -
Figura 2- Interação hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas. No lado esquerdo, com linhas contínuas, as principais hormonas são exemplificadas quando há um folículo pré-ovulatório. No lado direito, com linhas a tracejado, as hormonas envolvidas quando a estrutura ovariana predominante é o corpo lúteo. (adaptado de Rangel ,2018).	16 -
Figura 3- Efeito do fotoperíodo na ciclicidade reprodutiva da égua. (adaptado de Ransom J.I.,2013).	18 -
Figura 4- Conformação vulvar. A- boa conformação e boa coaptação vulvar; B- boa conformação e má coaptação vulvar. (adaptado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018)	21 -
Figura 5- Recolha de amostras do clitóris. (adaptado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018)	22 -
Figura 6- Relação anatómica da zona perineal da égua, exemplificando os locais de medição. α -ângulo de inclinação; l- comprimento da vulva acima do assoalho pélvico; tl-comprimento total da vulva (adaptado de Pascoe, R.R. 2007).	23 -
Figura 7- A-Exemplo de espéculo vaginal; B- Inserção do espéculo na égua. (retirado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).	25 -
Figura 8- Observação da cérvix com espéculo vaginal. (Autoria Elisa Bettencourt).....	26 -
Figura 9- Observação endoscópica da cérvix da égua. A- Durante o estro; B- Durante o diestro. (Retirado Zent, W.W., Steiner, V.J.,2011).	27 -
Figura 10- A- palpação vaginal; B- muco esbranquiçado característico de diestro. (retirado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).	27 -
Figura 11- Vista lateral dos órgãos reprodutivos e estruturas adjacentes da égua. (adaptado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. 2011).	28 -
Figura 12- Vista dorsal do trato reprodutivo da égua. (adaptado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. 2011).	29 -
Figura 13- Imagem endoscópica da papila ovidutal. (Retirado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. ,2011)	30 -
Figura 14-* Imagem ecográfica do corpo lúteo (CL) (Autoria própria).	32 -
Figura 15- Imagem ecográfica de líquido intrauterino > a 2 cm (Autoria própria).....	34 -
Figura 16- Imagem ecográfica de líquido intrauterino > a 2 cm (Autoria própria).....	34 -
Figura 17- Imagem ecográfica de líquido intrauterino >1cm e ≤ a 2cm (Retirado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).....	34 -
Figura 18- Lavagem do pénis do garanhão antes da recolha de sémen. (Retirado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).....	36 -
Figura 19- Vagina artificial INRA. A- componentes da VA, corpo de plástico rígido externo (a), “liner” de borracha suave interno (b), bacia sanitária (c), frasco de recolha (d); B- VA INRA montada. (Autoria própria).....	37 -
Figura 20- Recipiente de recolha de sémen com o filtro adicionado (à esquerda) e filtro isolado (à direita) (Autoria própria).....	38 -
Figura 21 - A- sémen com cor normal; B- hemospermia (Autoria própria).	39 -
Figura 22- Exemplo de aparelho de medição da concentração por espectrofotometria; B- Enchimento correto da célula de contagem. (Autoria própria)	40 -

Figura 23- Avaliação da motilidade do sémen de forma objetiva- sistema CASA (Autoria própria).....	42 -
Figura 24- Avaliação da motilidade do sémen de forma subjetiva. (Autoria própria).....	43 -
Figura 25- Alterações da morfologia dos espermatozoides. A- espermatozoide normal; B- cabeça destacada; C- cabeça dupla; D e E- anomalia do acrossoma; F- peça intermédia enrolada; G- peça intermédia dobrada; H- gota citoplasmática distal; I- cauda enrolada/dobrada (Coloração <i>MGQuick</i> ampliação 1000x). (Autoria de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).	45 -
Figura 26- Tubo de centrifugação cónico de 50 ml que contém sémen diluído (branco) e o <i>cushion</i> (*). Após a centrifugação, o sémen desloca-se para a área subjacente ao <i>cushion</i> . (→) (adaptado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. 2011).	46 -
Figura 27- Quando uma célula em solução isosmótica (a) é colocada em solução contendo glicerol (G) nas concentrações necessárias para a criopreservação (b), a água sairá da célula (seta grande) a uma taxa mais rápida do que o glicerol se move para dentro da célula (seta pequena) e a célula encolherá (c). À medida que o glicerol entra lentamente na célula e a água volta para dentro da célula mantendo o equilíbrio osmótico, a célula restabelece o seu volume original (retirado de Graham, K.J, 2011).	49 -
Figura 28- Processo de congelação manual. A- Arrefecimento em azoto líquido B- Colocação das palhinhas no contentor de azoto líquido (Autoria própria).	50 -
Figura 29- A égua apresenta sinais típicos de estro: agachar-se com a cauda levantada, urinar e exposição do clitóris. (retirado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. 2011).	53 -
Figura 30- Imagem ultrassonográfica de um folículo pré-ovulatório típico (1 dia antes da ovulação), A parede folicular apresenta as bordas espessadas e perda da forma arredondada. (Retirado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. 2011).	54 -
Figura 31- Folha de registo das éguas após controlo reprodutivo (Autoria própria).	117 -
Figura 32- A- Inseminação artificial com sémen fresco; B- Recolha de sémen recorrendo a vagina artificial e manequim; C- Alimentação de um poldro com leite de substituição. (Autoria própria).....	119 -

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição da casuística pelas áreas clínicas (n= 1328).....-105-

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Sistema de pontuação usado para avaliar a evolução do edema uterino em éguas. (adaptado de McCueC.M.P, Scogging.F.C, Lindholm.R.G.A ,2011 e de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).....	33 -
Tabela 2- Parâmetros de avaliação da eficiência e eficácia reprodutiva. Adaptado de Nath, L. C. (2011)	58 -
Tabela 3- Divisão em classes dos fatores de estudo e sua representatividade em percentagem no presente estudo. (n= 8687)	76 -
Tabela 4- Efeito do ano na fertilidade aos 14 dias (n= 824).	79 -
Tabela 5- Efeito do ano na fertilidade da época (n=447)	79 -
Tabela 6- Efeito do mês na fertilidade aos 14 dias (n=824).....	80 -
Tabela 7- Efeito do mês de inseminação na fertilidade por época (n=447)	80 -
Tabela 8- Fertilidade aos 14 dias em função da idade (n=824).....	81 -
Tabela 9- Fertilidade por época em função da idade (n=447).....	81 -
Tabela 10- Número de ciclos médios seguidos em função da idade (n=446)	82 -
Tabela 11- Efeito do tipo de cio na fertilidade aos 14 dias (n=824)	82 -
Tabela 12- Efeito do tipo de cio na fertilidade por época (n=447)	83 -
Tabela 13- Número de ciclos seguidos por égua por época (n=447)	83 -
Tabela 14- Número de IA´s totais por égua por época (n=445).....	84 -
Tabela 15- Efeito do estado reprodutivo na fertilidade aos 14 dias (n=824)	84 -
Tabela 16- Efeito do estado reprodutivo na fertilidade por época (n=447)	84 -
Tabela 17- Efeito do lado e tipo de ovulação na fertilidade aos 14 dias (n=823)	85 -
Tabela 18- Efeito do lado e tipo de ovulação na fertilidade por época (n=447)	85 -
Tabela 19- Efeito do edema pré-IA na fertilidade aos 14 dias (n=777)	86 -
Tabela 20- Efeito do edema pós-IA na fertilidade aos 14 dias (n=660).....	86 -
Tabela 21- Efeito da presença de endometrite na fertilidade aos 14 dias (n=806).....	86 -
Tabela 22- Efeito da consanguinidade nos ganhões na fertilidade aos 14 dias (n=824).....	87 -
Tabela 23- Efeito da consanguinidade nas éguas na fertilidade por época (n=447)	87 -
Tabela 24- Efeito do garanhão na fertilidade aos 14 dias (n=824).....	88 -
Tabela 25- Efeito do garanhão na fertilidade por época (n=447).....	89 -
Tabela 26- Efeito do tipo de sémen na fertilidades aos 14 dias (n=824)	90 -
Tabela 27- Efeito do tipo de sémen na fertilidade por época (n=447)	90 -
Tabela 28- Efeito da motilidade pré-diluição na fertilidade aos 14 dias (n=454)	91 -
Tabela 29- Efeito da motilidade pós-diluição na fertilidade aos 14 dias (n=344).....	91 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AR- Alter Real

%EMP - percentagem de espermatozoides móveis progressivos

CASA - sistema computadorizado de avaliação do sémen

CEC - carcinoma das células escamosas

CL – corpo lúteo

DT - degeneração testicular

ECE - exantema coital equino

EHV-3 - herpesvírus equino tipo 3

EPPC - endometrite persistente pós-cobrição/reprodução

FSH - hormona folículo-estimulante

GnRH - fator de libertação de gonadotrofinas

hCG - hormona coriónica humana

IA - inseminação artificial

IGF I livre - fator de crescimento semelhante à insulina

IM- intramuscular

IV - intravenoso

LH - hormona luteinizante

LR - lactato de Ringer

MCE - metrite contagiosa equina

mm - milímetros

nº - número

PMNs - neutrófilos polimorfonucleares

PSL- Puro Sangue Lusitano

REF- reprodução equina facilitada

reLH – LH equino recombinante

SC- subcutâneo

SPZ - espermatozoides

VA - vagina artificial

I. Introdução

A inseminação artificial (IA) é uma técnica de reprodução assistida que envolve a introdução do sémen do garanhão diretamente no sistema reprodutor da égua, com o objetivo de alcançar a fertilização e eventualmente uma gestação.¹

A IA foi uma das primeiras tecnologias reprodutivas utilizadas em equinos, e apesar do seu desenvolvimento se ter iniciado muito antes, foi em 1960 que a técnica se tornou amplamente aceita na indústria equina, sendo hoje em dia uma técnica reprodutiva usada em todo o mundo. Apesar de todos os avanços, a fertilidade conseguida por IA continua a ter as suas limitações continuando, por isso, a ser alvo de investigação na atualidade.²

Na maioria das eguadas de grande dimensão, os protocolos de controlo reprodutivo estão associados a indução da ovulação, de modo a diminuir o número de observações por égua, após a verificação por ecografia da existência de um folículo responsivo (>35 mm), é administrado o agente indutor de ovulação. O sémen do garanhão pode ser utilizado fresco, refrigerado ou congelado. Ao utilizar sémen fresco ou refrigerado, a IA é realizada 24h após a administração do agente indutor de ovulação, sendo esta realizada utilizando o método de inseminação intrauterina em que o sémen é introduzido diretamente no útero.¹

Quando é utilizado sémen congelado a IA deve ser realizada no intervalo máximo de 6h após a ovulação. A técnica utilizada é a IA profunda, em que a pipeta de inseminação é colocada diretamente no corno ipsilateral à ovulação.¹

O sucesso de um programa de IA pode ser afetado por diversos fatores, relacionados com a égua, o garanhão e com o manejo reprodutivo.³ A estimativa da fertilidade/subfertilidade é frequentemente associada apenas à qualidade do sémen, estando os fatores associados à égua e ao manejo reprodutivo, menos estudados, apenas porque, na maior parte dos casos, existem menos registos.³ Está descrito que, se a qualidade do sémen não for extremamente baixa, a mesma é responsável por apenas 20-40% da variabilidade na fertilidade média, sendo os fatores associados à égua e ao manejo, responsáveis por 60-80% da variabilidade na fertilidade média.³ Assim, num programa de IA, há necessidade de avaliar parâmetros referentes a todos os potenciais

fatores, para que se encontre a origem da diminuição da fertilidade e deste modo, poderem ser implementadas medidas corretivas e, conseqüentemente, conseguida uma maior rentabilidade.

Neste trabalho começarei por rever alguns aspetos da fisiologia reprodutiva na espécie equina, avaliação da égua, recolha e processamento de sémen e manejo reprodutivo. Serão identificadas as bases para a implementação de um programa de IA, bem como, os fatores que condicionam o seu sucesso. Apresentarei como trabalho de investigação o estudo retrospectivo dos dados de fertilidade num programa de inseminação artificial em éguas Puro Sangue Lusitano (PSL), ramo Alter Real (AR) em 8 épocas reprodutivas.

O principal objetivo deste estudo é a identificação dos principais fatores que podem afetar um programa de IA, nomeadamente o efeito na fertilidade dos seguintes fatores: ano, mês de IA, idade da égua, tipo de cio (normal ou cio do poldro), estado reprodutivo (alfeira, parida ou nulípara), lado e tipo de ovulação, edema pré e pós inseminação, presença de endometrite, consanguinidade na égua e no garanhão, tipo de sémen (fresco, refrigerado e congelado), efeito do garanhão e a motilidade do sémen pré e pós-diluição.

II. Revisão Bibliográfica

1. Fisiologia reprodutiva e exame da égua reprodutora

Antes de iniciar um programa de IA importa conhecer as alterações associadas à fisiologia reprodutiva da égua, nomeadamente o ciclo éstrico, sazonalidade reprodutiva, endocrinologia e alterações ováricas associadas, bem como a alterações comportamentais associadas às diferentes fases do ciclo.

1.1. Ciclo éstrico

O ciclo éstrico, corresponde ao intervalo de tempo que decorre entre uma ovulação e a ovulação subsequente. Nas éguas, apresenta uma duração média de 21 a 22 dias. De modo geral, o ciclo éstrico engloba quatro fases distintas, no entanto na égua apenas se considera a existência de duas fases bem definidas: o estro (fase folicular), período em

que a égua está sexualmente receptiva ao garanhão; e o diestro (fase lútea) período no qual a égua não aceita o garanhão.^{4,5}

Durante o estro, que apresenta uma duração média de quatro a sete dias, a fêmea apresenta comportamento de cio devido à elevada concentração de estrogénios (figura 1) fazendo com que esta se apresente sexualmente receptiva ao garanhão. O trato genital feminino está preparado para aceitar e transportar o gâmeta masculino de encontro ao gâmeta feminino, para possível fertilização, sendo nesta fase que ocorre a ovulação (tipicamente 24 a 48h antes do final do estro).^{4,6}

Durante o diestro (o qual dura em média 14 a 15 dias) ocorre a formação do corpo lúteo (CL) e conseqüentemente, o aumento progressivo da concentração de progesterona (figura 1). A qual é responsável pela alteração comportamental da égua que nesta fase rejeita o garanhão, preparando o trato genital para receber o embrião. Esta fase termina com a regressão do CL e início da próxima fase folicular.^{4,6}

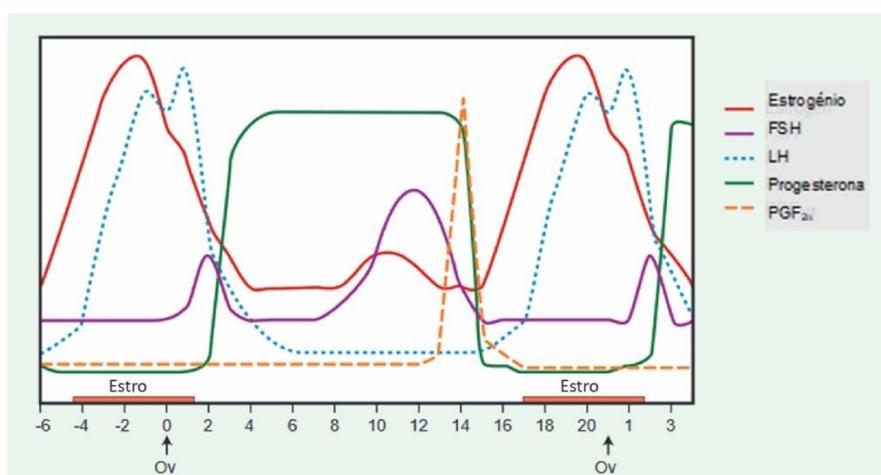


Figura 1- Ilustração da duração e da alteração hormonal existente durante o estro e o diestro no ciclo éstrico da égua. (adaptado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D, 2011).

A regulação do ciclo éstrico é feita através do equilíbrio entre as hormonas produzidas pelo hipotálamo, hipófise, glândula pineal, ovário e endométrio (figura 2), através da coordenação realizada pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovários.^{4,5}

O hipotálamo é responsável pela produção de GnRH (fator de libertação de gonadotrofinas), este é transportado através do sistema porta hipotálamo-hipófise e

libertado diretamente na hipófise anterior (adeno-hipófise) estimulando a libertação de FSH (hormona folículo-estimulante) e de LH (hormona luteinizante) (figura 2).^{4,5}

Estas duas gonadotrofinas entram na circulação sistémica produzindo diferentes efeitos a nível dos ovários. A FSH é responsável pelo recrutamento folicular, iniciando o processo de desenvolvimento de forma síncrona. Nas éguas este processo pode ocorrer em uma ou duas ondas foliculares durante o ciclo éstrico até que ocorre a fase de seleção de um, dois ou, muito raramente, mais folículos que começam a crescer preferencialmente. Nesta fase, associado aos elevados níveis de FSH, ocorre o estabelecimento do folículo dominante que cresce até atingir cerca de 13 mm.^{4,7}

Os folículos em crescimento (sobretudo o folículo dominante) produzem estrogénio e inibina (figura 2). A inibina é responsável pela sinalização da existência de folículos em crescimento, inibindo a libertação de mais FSH pela hipófise (feedback negativo), ocorrendo a diminuição das concentrações de FSH que condiciona o crescimento dos restantes folículos de menores dimensões.^{4,7}

A LH é responsável pela maturação folicular, produção de estrogénio, ovulação e luteinização. Apresenta um papel importante no crescimento subsequente do folículo dominante com produção de elevados níveis de estradiol intra-folicular. Este apresenta maior número de recetores aumentando a sua responsividade e sensibilidade à estimulação pelas gonadotrofinas (FSH e IGF I livre [fator de crescimento semelhante à insulina]) permitindo o seu crescimento apesar dos baixos níveis de FSH. Vai crescer, em média, cerca de 3 mm por dia até um atingir o diâmetro pré-ovulatório que varia de 40-55mm.^{4,7}

Após a destruição do CL (luteólise) ocorre a diminuição progressiva da concentração de progesterona, o que combinado com o aumento dos níveis de estradiol origina um feedback positivo na libertação de LH pela hipófise, ocorrendo assim a ovulação. Ao contrário das outras espécies, os níveis de LH não apresentam um pico pré-ovulatório, mas sim um *plateau*, mantendo os níveis elevados durante o estro e ao longo de vários dias, sendo que a sua concentração máxima é atingida após a ovulação.^{4,6,7}

Após a mesma, ocorre o desenvolvimento do CL no ovário e conseqüentemente a síntese e liberação de progesterona, que no caso de ocorrer fecundação, é responsável por manter as condições ideais para uma futura gestação.^{4,7}

Caso não haja fecundação e reconhecimento materno da gestação, a regulação do tempo de vida útil do CL é feita pelo endométrio através da liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) entre os dias 13 e 16 após a ovulação (figura 1). No caso das éguas, a $PGF_{2\alpha}$ é transportada até aos ovários através da circulação sistêmica, provocando assim a luteólise e permitindo desta forma a iniciação de um novo ciclo (figura 2).^{4,5}

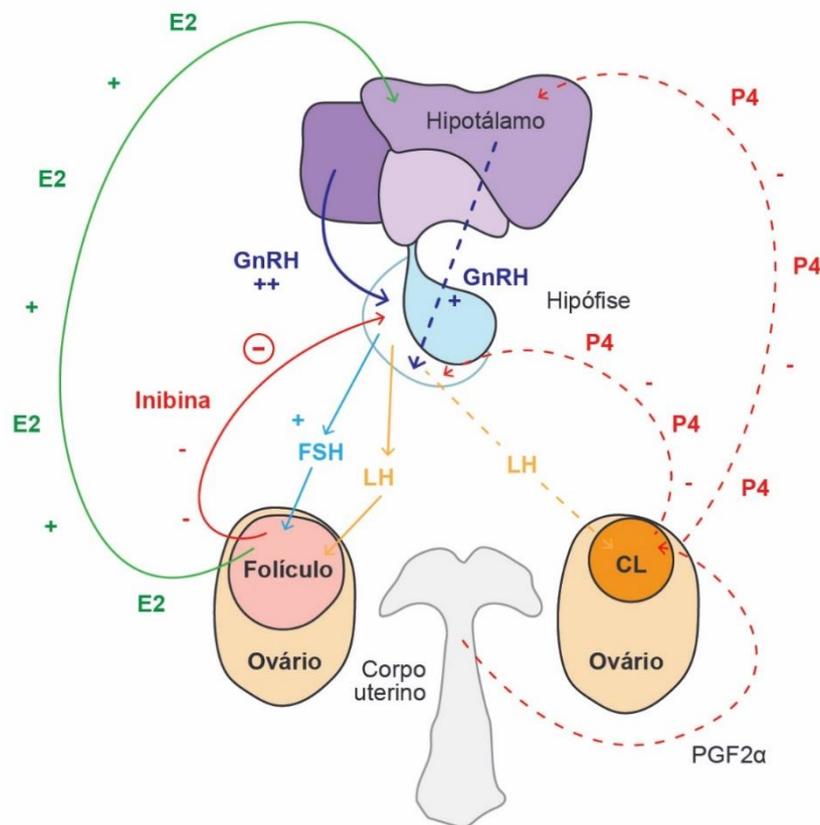


Figura 2- Interação hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. No lado esquerdo, com linhas contínuas, as principais hormonas são exemplificadas quando há um folículo pré-ovulatório. No lado direito, com linhas a tracejado, as hormonas envolvidas quando a estrutura ovariana predominante é o corpo lúteo. (adaptado de Rangel ,2018).

1.3. **Época reprodutiva – sazonalidade reprodutiva e períodos de transição**

Os equinos são uma espécie denominada poliéstrica sazonal, pois apresentam ciclos éstricos espontâneos em intervalos regulares recorrentes durante uma determinada época do ano, designada de época reprodutiva, sendo ativos sexualmente nesta fase.^{4,5,8} Na grande maioria do resto do ano, encontram-se em anestro, que corresponde à fase de inatividade reprodutiva. Entre épocas reprodutivas e fase de anestro, existem duas fases de transição.⁸

O facto das éguas se reproduzirem preferencialmente numa determinada fase do ano é justificado pelo processo de seleção evolutivo da espécie, numa tentativa de minimizar as chances do parto ocorrer durante o inverno, onde a probabilidade de haver escassez de alimento é superior. Desta forma, a altura reprodutiva ideal será na primavera, para que, após 11 meses de gestação, os poldros possam nascer na mesma altura com abundância de alimento na pastagem, tendo sido estes os animais que prevaleceram no processo de seleção natural.⁸

O fotoperíodo, período de duração da luz do dia, é um dos fatores que fortemente influencia o desempenho reprodutivo das éguas.⁴ Isto significa que os equinos, quando expostos a uma quantidade crescente de luz (dias mais longos) apresentam uma resposta positiva dando início à ocorrência de ciclos éstricos, que ocorrem na primavera/verão. Por outro lado, quando expostos a quantidades decrescentes de luz solar (dias mais curtos) que correspondem ao outono/inverno, apresentam uma resposta negativa com diminuição da sua atividade reprodutiva. Desta forma, no hemisfério Norte a época reprodutiva ocorre, geralmente, entre abril e outubro, sendo que no hemisfério Sul esta decorre de outubro a março.^{4,5,7}

O estímulo resultante da ausência ou presença da luz solar é então recebido pela retina, que por sua vez, envia mensagens neurais percecionados pela glândula pineal (figura 3), a qual controla a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-ovário através da produção de melatonina. Esta hormona é produzida pela glândula pineal durante a noite, por isso, quando os dias são mais curtos, ocorre uma maior produção de melatonina que,

nos equinos, inibe a síntese e libertação de GnRH pelo hipotálamo, inibindo todo o ciclo hormonal sexual (anestro).⁵

À medida que os dias se tornam mais longos (época reprodutiva), ocorre uma menor produção de melatonina e conseqüentemente a inibição do eixo é removida, permitindo que a GnRH seja sintetizada e libertada pelo hipotálamo, desencadeando todo o ciclo reprodutivo (figura 3).^{4,5}

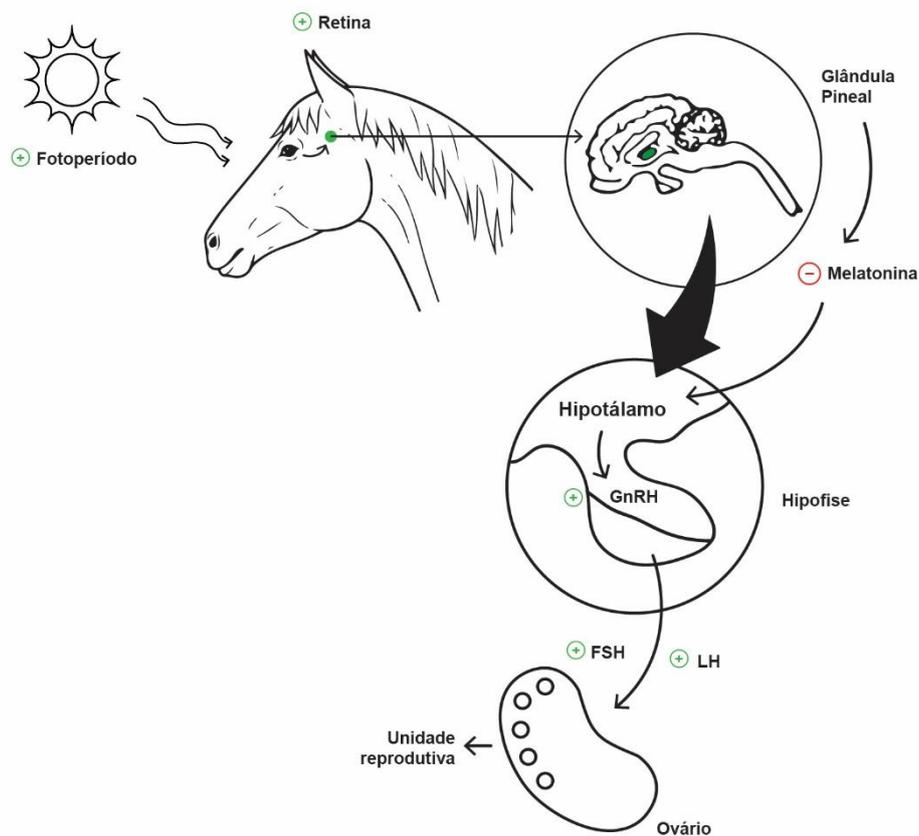


Figura 3- Efeito do fotoperíodo na ciclicidade reprodutiva da égua. (adaptado de Ransom J.I.,2013).

As duas fases de transição existentes entre períodos de atividade e inatividade reprodutiva são a transição de primavera (inverno/primavera) que marca a transição entre o período de anestro e o início da época reprodutiva e a transição invernal (outono/inverno), que marca o final da época reprodutiva, entrando novamente em anestro.⁸

A transição de primavera é caracterizada por um período onde a duração dos dias é crescente e as éguas são expostas a uma maior quantidade de luz, levando à diminuição

da produção de melatonina pela glândula pineal e conseqüentemente ao aumento dos níveis de GnRH, estimulando a hipófise a libertar FSH e LH. A libertação permanece altamente instável, levando ao desenvolvimento de ondas foliculares (maiores e menores) e ao crescimento de vários folículos de grandes dimensões (20-30mm). No entanto, esses folículos são muitas vezes anovulatórios, não ocorrendo a fase de dominância onde um folículo se torna dominante e cresce preferencialmente. Esta fase termina com o aparecimento de uma onda maior ovulatória, devido ao aumento das concentrações de LH e estrogénios, ocorrendo assim a diferenciação do folículo dominante e posteriormente ovulação.^{8,7}

Esta fase está associada a uma maior frustração por parte dos criadores, pois a égua apresenta comportamento de cio, com vários folículos de grande dimensão nos ovários, mas, na maioria das vezes não ocorre ovulação, levando a baixas taxas de concepção ou, no caso de ocorrer ovulação, a uma elevada taxa de morte embrionária precoce, justificada pela manutenção inadequada do CL. Uma época reprodutiva iniciada demasiado cedo pode levar também a maior contaminação uterina e ao desenvolvimento de endometrites, o que requer tratamento adequado e atrasa ainda mais todo o processo.
8

A transição invernal tem menos impacto a nível comercial, pelo que as razões para a diminuição da eficiência reprodutiva não são tão estudadas. No entanto, o padrão é semelhante à transição de primavera, mas desta vez, o comportamento de estro é exibido com menos intensidade. Ocorre o desenvolvimento de um grande folículo, mas não há ovulação devido à baixa da secreção de LH. Outra razão para não ocorrer a ovulação é a presença de um CL persistente, mesmo associado a baixa concentração de progesterona.⁸

Existe ainda uma grande quantidade de éguas que não chega a transitar para o período de anestro e continua com atividade reprodutiva ativa durante todo o inverno.⁹ É importante lembrar que a inatividade reprodutiva sazonal não depende apenas de uma inibição direta de um fotoperíodo curto, sendo condicionada por múltiplos fatores nomeadamente as condições climáticas, a condição corporal das éguas e a presença de garranhões que estimulam a secreção de GnRH.¹⁰

Está estudado que a utilização de protocolos de luz artificial seja com fotoperíodo diário fixo de 16 horas ou gradualmente crescente, aplicado no meio do período de

anestro, resulta na antecipação da época reprodutiva em aproximadamente 2 meses, sendo que os níveis hormonais se mantêm muito semelhantes aos de uma estação reprodutiva desencadeada naturalmente.¹¹

1.4. Exame da égua reprodutora

Este exame é constituído pela (o): história reprodutiva detalhada da égua; exame completo de estado geral; exame da genitália externa; exame vaginal (vaginoscopia e palpação vaginal); palpação transretal e ultrassonografia. Em caso de anomalias ou suspeita de doença, podem ainda ser realizados exames complementares de diagnóstico tais como, citologia, microbiologia e biópsia.¹²

É recomendada a sua realização preventiva em todas as éguas reprodutoras nomeadamente antes do início da época reprodutiva. É pretendido desta forma identificar eventuais problemas e respetivos tratamentos necessários, adequando ao manejo reprodutivo da égua.¹²

A sua realização é particularmente importante em éguas com idade superior a 10 anos, em todas as éguas problema (alfeiras da época anterior, que não ficaram gestantes ao fim de três ciclos reprodutivos ou que apresentam sinais de doença reprodutiva) e num exame de ato compra e venda.¹²

1.4.1. História reprodutiva

A revisão da história reprodutiva da égua é um passo crucial no início do processo de diagnóstico. Essas informações são essenciais para interpretar de maneira significativa as anomalias que possam existir.¹³ Algumas das questões que devemos ter respondidas são: a idade da égua; o estado reprodutivo na época anterior; a paridade (nulípara, múltípara, alfeira); número de ciclos seguidos na época atual e épocas anteriores; números de poldros já nascidos; a existência de complicações em partos anteriores; número de abortos ou nados-mortos; data do último parto; qual a técnica reprodutiva utilizada; quantas vezes já foi coberta ou inseminada; garanhão ou garanhões utilizados; qualidade e tipo de sémen utilizados; existência de secreções vaginais; existência de registo de endometrite e quais os tratamentos já realizados e quando; informações sobre o ciclos

éstricos anteriores e sobre o seu comportamento sexual e resultados de exames laboratoriais já realizados, etc.^{12,14}

1.4.2. Avaliação da genitália externa

Antes de iniciar o exame, é necessário avaliar o comportamento da égua e assegurar a sua adequada contenção no tronco, garantindo assim condições de segurança para o animal e para o médico veterinário (MV).^{12,14} A preparação da área para o exame consiste em enrolar/atar a cauda, a qual deve ser posteriormente elevada sobre a garupa de modo a permitir uma melhor visualização da genitália externa.¹⁴

A avaliação da genitália externa é a primeira etapa do exame da égua reprodutora, consistindo na avaliação da conformação da vulva, do períneo e do ânus.¹⁴

Iniciando pela avaliação da conformação vulvar, a vulva é composta por dois lábios e um clitóris.¹⁵ Os lábios da vulva incluem uma musculatura subjacente que atua no encerramento da abertura vulvar, oferecendo uma camada adicional de proteção contra a entrada de substâncias estranhas. Por conseguinte, a avaliação da conformação vulvar deve verificar a existência de uma boa coaptação dos lábios vulvares (figura 4-A), visto que, quaisquer lesões que levem a incompetência do encerramento da comissura vulvar requerem uma reparação ou reconstrução cuidadosa em éguas reprodutoras (figura 4-B).^{13,14,15} Nesta fase, também são avaliadas as secreções vulvares.¹⁴

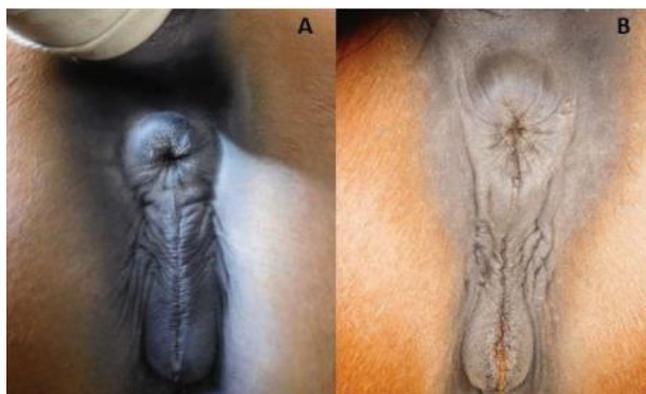


Figura 4- Conformação vulvar. A- boa conformação e boa coaptação vulvar; B- boa conformação e má coaptação vulvar. (adaptado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018)

A integridade da barreira vestibulo-vaginal, a qual desempenha um papel crucial na prevenção da ascensão de infecções uterinas, é verificada através da separação delicada dos lábios da vulva. Na ausência de integridade, ocorrerá uma aspiração de ar, perceptível como um som característico de sucção, aumentando o risco de formação de pneumovagina (ar dentro da vagina).^{13,14}

O clitóris encontra-se ventral à comissura vulvar sendo dorsalmente constituído por três seios clitorianos e ventralmente por uma fossa clitoriana. Tendo em conta o impacto negativo que as doenças venéreas equinas assumem na indústria equina, é fundamental realizar a recolha de amostras (da abertura uretral, fossa clitoriana e seios clitorianos) (figura 5) para pesquisa de agentes através de cultura bacteriológica. Os agentes mais comuns são: a *Taylorella equigenitalis*, a *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.^{13,15}



Figura 5- Recolha de amostras do clitóris. (adaptado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018)

A avaliação da conformação perineal engloba o canal retal, o ânus, o vestibulo, a vulva, o clitóris, além dos músculos superficiais, nervos e pele.¹⁶ A conformação normal do períneo desempenha um papel crucial de proteção do trato genital feminino. Quanto maior o grau de afundamento do ânus, maior é a predisposição à contaminação vulvar durante a defecação, entrada de ar e bactérias, propiciando o desenvolvimento de pneumovagina, urovagina (urina dentro da vagina) e acumulação de líquido intrauterino.^{14,17}

A conformação pode ser classificada segundo o índice de *Caslick*, multiplicando a angulação da vulva em relação à vertical em graus (figura 6- α) pelo comprimento da vulva dorsal ao assoalho do ísquio em centímetros. (figura 6-l).^{16,17}

A localização do assoalho pélvico pode ser determinada fazendo pressão com um dedo de cada lado da vulva para palpar os tecidos mais profundos.¹⁶ A abertura vulvar total deve ter aproximadamente 12 a 15 cm de comprimento (figura 6-tl). Para uma boa conformação perineal, sugere-se que não mais do que 4 cm da abertura vulvar estejam dorsal ao assoalho pélvico (figura 6-l). A angulação da vulva relativamente à vertical não deve ultrapassar os 10 graus (figura 6- α) e cerca de 80 % da vulva deve-se encontrar ventral ao assoalho pélvico.^{16,17}

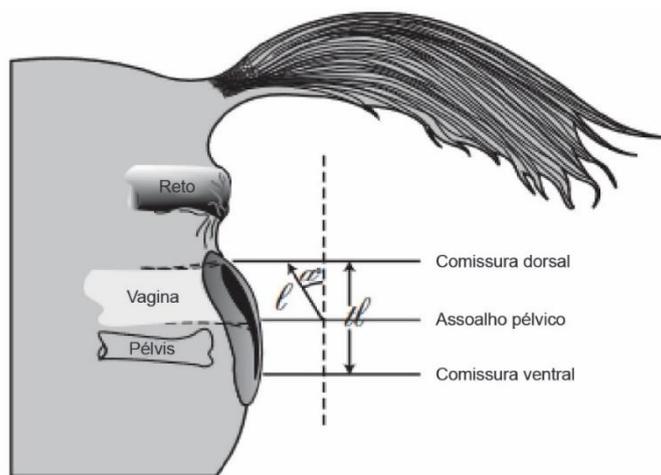


Figura 6- Relação anatómica da zona perineal da égua, exemplificando os locais de medição. α -ângulo de inclinação; l- comprimento da vulva acima do assoalho pélvico; tl-comprimento total da vulva (adaptado de Pascoe, R.R. 2007).

Para interpretação de valores de índice *Caslick*, éguas com uma boa conformação apresentam valores inferiores a 100; com conformação intermediária valores entre 100 a 150; com má conformação apresentam índices superiores a 150. Associada a estes valores verifica-se a necessidade de cirurgia *Caslick* (vulvoplastia).^{16,17,18}

Esta avaliação deve ser realizada durante o estro devido ao maior relaxamento dos tecidos, que permite uma avaliação mais precisa. Ao avaliar éguas com baixa condição corporal ou mais velhas, é necessário considerar que a falta de gordura corporal pode, por

si só, provocar o aumento da angulação vulvar, mesmo tendo esta uma boa conformação.¹⁶

1.4.3. Exame físico

A manutenção de uma boa saúde geral é fundamental para prolongar a vida reprodutiva das éguas. Além de melhorar a sua capacidade de manter a gestação até ao fim, ainda promove o fornecimento de colostro e leite de alta qualidade para o desenvolvimento adequado do poldro.¹⁴

Este deve incluir a avaliação da cor e hidratação das mucosas, tempo de repleção capilar, avaliação do sistema cardiovascular, a avaliação do sistema respiratório, auscultação abdominal e avaliação da condição corporal.^{12,14}

Os vários exames laboratoriais comuns podem ser usados em conjunto com um exame físico para avaliar a saúde geral de uma égua. Além disso, é prudente realizar uma avaliação da conformação para identificar características defeituosas que possam ser potencialmente hereditárias.¹⁴

1.4.4. Exame vaginal

Para a sua preparação a égua deve ser contida no tronco, cumprindo todas as regras de segurança e executando-se sequencialmente as seguintes fases: a remoção das fezes da ampola retal para evitar a contaminação durante o exame; a lavagem da zona perineal e vulvar com uma solução de pH neutro, iniciando sempre a limpeza do centro e progredindo para a periferia; e a secagem da área com compressas estéreis, evitando assim a contaminação do trato reprodutivo.^{12,14}

O exame completo da vagina inclui a inspeção vaginal com espéculo para visualização da cérvix e da vagina, a palpação interna da vagina e da cérvix, adicionando ainda a informação recolhida por palpação retal e ecografia da vagina e da cérvix.¹⁹

1.4.4.1. Inspeção vaginal com espéculo

Nesta fase do exame, é colocada uma pequena quantidade de lubrificante estéril no espéculo vaginal (vaginoscópio) facilitando a sua entrada na cavidade vaginal. Uma luz é usada para iluminar a cavidade através do espéculo, possibilitando a visualização do vestíbulo, vagina e cérvix (figura 7-A e B).¹⁴

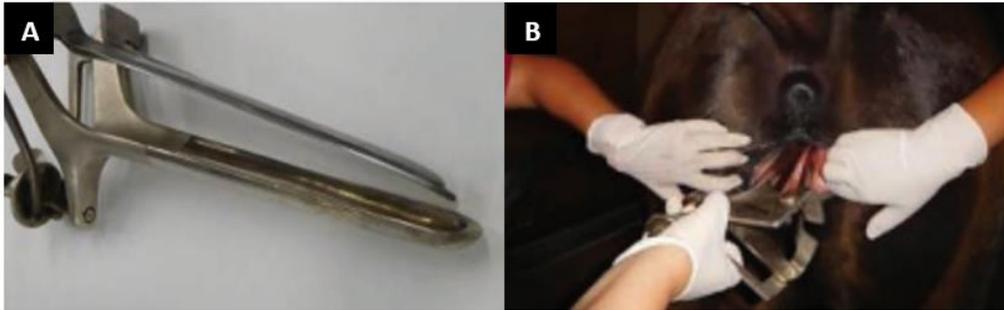


Figura 7- A-Exemplo de espéculo vaginal; B- Inserção do espéculo na égua. (retirado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).

Anatomicamente a vagina é um canal alongado que se estende horizontalmente com orientação dorso ventral de cranial para caudal, por 15 a 20 cm dentro da cavidade pélvica, começando na abertura externa da cérvix até à dobra transversal que cobre a abertura externa da uretra. O seu lúmen é composto por epitélio escamoso estratificado. É altamente elástica e divide-se em duas porções, separadas pelo hímen (se ainda presente) a vagina cranial, localizada dentro da cavidade peritoneal e a vagina posterior, numa posição retroperitoneal.^{15,18}

A vagina armazena secreções bactericidas ácidas a neutras provenientes da cérvix, as quais desempenham um papel de proteção e limpeza. Na presença de restos de espermatozoides (spz) ajudam também na sua eliminação através das suas propriedades espermicidas. A vagina equina não possui glândulas. As variações hormonais ao longo do ciclo reprodutivo da égua exercem controlo sobre a composição precisa da secreção vaginal. Durante o estro, ocorre um aumento significativo da produção deste muco, caracterizado por ser fluido e abundante, já no diestro este muco torna-se espesso apresentando menor quantidade.^{18,20}

Várias anomalias podem ser detetadas neste exame, tais como: hímen persistente, vaginite, cervicite, aderências, lacerações, ruturas, presença de conteúdo purulento ou urovagina. ¹⁴

Este exame permite ainda visualizar a cérvix, localizada na abertura do útero. Sendo um músculo robusto com paredes espessas, desempenha um papel crucial enquanto última barreira do sistema de defesa uterino, prevenindo potenciais infeções (figura 8)^{15,18,20}



Figura 8- Observação da cérvix com espéculo vaginal. (Autoria Elisa Bettencourt).

É preciso considerar que, consoante a fase do ciclo éstrico, este exame deve ser interpretado de maneira diferente. Durante o estro, a cérvix apresenta uma cor rosada, descaída no assoalho vaginal, parece “florescer” na vagina com o seu revestimento edematoso e lúmen aberto (figura 9-A) ^{4,21,22}. Nesta fase do ciclo e em caso de necessidade, é possível realizar a colheita de amostras do endométrio para avaliação citológica.¹²

Durante o diestro, apresenta-se pálida, seca e localizada centralmente na vagina (figura 9-B). ^{4,5} Nesta fase, podem ser colhidas amostras para cultura bacteriana através da biópsia endometrial.¹²

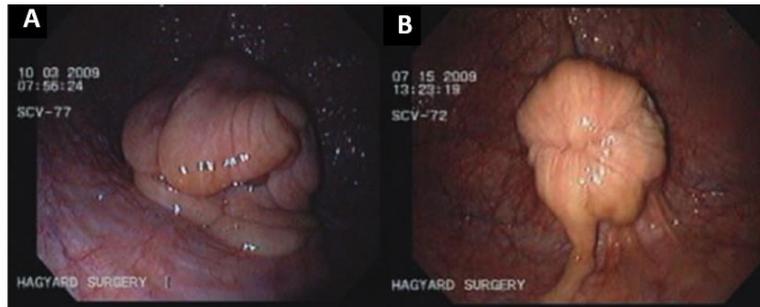


Figura 9- Observação endoscópica da cérvix da égua. A- Durante o estro; B- Durante o diestro. (Retirado Zent, W.W., Steiner, V.J.,2011).

A palpação vaginal é realizada utilizando uma luva e lubrificantes estéreis, permitindo a avaliação da espessura do muco cervical e o grau de relaxamento da cérvix.¹² Para uma melhor avaliação da cérvix, pode ainda ser realizada a palpação digital, onde o dedo indicador é inserido no lúmen cervical e o polegar na parte externa saliente.¹⁴ Durante o estro, a cérvix apresenta-se húmida com secreções fluidas, relaxada, aberta e com uma textura macia. Durante o diestro, a cérvix apresenta-se encerrada e firme ao toque e o muco cervical está esbranquiçado, espesso e pegajoso (figura 10).^{4,5} Este exame permite ainda identificar a presença de hímen persistente, detetar pequenas lacerações na mucosa e aderências luminiais.¹²



Figura 10- A- palpação vaginal; B- muco esbranquiçado característico de diestro. (retirado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).

1.4.5. Palpação transretal

Este procedimento permite a palpação dos órgãos internos reprodutivos da égua, avaliação de sinais de gestação, do tônus da cérvix e do útero, da textura e tamanho dos ovários e da presença de fluido intrauterino. A égua deve ser adequadamente contida e o MV deverá proteger o braço com uma luva de palpação, aplicando gel lubrificante à base de água. Iniciando pela remoção cuidadosa do máximo de material fecal da ampola retal e colón distal. Este exame deve ser abordado de forma sistemática, começando primeiro pela cérvix e seguindo para o útero e ovários. ^{12,14,15}

A primeira estrutura a ser identificada é a cérvix (figura 11) onde se avalia a sua tonicidade, principalmente para auxiliar no estadiamento do ciclo éstrico. Durante o cio, esta apresenta-se relaxada, o que pode dificultar a sua palpação. Durante o diestro, a sua tonicidade está aumentada, facilitando a sua identificação. No entanto, a maioria das alterações anormais que ocorrem na cérvix afetam o lúmen, não sendo facilmente detetáveis neste procedimento. ^{12,14}

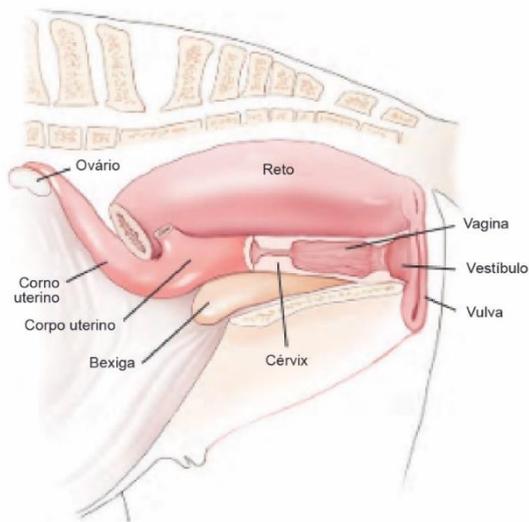


Figura 11- Vista lateral dos órgãos reprodutivos e estruturas adjacentes da égua. (adaptado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. 2011).

A segunda estrutura a ser avaliada, continuando cranialmente, é o útero. Este deve ser avaliado quanto ao seu tamanho, tonicidade, consistência, simetria entre os cornos

uterinos e a presença de conteúdo luminal (figura 11).^{12,14} Anatomicamente o útero da égua é classificado como um útero simples bipartido, caracterizado pelo corpo uterino ser significativamente maior em comparação com os cornos uterinos.¹⁸ É constituído por dois cornos uterinos (20 a 25 cm) ligados por um pequeno ligamento intercornual e um corpo (18 a 20cm) sendo a sua forma designada em forma de Y. Está suspenso pelo ligamento largo na cavidade pélvica e no abdómen e os cornos uterinos encontram-se inteiramente situados na cavidade abdominal a “flutuar”(figura 12).^{15,18,20}

A avaliação inicia-se pela palpação do corpo do útero, prosseguindo para a bifurcação uterina e em seguida para o corno uterino de um lado e depois para o outro. Durante o estro, devido à presença de edema uterino, o útero apresenta uma consistência mais “mole”, enquanto no diestro apresenta-se tónico ao toque, tubular e homogéneo.¹² Este exame permite a deteção de várias anomalias uterinas, incluindo tumores e a presença de grandes quantidades de líquido anormal no útero.¹⁴

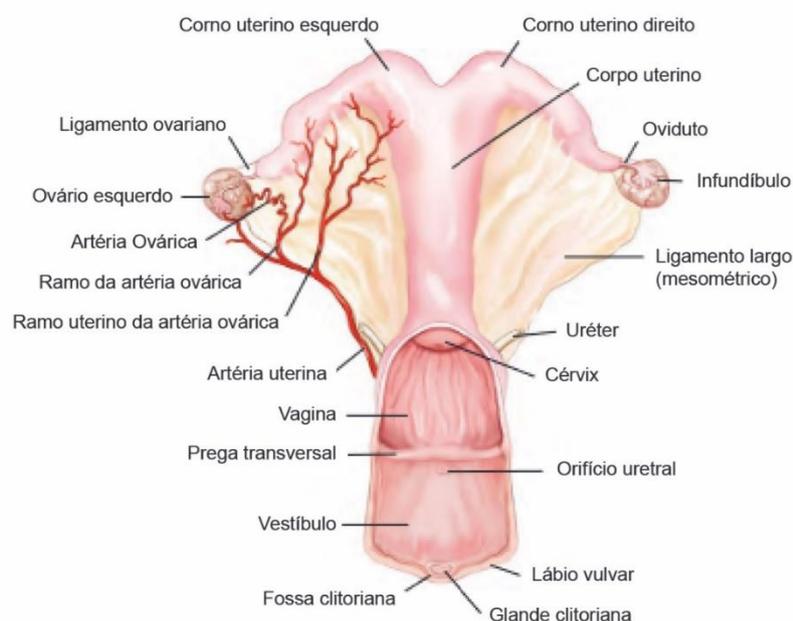


Figura 12- Vista dorsal do trato reprodutivo da égua. (adaptado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. 2011).

Fazendo a ligação do útero aos ovários (não detetados neste exame) estão os ovidutos (figura 12). São longos ductos (20 a 30 cm) divididos em 3 partes: o infundíbulo, a ampola e o istmo. O infundíbulo (figura 12) apresenta uma forma de leque e fixa-se à

superfície lateral do ovário envolvendo a fossa de ovulação, local exclusivo onde ocorre a ovulação nas éguas, permitindo assim a entrada do óvulo no oviduto durante a ovulação. A ampola é a parte central, apresentando uma forma expandida onde corre a fertilização e a clivagem precoce do óvulo fertilizado. Por fim, o istmo apresenta uma forma estreita e muscular, fazendo a ligação da ampola ao corno uterino, funcionando como reservatório de spz e como canal de transporte dos mesmos do útero para a ampola e dos embriões da ampola para o útero. Conecta-se à extremidade do corno uterino através da papila ovidutal, na junção útero-tubárica.¹⁵ (figura 13)



Figura 13- Imagem endoscópica da papila ovidutal. (Retirado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. ,2011)

No final de cada oviduto, encontra-se o ovário correspondente ao lado em que nos encontramos. Normalmente, o ovário esquerdo pode ser mais fácil de palpar devido à sua localização mais caudal do que o ovário direito.¹² Ambos estão localizados na região sub-lombar (figura 12) junto ao rim, suspensos por longos ligamentos largos. No entanto, a sua localização real no corpo apresenta-se bastante variável, devido aos longos ligamentos que permitem uma ampla gama de movimentos e à sua relação com o sistema digestivo.^{15,20}

Anatomicamente são descritos em forma de feijão. O seu tamanho é bastante variável de acordo com a atividade ovárica, sendo maiores durante a época reprodutiva (primavera/verão) e menores fora da época reprodutiva (inverno). O seu tamanho pode variar desde uma “bola de golfe” a uma “bola de ténis”, estando totalmente revestido por uma espessa camada protetora (túnica albugínea), exceto na fossa de ovulação, por onde ocorre a ovulação. Todo o desenvolvimento folicular e do CL ocorre internamente, sendo a fossa de ovulação normalmente palpável.^{15,18} O aumento do seu tamanho pode ser

indicativo de um processo tumoral ou hematoma e a sua diminuição suspeita de hipoplasia. Após a ovulação, ocorre a formação do CL, que não é palpável.¹⁴

1.4.6. Avaliação ultrassonográfica

A avaliação ecográfica do trato reprodutivo da égua é realizada através da palpação transretal, sendo utilizada preferencialmente a sonda linear transretal de 5 MHz permitindo uma visualização mais abrangente do trato reprodutivo. A preparação do exame é semelhante ao descrito para a palpação transretal, acrescentando o cuidado de evitar a entrada de ar para o reto uma vez que a sua presença dificulta a transmissão dos ultrassons. Esta avaliação deve ser precedida de uma palpação transretal completa de forma a localizar previamente os órgãos.^{12,23}

A ecografia deve realizar-se sempre da mesma forma, começando pela cérvix no corte longitudinal, seguindo para o corpo do útero, avançando até a bifurcação uterina, rodando a sonda para obter um corte transversal, seguindo para o corno uterino e ovário recuando novamente até a bifurcação e seguir para o corno e ovário opostos. A concluir o exame, o trato reprodutivo deve ser visualizado mais uma vez. Assim, a sonda deve ser recuada novamente até à bifurcação, corpo uterino, cérvix e depois retirada do reto calmamente. Durante todo o procedimento a sonda deve ser movida lentamente para evitar lesões e manter a imagem centrada no monitor.^{12,23}

Quando examinados, os ovários são de fácil visualização devido ao estroma que apresenta uma ecogenicidade uniforme, apresentando-se no ecrã com coloração branca. Os folículos, sendo estruturas preenchidas por líquido, são visualizados como estruturas circulares, mais ou menos irregulares, de coloração preta (anecóico) (figura 14). A aparência do CL é bastante variável, mas identificável pelo contorno da parede que os permite diferenciar do estroma circundante (figura 15).²³

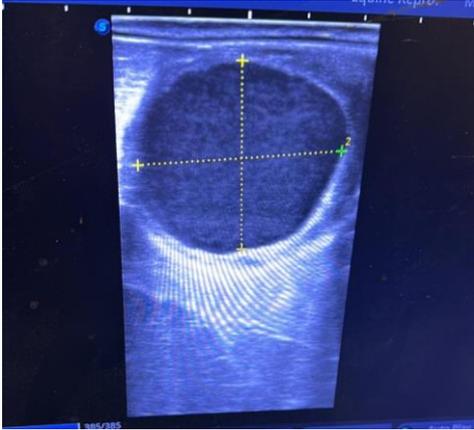


Figura 14- Imagem ecográfica do folículo pré-ovulatório (Autoria própria).



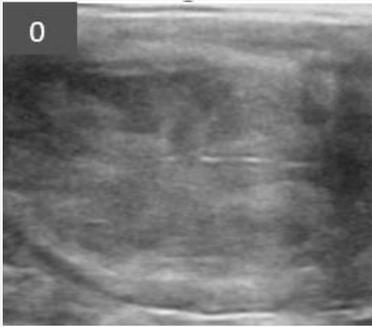
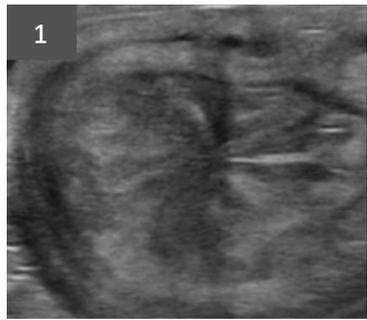
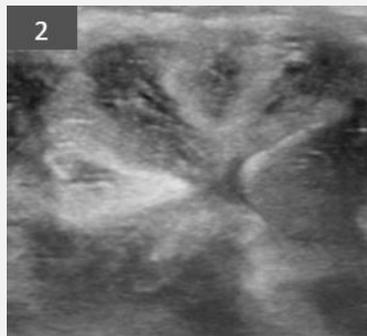
Figura 15-* Imagem ecográfica do corpo lúteo (CL) (Autoria própria).

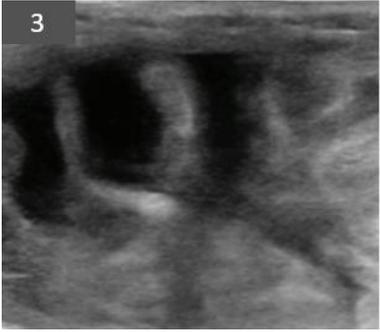
Este exame permite diferenciar éguas que estão reprodutivamente ativas, de éguas sazonalmente em anestro ou em fase de transição. Em estação de anestro, os ovários apresentam-se pequenos e em inatividade. Na fase de transição, normalmente apresentam maiores dimensões com múltiplos folículos em desenvolvimento e inexistência de CL.¹²

O estadiamento da fase do ciclo éstrico é feito com muito mais precisão quando se combina a informação das características ecográficas dos ovários e do útero, com as informações recolhidas através da palpação da textura do útero e da cervix.²³

A ecografia do sistema reprodutor permite então identificar a fase do ciclo éstrico em que a égua se encontra, permitindo avaliar o desenvolvimento folicular e a proximidade da ovulação, assim como a avaliação dos diferentes graus de edema uterino que auxiliam na identificação da fase do ciclo éstrico a partir das características imagiológicas do útero (tabela 1)^{12,23}. Durante o estro, na ecografia do útero, são visíveis pregas endometriais edematosas, produzindo uma aparência de “laranja fatiada” ou “roda de carroça” (edema 1 e 2) (tabela 1), um pequeno volume de líquido normal pode estar presente no útero. Durante o diestro, o útero apresenta-se tónico ao toque, tubular e homogêneo sem edema (edema 0) (tabela 1).^{4,22}

Tabela 1- Sistema de pontuação usado para avaliar a evolução do edema uterino em éguas. (adaptado de McCueC.M.P, Scogging.F.C, Lindholm.R.G.A ,2011 e de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).

Score	Quantidade de edema	Fase do ciclo	Imagem ecográfica
0	Nenhum	Diestro ou Anestro	
1	Ligeiro	Estro precoce	
2	Moderado	Estro 1 a 2 dias antes da ovulação	

3	Intenso	<p>Não é normal durante o estro.</p> <p>Pode estar associado a inflamação uterina.</p>	
---	---------	--	--

A presença de líquido intraluminal uterino deve ser avaliado consoante a sua ecogenicidade, quantidade e fase do ciclo éstrico. ²³

Durante o estro, pequenas quantidades de fluido anecóico livre no útero (< 1 cm) podem ser encontradas em éguas reprodutivamente normais. Quando a quantidade de líquido é superior a 1 cm ou o líquido apresenta maior ecogenicidade, deve ser considerado anormal. Na presença de líquido uterino superior a 1cm e inferior a 2 cm (figura 16), a égua deve ser tratada com ocitocina. Quando a quantidade excede os 2 cm (figura 17), deve ser feito uma lavagem uterina e testes de diagnóstico e tratamentos adequados. No entanto, acumulações de líquido, mesmo que com volume inferior a 1cm e anecóico durante o estro e no período imediatamente pós-ovulação, pode afetar negativamente a fertilidade. ^{23,24}



Figura 16- Imagem ecográfica de líquido intrauterino >1cm e ≤ a 2cm (Retirado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).

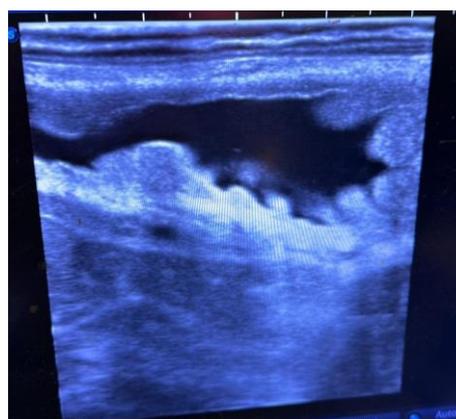


Figura 17- Imagem ecográfica de líquido intrauterino > a 2 cm (Autoria própria).

Durante o diestro, a presença de líquido livre intraluminal deve ser sempre considerada anormal e indicativa de endometrite, estando associada à redução das taxas de fertilidade carecendo de tratamento adequado. ²³

2. Maneio do garanhão para utilização num programa de inseminação artificial

O garanhão é peça fundamental para a realização de um programa de IA, sendo que todas as fases desde a recolha ao processamento do sémen podem condicionar o sucesso ou insucesso do programa. Neste ponto não se pretende descrever os passos referentes ao exame do garanhão, mas apenas aos aspetos que se prendem com a recolha e processamento do sémen para a aplicação num programa de IA. Assume-se que o garanhão quando incluído num programa reprodutivo de uma eguada já terá sido submetido ao exame de reprodutor e cumpre os critérios estabelecidos para a sua aprovação para reprodução equina facilitada (REF).²⁴

2.1. Recolha de sémen

A recolha de sémen é um procedimento imprescindível num programa de IA, sendo através da utilização de uma vagina artificial (VA) e com recurso a um manequim a forma mais segura e eficiente de o fazer. No entanto, a colheita com VA também pode ser feita com o garanhão em estação. A aceitação do manequim por parte do garanhão é geralmente obtida rapidamente após algumas tentativas, mas pode ser necessária a utilização de uma égua em cio ao lado do manequim para facilitar o treino do garanhão. Quanto mais experiência tiver o garanhão, maior será a facilidade em realizar uma colheita.^{25,26} Tendo em consideração o temperamento de cada garanhão, deve ser escolhida a mínima contenção, de forma que o procedimento não esteja associado a estímulos negativos para o animal, mas mantendo sempre as condições de segurança necessárias para todos os envolvidos. ²⁶

Um passo essencial que permite reduzir a contaminação do sémen recolhido é a lavagem prévia do pénis. Este procedimento deve ser feito com água morna (aproximadamente 38° graus) e com papel humedecido, da seguinte forma: o pénis deve ser molhado na totalidade para amolecer os detritos; limpo desde a base do pénis até à glândula (tendo especial atenção a fossa da glândula, local propício para a acumulação de smegma) e seco com papel absorvente no sentido inverso à lavagem (desde a glândula até à base do pénis) (figura 18). Este método ajuda a reduzir a probabilidade de contaminação do sémen e consequentemente, diminui o risco de infeção nas éguas inseminadas. Além disso, a remoção de resíduos é crucial para minimizar possíveis erros na leitura da concentração por espectrofotometria e avaliar a qualidade do sémen.²⁶



Figura 15- Lavagem do pénis do garanhão antes da recolha de sémen. (Retirado de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).

Antes de iniciar a preparação da colheita, é necessário escolher o modelo de VA que se pretende utilizar. Existem vários, sendo que todos se baseiam no mesmo tipo de funcionamento, mas com atributos e particularidades. A escolha é feita com base em requisitos específicos do garanhão e a preferência da pessoa que a vai realizar. Alguns dos modelos disponíveis são a INRA, Hannover, Colorado e Missouri. Deve-se garantir que a vagina está bem montada e que todos os componentes da VA que entram em contacto com o sémen são não espermicidas (figura 19).²⁵

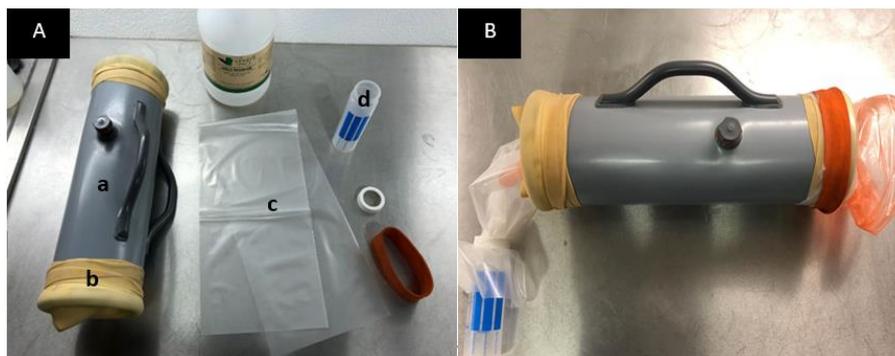


Figura 16- Vagina artificial INRA. A- componentes da VA, corpo de plástico rígido externo (a), “liner” de borracha suave interno (b), bainha sanitária (c), frasco de recolha (d); B- VA INRA montada. (Autoria própria).

Imediatamente antes da recolha, a VA deve ser preenchida com água quente (entre os 45° C a 50°C). Deve ser medida a temperatura interna, que deve variar entre os 44°C e os 48°C, visto que temperaturas acima da temperatura corporal auxiliam na estimulação peniana, facilitando assim a ejaculação. No entanto, a resposta positiva do garanhão à temperatura é individual, podendo haver garanhões que ejaculam mais facilmente quando a VA está a temperaturas mais elevadas (55°C). É necessário ter em atenção que o sémen pode ficar permanentemente danificado quando em contacto com superfícies acima dos 45°C. Nestes casos, deve ser usado um modelo de VA que permita que, aquando da ejaculação, o sémen não entre em contacto com a superfície quente, como por exemplo a Missouri. O preenchimento com água deve ser feito de forma cautelosa, visto que a água é uma substância espermicida e nunca pode entrar em contacto com o sémen.^{25,27}

A pressão deve ser também ajustada, permitindo a entrada de ar dentro da VA, de forma a acomodar a expansão do pénis até a ereção completa. Esta é também uma característica que pode ser ajustada à preferência do garanhão. Após o ajuste de temperatura e pressão, um lubrificante estéril e não espermicida deve ser colocado no “liner” interno, na extremidade proximal da VA e toda a superfície que estará em contacto com o pénis, de modo a reduzir a fricção e o desconforto do garanhão. Acoplada à VA é colocado um recipiente de recolha que deve ser mantido à temperatura corporal. Após a colheita, deve ser transportado imediatamente para o laboratório, de modo a evitar que os spz sofram um choque térmico (excesso de calor ou excesso de frio) com agitação mínima e evitando a exposição do mesmo à luz, correndo o risco de reduzir drasticamente a qualidade do ejaculado.^{25,27,28}

Ao recipiente de colheita de sêmen pode ser adicionado um filtro, como por exemplo, o filtro de micromalha de *nylon* (retém menos spz que os de poliéster e não são absorventes) com intuito de permitir a separação da última fração do ejaculado (fração gelatinosa) aumentando a quantidade de spz no ejaculado (figura 20). Embora, alguns spz possam ficar retidos no gel e/ou no filtro, uma maior quantidade seria perdida se a filtração fosse feita posteriormente, aumentando também o risco de contaminação bacteriana.^{25,28}



Figura 17- Recipiente de recolha de sêmen com o filtro adicionado (à esquerda) e filtro isolado (à direita) (Autoria própria).

2.2. Análise de sêmen

Após a chegada do sêmen ao laboratório, este deve ser rapidamente filtrado de forma a separar a fração gelatinosa do resto do ejaculado, no caso do filtro ter sido adicionado previamente ao recipiente de recolha este deve ser removido. É de extrema importância que todos os materiais que entram em contacto com o sêmen sejam pré-aquecidos à temperatura corporal (37°C) incluindo o diluidor de sêmen, a placa do microscópio, etc. Caso contrário, pode haver uma grande perda da fertilidade do garanhão por causas iatrogénicas.^{25,27}

A análise do sêmen consiste na avaliação dos seguintes parâmetros: cor, volume, pH, concentração espermática e motilidade individual e morfologia.^{25,27} Esta avaliação deve ser feita e registada de forma metódica e completa por uma pessoa experiente de forma que os resultados sejam de elevada confiabilidade.²⁹

Relativamente à cor, o sémen deve apresentar uma cor branca leitosa ou cinzenta (figura 21-A). Alterações de cor podem ser indicativas de alteração do estado de saúde e consequentemente, uma diminuição da qualidade do sémen, como no caso de urospermia (sémen de cor amarela e cheiro a urina) hemospermia (cor avermelhada) (figura 21-B) ou a presença de material purulento no ejaculado. Um sémen normal apresenta-se turvo, estando o nível de turbidez relacionado à concentração espermática. Quanto mais turvo se apresentar, maior será a sua concentração.^{26,29,30}

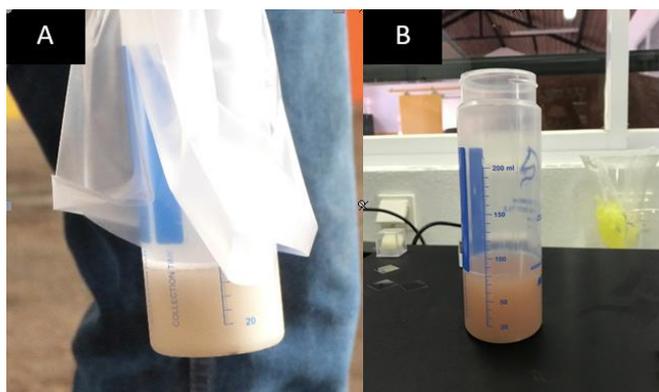


Figura 18 - A- sémen com cor normal; B- hemospermia (Autoria própria).

O volume é determinado, após a filtração, através da colocação do ejaculado num copo graduado e feita a leitura ou pesado numa balança em que cada grama corresponde a um mililitro. Um volume normal varia entre 50 a 120 ml, sendo que a sua variação depende de vários fatores: a idade (aumenta dos 2 aos 16 anos), raça do garanhão, estação do ano (volumes maiores durante época reprodutiva e volumes menores fora da época reprodutiva) número de vezes que o garanhão é colhido, tempo de colheita e o número de provocações pré-copulatórias (quando em excesso, aumentam a secreção das glândulas sexuais acessórias, aumentando o volume e diminuindo a concentração do ejaculado).^{26,29,31}

A medição do pH também é importante, sendo que os valores de referência são entre 7,2 e 7,7. Valores acima destes estão relacionados com um menor número de spz no ejaculado e podem ser indicativos de lesões inflamatórias do trato genital masculino, urospermia ou lubrificante em excesso. Este varia com a estação do ano, frequência de recolha e concentração espermática.^{26,29,30}

A medição da concentração espermática é importante para determinar o número de spz totais no ejaculado e a consequente preparação da dose inseminante. A concentração média varia entre 150 a 200 x 10⁶ de spz/ml. Existem vários métodos para determinar a concentração, como a espectrofotometria, contagem em hemocitômetro, NucleoCounter SP-100 e citometria de fluxo.^{26,29,30}

A medição da concentração através de espectrofotometria (figura 22- A), é o método mais prático e mais rápido, no entanto, também é o método menos preciso, pois não consegue diferenciar os spz de outros tipos de células (detritos, material purulento, sangue ou células germinativas prematuras) levando alteração da absorvância na sua presença. Deve ser feita com sémen puro, tendo especial atenção à presença de bolhas de ar ou de sujidade aquando do enchimento da célula de contagem (figura 22- B), o que pode também prejudicar a leitura. Não deve ser usado quando o sémen apresenta concentrações demasiado baixas (< a 100 x10⁶/mL) ou demasiado altas (> 300 x10⁶/mL).^{26,29,30}



Figura 19- Exemplo de aparelho de medição da concentração por espectrofotometria; B- Enchimento correto da célula de contagem. (Autoria própria)

Na contagem através de hemocitômetro, o mais frequente é o uso das câmaras de *Burker* e de *Neubauer* modificada. É um método mais demorado, mas muito mais preciso, sendo que deve ser utilizado em amostras, com concentração inferior a 100 x 10⁶/mL ou após a adição de diluidores. O NucleoCounter NC-100, incorpora a tecnologia de fluorescência, permite uma contagem rápida, prática e precisa com amostras pouco concentradas ou diluídas. As impurezas no ejaculado e outros tipos de células não

interferem com a sua leitura, tendo como desvantagem o elevado custo do aparelho e o facto de não poder ser usado com amostras não diluídas.^{26,29,30}

O número total de spz (obtido através do produto da concentração do ejaculado com o volume) é uma das medidas mais importantes que usada em conjunto com a avaliação da motilidade nos permite saber o nº de spz móveis totais e com isso estimar o nº de éguas que podem ser inseminadas com cada ejaculado obtido e preparar a dose inseminante correta para cada uma delas. Este depende de vários fatores, incluindo a sazonalidade, número de colheitas, idade, tamanho testicular (estando este altamente correlacionado com o peso testicular e com o número de spz produzidos) existência de doenças reprodutivas, eficiência espermatogénica, etc. Este número varia entre 4 a 12 biliões em garanhões maduros, mas pode ultrapassar os 20 biliões em garanhões que não realizam colheitas frequentemente.^{29,31}

Após a colheita do sémen (2 a 5 minutos após a ejaculação) deve ser sempre adicionado um diluidor, fonte de energia adicional e substratos, de forma a aumentar a sua longevidade e manutenção da viabilidade no decorrer da avaliação. Uma proporção de diluição inicial de sémen/diluyente de 1:1 ou de 1:2 é suficiente se o sémen não for armazenado por mais de uma a duas horas antes da IA. Podem ser adicionados em caso de necessidade antibióticos ao diluidor para auxiliar na eliminação de bactérias que possam contaminar o ejaculado durante a colheita.^{25,26,28,32}

Posteriormente, é realizada a avaliação da motilidade do sémen (o mais rapidamente possível após a colheita) sendo esta crucial para determinar a viabilidade e a qualidade dos spz e conseqüentemente a sua capacidade fertilizante.^{29,33} Esta medição é imprescindível para o cálculo e preparação de uma dose inseminante fértil, de modo a garantir que é utilizado o número adequado de spz (200 e 500x 10⁶ spz móveis progressivos, para sémen congelado e refrigerado respetivamente).³³

Esta avaliação pode ser efetuada de forma objetiva ou subjetiva.^{29,33} Dado a importância desta análise e havendo alguns autores que defendem uma correlação positiva entre a motilidade e a capacidade de fertilização, têm sido desenvolvidas cada vez mais técnicas de avaliação objetiva da motilidade do sémen equino: sistema de avaliação computadorizada (CASA), citometria de fluxo, entre outras.^{26,29} Os sistemas de avaliação computadorizada (CASA) permitem uma análise rápida, automática e fornecem

uma série parâmetros adicionais (percentagem de spz móveis, percentagem de spz móveis progressivos, amplitude de deslocamento lateral da cabeça durante o movimento para a frente, velocidade média por segundo e velocidade curvilínea em micrómetros por segundo), sendo bastante útil e cada vez mais utilizada para uma avaliação pormenorizada (figura 23).²⁹

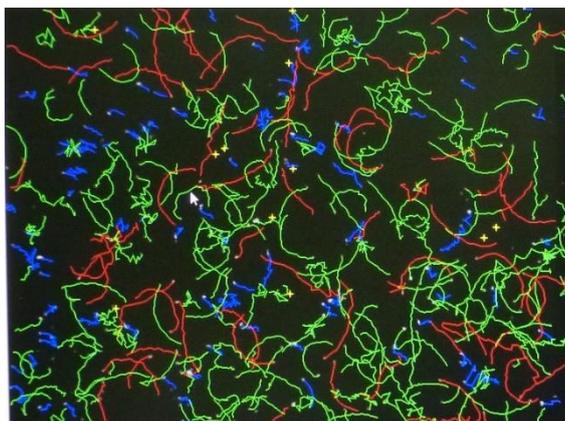


Figura 20- Avaliação da motilidade do sémen de forma objetiva- sistema CASA (Autoria própria).

Dado que estes sistemas são bastante dispendiosos, na maioria das vezes a motilidade do sémen é avaliada de modo subjetivo, através da utilização de um microscópio com platina aquecida a (37°C) (figura 24). Uma gota do sémen é colocada entre a lâmina e a lamela e a observação é feita na objetiva de 10x, 20x e 40x. Pode ser feito com sémen puro ou diluído, sendo que o primeiro apresenta maior tendência a aglutinar, o que pode dificultar a avaliação, levando à subestimação ou sobrestimação por dificuldade de visualização dos spz individuais por excesso concentração. Normalmente, é feita inicialmente como controlo do efeito potencial do diluidor. É muito importante utilizar sempre o mesmo volume (5 a 10 µl) e com concentrações semelhantes (25-50x 10⁶ spz/mL) para diminuir a possibilidade de erro na leitura do observador. Devem ser observados diferentes campos (4 a 6) ao redor do centro da lâmina e ter atenção à existência de bolhas de ar na mesma que podem prejudicar a avaliação.^{26,29,33}

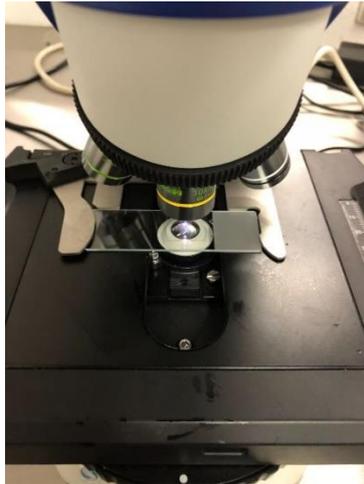


Figura 21- Avaliação da motilidade do sémen de forma subjetiva. (Autoria própria).

Esta avaliação permite avaliar a motilidade total, que se caracteriza pela percentagem de spz móveis (independentemente do tipo de movimento), sendo que a motilidade progressiva, que é a percentagem de spz móveis progressivos (que apresentam movimento rápido e linear) e a velocidade dos spz (numa escala arbitrária de 0 a 4, em que 0 é imóvel e o 4 é motilidade rápida) são muitas vezes mais subjetivas, e raramente quantificadas na prática clínica.^{26,29,33} Apesar de subjetivo, é o método mais utilizado, tendo um maior grau de fiabilidade quanto maior for a experiência do observador em análise de motilidade espermática.^{29,30}

Quando avaliado sémen refrigerado e congelado as limitações das técnicas de avaliação da motilidade (microscopia e CASA) tornam-se mais evidentes, uma vez que a qualidade e o número de spz para a inseminação são frequentemente limitados quando comparado com o sémen fresco.³⁴

Existem vários fatores que podem influenciar a motilidade espermática, uns relacionados diretamente com o ganhão, como a idade (puberdade e geriátricos), o estado de saúde (processos inflamatórios, febre, processos degenerativos, trauma testicular), a sazonalidade (no início da época reprodutiva geralmente a motilidade é mais baixa) e causas iatrogénicas associadas à manipulação (como o uso excessivo de gel lubrificante na VA e a temperatura de todos os materiais que contactam com o sémen).²⁶

Por último, deve ser realizada a avaliação morfológica dos spz, sendo estes classificados como normais e anormais. As formas anormais são classificadas quanto ao tipo de anomalia (cabeças soltas, defeitos de cabeça, perda ou anomalia de acrossoma, gota citoplasmática proximal e distal, defeitos da peça intermediária e caudas enroladas)(Figura 25) sendo que um elevado número de anomalias está associado a subfertilidade ou até mesmo à infertilidade.^{26,34,35} É então, um exame útil para avaliar a qualidade do sémen e pode ajudar na identificação de problemas como a inflamação testicular, stress térmico, espermatogênese anormal, degeneração testicular, visto que todos alteram a morfologia dos spz.³⁰

A avaliação é feita em esfregaços de sémen corados (com colorações de eosina-negrosina ou *MG Quick*, entre outras) e vista ao microscópio ótico com uma ampliação de 1000x com a objetiva de imersão em óleo. Esta avaliação também pode ser feita sem coloração, através da imobilização dos spz (diluídos em formol salino ou numa solução de glutaraldeído a 0,2% em solução tampão) com recurso a microscopia de contraste de fases. Estudos indicam que este método reduz a ocorrência de artefactos visualizados com frequência em lamínas coradas.³⁰

Devem ser observados no mínimo 100 spz, mas idealmente entre 200 a 300 spz e registada a sua classificação morfológica. A manipulação incorreta da amostra pode levar a alterações da morfologia e conseqüentemente à classificação incorreta do ejaculado por causas iatrogénicas (calor, frio, choque hiposmótico). As anomalias da cabeça são classificadas como mais incapacitantes a nível reprodutivo do que as da peça intermediária e estas mais graves que as da cauda. Na generalidade dos casos, um ejaculado é considerado normal se não tiver mais que 30% de anomalias nem mais que 10% da mesma anomalia, no entanto, é imprescindível uma avaliação caso a caso.^{26,29,30}

Para uma avaliação do sémen mais avançada e pormenorizada, estão ainda disponíveis testes de avaliação da longevidade, bacteriologia e citologia, teste de inchaço hiposmótico, coloração de mortos-vivos e ainda a utilização de tecnologia fluorescente (estado acrossomal, capacitação e integridade do DNA). Apesar da disponibilidade de múltiplas análises que podem ser feitas ao sémen, é importante referir que a baixa qualidade do mesmo está normalmente associada à subfertilidade, mas um sémen de boa qualidade não assegura necessariamente fertilidade. Para esta observação contribui o

facto de ainda não haver uma compreensão completa de todos os elementos necessários para que um spz cumpra com sucesso o seu papel de fertilização. No futuro, poderá ser possível prever a fertilidade do garanhão com base na sua análise genómica, o que facilitará o sucesso dos programas de IA. ³⁰

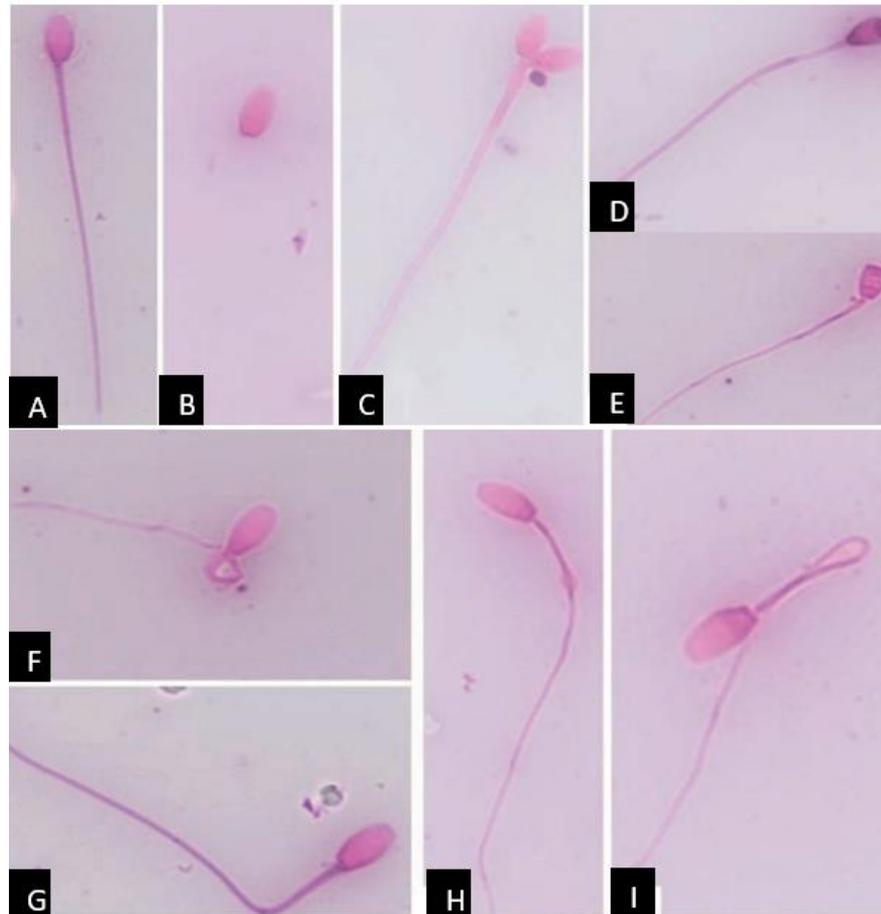


Figura 22- Alterações da morfologia dos espermatozoides. A- espermatozoide normal; B- cabeça destacada; C- cabeça dupla; D e E- anomalia do acrossoma; F- peça intermédia enrolada; G- peça intermédia dobrada; H- gota citoplasmática distal; I- cauda enrolada/dobrada (Coloração *MGQuick* ampliação 1000x). (Autoria de Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A.,2018).

2.3. Processamento do sémen

O processamento do sémen inclui a refrigeração ou congelação, precedido de centrifugação quando necessário. Perante uma amostra que apresente uma concentração espermática demasiado baixa (insuficiente para a preparação de uma dose inseminante

eficaz) e perante um sémen que não consegue manter a qualidade após a refrigeração ou congelamento (para armazenamento e/ou transporte) a utilização da centrifugação pode ser extremamente benéfica.^{24,32}

A centrifugação permite a remoção do plasma seminal (devendo ser mantida uma quantidade de plasma seminal de cerca de 5%, aquando da remoção do sobrenadante) que posteriormente será substituído pelo diluidor, permitindo melhorar a motilidade e a longevidade do sémen.^{24,32} O objetivo deste processamento é a recuperação do máximo de spz com o mínimo de lesões associadas à centrifugação, sendo que está descrito que a taxa de recuperação de spz com esta técnica é de 75%, estimando-se 25% de perdas durante o processamento.²⁴

Pode ainda ser adicionada a este processo uma “almofada”- *cushion fluid* (figura 26) que é um fluido de alta densidade que funciona como “almofada” que vai amparar os spz durante a centrifugação, permitindo centrifugações com maior força e duração, com menos danos para os spz e apresentando taxas de recuperação de aproximadamente 100%, sem que ocorra a diminuição da viabilidade espermática.^{24,32}

Um estudo demonstrou que a colheita e subsequente centrifugação da fração rica em spz proporcionou melhor qualidade do sémen após a descongelação.³⁶

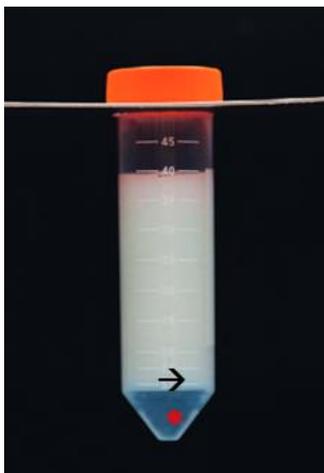


Figura 23- Tubo de centrifugação cónico de 50 ml que contém sémen diluído (branco) e o *cushion* (*). Após a centrifugação, o sémen desloca-se para a área subjacente ao *cushion*. (→) (adaptado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. 2011).

Após a preparação do sémen e verificado que a amostra apresenta uma concentração normal, ele pode ser refrigerado. O uso de sémen refrigerado é cada vez mais utilizado de modo a prolongar o tempo de vida útil dos spz e possibilitando o seu transporte. Este método apresenta inúmeras vantagens no que diz respeito ao manei­o reprodutivo, no entanto o processo de refrigeração causa lesões nos spz que obviamente, condicionam a qualidade do ejaculado.³⁷

Devido à exposição ao frio, estes podem sofrer lesões de forma direta (por alteração ou rutura da sua estrutura) ou indireta (devido a alteração da função celular). A redução rápida de temperatura dos 20°C para 5°C causa danos diretos na membrana plasmática, com perda de lípidos da membrana para o meio extracelular e libertação de iões e moléculas intracelulares, reduzindo o metabolismo celular, que leva à alteração dos padrões de movimento e culminando com perda de motilidade dos spz.³⁷

De forma a reduzir o impacto do processo de refrigeração na membrana dos spz, têm sido adicionados diluidores com lipoproteínas e fosfolípidos de outras fontes (provenientes do leite, leite desnatado e produtos de soja, antes do sémen ser refrigerado).³⁷

Para além disso, vários estudos demonstraram uma redução significativa dos danos, quando o processo de refrigeração é feito sobre determinadas condições (velocidade vs redução temperatura). O estudo indica que dos 37°C aos 19°C pode ser feita uma refrigeração rápida. Seguido de um período crítico dos 19°C aos 9°C, em que deve ser garantida uma redução lenta de 0,05°/minuto, para manutenção máxima da viabilidade dos spz. A partir dos 9° e até aos 5°C a refrigeração pode voltar a ser feita rapidamente.³⁷

A temperatura de armazenamento ideal, que mantém a viabilidade dos spz por 48 horas, situa-se entre os 4°C e os 6°C.³⁷

Relativamente ao retorno do sémen à temperatura corporal, desde que seja mantida uma taxa razoável de aquecimento, há manutenção da função celular, sendo considerada uma fase menos crítica que a refrigeração.³⁷

Outro processamento ao qual o sémen pode ser submetido é a criopreservação. Esta apresenta várias vantagens nomeadamente para a exportação, criação de uma reserva

de sémen de garanhões que são usados predominantemente para competição, antes de uma castração, no caso do garanhão sofrer de alguma doença, preparação de uma reserva genética em caso de morte prematura ou raça em vias de extinção.³⁸

É um procedimento que consiste na conservação de sémen em azoto líquido (-196°C) por tempo indeterminado. No entanto, apresenta alguns desafios na manutenção da qualidade do sémen criopreservado, uma vez que quando utilizado em programas de IA, a fertilidade dos garanhões é frequentemente comprometida.^{38,32}

Durante a congelação e descongelação, o sémen pode sofrer diversos danos celulares vindos de diferentes fontes, tais como: choque térmico até atingir os 0°C, formação de gelo intracelular e extracelular, alterações devido à desidratação (provocada pela formação de gelo extracelular e altas concentrações de sal); deformação da membrana (inchaço e encolhimento); alterações osmóticas durante a adição e remoção dos crioprotetores e toxicidade química associada aos mesmos.^{32,38,39}

A sobrevivência celular depende do cumprimento rigoroso das taxas de refrigeração. Para os spz de garanhões estão descritas taxas entre -10°C/min e -60°C/min, dependendo do tipo de crioprotetor utilizado. Taxas de refrigeração demasiado rápidas ou demasiado lentas podem levar a danos irreparáveis nas células. A taxa de aquecimento depende da taxa de refrigeração utilizada, sendo que as amostras devem ser aquecidas no mesmo tempo em que foram arrefecidas.³⁹

O crioprotetor é uma substância que quando adicionada aos spz antes da sua criopreservação, melhora a sua sobrevivência. Existem dois tipos, não penetrantes e os penetrantes através da membrana plasmática, estando descrito uma maior eficácia dos segundos (como o glicerol, o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido e várias amidas). No entanto, a sua velocidade de penetração na membrana plasmática é mais lenta do que a água, induzindo a alterações temporárias no tamanho dos spz que podem levar a danos irreparáveis da membrana (figura 27). Sendo os spz do garanhão muito sensíveis às alterações osmóticas provocadas pela adição e remoção do glicerol do que outras espécies, o diluidor de criopreservação contém apenas entre 4 a 5% de glicerol.³⁹

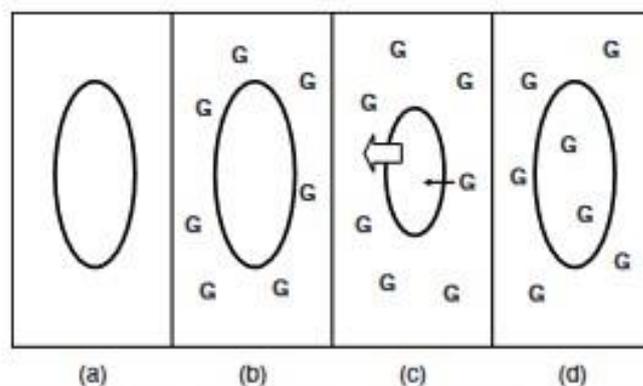


Figura 24- Quando uma célula em solução isomótica (a) é colocada em solução contendo glicerol (G) nas concentrações necessárias para a criopreservação (b), a água sairá da célula (seta grande) a uma taxa mais rápida do que o glicerol se move para dentro da célula (seta pequena) e a célula encolherá (c). À medida que o glicerol entra lentamente na célula e a água volta para dentro da célula mantendo o equilíbrio osmótico, a célula restabelece o seu volume original (retirado de Graham, K.J, 2011).

Durante este processamento, é vital que não seja ultrapassado o limite máximo de concentração de spz (400 a 800×10^6 de spz/mL) sob o risco de não haver diluidor e espaço suficiente para que as células sejam criopreservadas, com redução significativa da sua capacidade fertilizante.³⁹

É importante ainda referir que as palhinhas utilizadas para a criopreservação (figura 28-A e B) que contém o sémen congelado, quando expostas a diferentes temperaturas, não têm a capacidade de manutenção da temperatura de criopreservação, pelo que estas exposições podem levar ao aquecimento das células, o que é suficiente para causar danos irreparáveis. Assim, quando há a necessidade de manuseamento, este deve ser feito o mais rapidamente possível e o menor número de vezes.³⁹

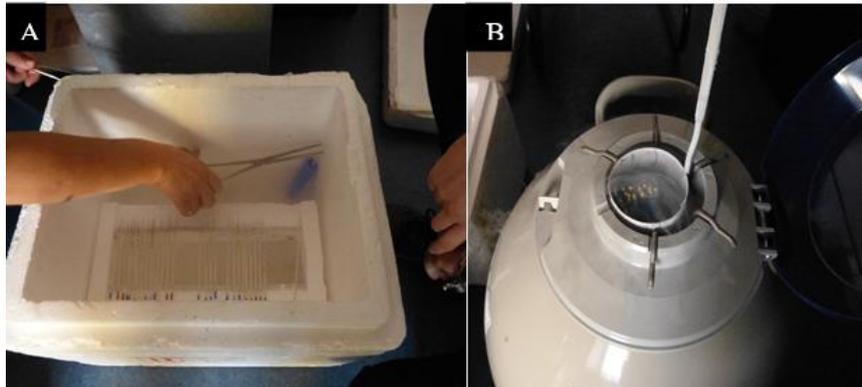


Figura 25- Processo de congelação manual. A- Arrefecimento em azoto líquido B- Colocação das palhinhas no contentor de azoto líquido (Autoria própria).

2.4. Sazonalidade reprodutiva no garanhão

O garanhão, assim como a égua, é um reprodutor sazonal, sendo que a sua estação reprodutiva está menos definida do que no caso da égua e por isso, se for devidamente estimulado, é capaz de se reproduzir ao longo de todo o ano. Ainda assim, a estação do ano influencia notavelmente características como o volume seminal, o número de spz por ejaculação, o número de montas por ejaculação e o comportamento sexual.⁴⁰

O mecanismo regulador da produção de hormonas é influenciado pelos estímulos ambientais (duração do dia e temperatura) através da secreção de melatonina pela glândula pineal de forma semelhante ao que foi descrito anteriormente para a égua.⁴⁰

Está descrito que o volume seminal é fortemente influenciado pela estação do ano, sendo bastante maior durante os meses de primavera/verão.^{40,41} Num estudo realizado no Kuwait, isto foi verificado apresentando valores máximos na primavera/verão.⁴² No entanto, num estudo realizado no Egipto foi verificado, que o volume de sémen sem gel foi superior no inverno e no verão e inferior na primavera e no outono.⁴³

O número de montas necessárias para conseguir uma ejaculação é maior nos meses de inverno/outono e o comportamento sexual apresenta-se mais exuberante durante a estação reprodutiva.^{40,41}

Está descrito que o número de spz por ejaculado também é afetado pela estação do ano, apresentando uma média de menos 50% de produção durante a época não reprodutiva.^{40,41} No entanto, um estudo realizado em Espanha constatou que o número total de spz num ejaculado foi ligeiramente superior no outono.⁴⁴ Sendo que noutros estudos realizados no Egipto e em Portugal, este número foi significativamente maior na primavera e verão.^{43,45} E ainda noutro estudo realizado no Kuwait, não foram registadas diferenças significativas independentemente da estação do ano.⁴²

Num estudo em Espanha e outro em Portugal, a motilidade progressiva média e a percentagem média de spz com membranas plasmáticas intactas foram maiores durante os meses da primavera, sendo que noutro estudo no Egipto os resultados foram significativamente superiores no verão quando comparado com a primavera.^{43,44,45} Ainda num outro estudo, realizado no Kuwait, a motilidade apresentou valores elevados e semelhantes na primavera e verão.⁴²

A concentração espermática atingiu valores menores durante o inverno e superiores no verão/primavera no estudo realizado no Egipto, sendo que noutros estudos realizados em Portugal e no Kuwait, os valores mais elevados foram atingidos durante o outono/inverno.^{42,43,45}

Num estudo realizado no Egipto, a percentagem de spz com anomalias atingiu valores superiores no outono e no inverno, atingindo o valor mais baixo na primavera.⁴³ Resultados semelhantes foram obtidos em estudos em Portugal e no Kuwait.^{42,45}

Um estudo realizado na Finlândia, constatou que a fertilidade do sémen refrigerado não foi afetada pelo mês de cobrição, tendo sido os meses avaliados entre março a setembro.⁴⁶

As avaliações referentes a estes estudos foram feitas em grupo, sendo estes os resultados obtidos com base no valor médio. No entanto, verificou-se uma grande variabilidade individual, havendo uma necessidade de avaliação do garanhão individualmente no que diz respeito aos efeitos da sazonalidade na qualidade do sémen.^{44,45}

Pode ser então, bastante interessante selecionar individualmente os garanhões com base na sua eficiência reprodutiva, levando em consideração a estação em que cada

garanhão atinge seu desempenho reprodutivo máximo. Este é um fator importante a ter em conta, visto que, os garanhões geralmente são escolhidos com base em características como a morfologia ou o fenótipo apresentando, por isso, uma maior variabilidade nas características do sémen quando comparado com outros machos de outras espécies (touros por exemplo) uma vez que estes são selecionados especificamente com base nas suas características reprodutivas.^{44,45}

3. Maneio reprodutivo

Um dos principais pontos que, muitas vezes é negligenciado é a avaliação do maneio reprodutivo praticado. Este deve ser articulado de acordo com as possibilidades em cada exploração e com a facilidade de execução das diferentes práticas.

3.1. Seguimento da égua para IA com sémen fresco, refrigerado e congelado

No seguimento de uma égua para IA e após a identificação de que a égua se encontra em estro, a previsão do momento da ovulação é essencial e inclui a avaliação de um conjunto de diferentes critérios, visualizados através da intensidade dos sinais de cio e com recurso às características uterinas e ováricas avaliadas por palpação transretal e por ecografia.⁴

Os sinais comportamentais de cio estão presentes quando a égua se encontra em estro, sendo que a expressão destes sinais apresenta uma intensidade máxima à medida que se aproxima do momento de ovulação. Tais sinais incluem: o levantamento e arqueamento da cauda ou desvio para um dos lados (permitindo a exposição da zona vulvar); o agachamento da pélvis; membros traseiros ligeiramente abduzidos; micção frequente e urina com cor amarela, brilhante e com odor característico; vocalização; orelhas relaxadas; eversão rítmica dos lábios e exposição do clitóris (“pisar”) e comportamento calmo e submisso relativamente ao garanhão (figura 29)^{4,5,21}



Figura 26- A égua apresenta sinais típicos de estro: agachar-se com a cauda levantada, urinar e exposição do clitóris. (retirado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. 2011).

Adicionando a esta informação, através da palpação transretal, são observadas características uterinas e da cérvix como descritas anteriormente durante o estro. Na palpação dos ovários, é possível palpar o tamanho e a tonicidade do folículo pré-ovulatório que fica aumentada. A palpação do folículo pré-ovulatório ou na sequência de uma ovulação recente nas éguas pode resultar numa resposta dolorosa. Já o CL maduro não pode ser detetado por palpação. ²¹

O recurso a ecografia transretal pode auxiliar na previsão do momento de ovulação, através da avaliação do tamanho, forma e a ecogenicidade do fluido folicular do folículo dominante, sendo considerado diâmetro folicular pré-ovulatório quando atinge mais de 35 milímetros. No entanto, este valor é bastante variável consoante a raça (éguas maiores tendem a ovular folículos maiores e éguas menores folículos menores). Dentro da mesma raça, o tamanho do folículo na ovulação é menor em éguas idosas, éguas pós-parto, éguas em foi administrado agentes indutores de ovulação e em éguas com a existência de folículos pré-ovulatórios unilaterais duplos. ^{21,23,47}

Relativamente à forma, 24h antes da ovulação, a forma dos folículos muda de esférico para mais elíptico, ocorre o desenvolvimento de um ápice normalmente na zona da fossa de ovulação, a parede apresenta um aspeto irregular com aumento da espessura (serrilhado da granulosa) ocorre uma diminuição da turgidez e a ecogenicidade do líquido folicular aumenta ligeiramente (figura 30).^{4,47} O grau de edema uterino é uma característica também a ter em conta, visto que, aumenta progressivamente durante o estro e diminui 1 a 2 dias antes da ovulação (tabela1). A cérvix e o útero, nesta fase encontram-se ambos relaxados.⁴



Figura 27- Imagem ultrassonográfica de um folículo pré-ovulatório típico (1 dia antes da ovulação), A parede folicular apresenta as bordas espessadas e perda da forma arredondada. (Retirado de Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. 2011).

Pode ainda recorrer-se ao uso da ultrassonografia com o modo Doppler para prever o momento da ovulação, visto que permite o estudo do fluxo sanguíneo que estará aumentado no folículo pré-ovulatório devido ao seu aumento de vascularização.⁴⁸

O tempo de sobrevivência dos spz no trato reprodutivo da fêmea é de 24 a 72 horas, dependendo do processamento do mesmo (fresco, refrigerado, congelado). É de notar que o óvulo tem um tempo de vida de 18 horas após a ovulação e que o tempo de capacitação dos spz dentro do trato reprodutivo da égua demora cerca 12 horas.^{5,22}

Face ao exposto, num programa de IA com a utilização de sémen fresco ou refrigerado, a previsão da hora de ovulação não necessita de ser exata, desde que a inseminação seja realizada até 24h a 48h da ovulação. ^{5,22}

A previsão do momento exato de ovulação torna-se muito mais importante quando é utilizado sémen congelado, visto que este apresenta um tempo médio de vida de 12 a 24 horas no trato reprodutivo da égua, com viabilidade ótima próxima das 12 horas, sendo imprescindível o estadiamento da égua de 4 em 4 horas ou de 6 em 6 horas de forma a garantir melhores taxas de sucesso. ^{5,22}

3.2. **Práticas de manejo e manipulação do ciclo reprodutivo da égua**

Devido ao facto dos equinos serem animais sazonais e a época reprodutiva estar confinada a um determinado período de tempo no ano, foram desenvolvidas práticas de manejo e administração de hormonas com intuito de antecipar o início da época reprodutiva, garantindo que a égua fica gestante o mais cedo possível com o menor número de inseminações. ⁴⁹

Como verificado anteriormente, o fotoperíodo tem um grande impacto no início da época reprodutiva, podendo esta ser manipulada artificialmente através da alteração do fotoperíodo natural por exposição a programas de luz artificial. Estudos indicam que 14/16 horas de exposição ao estímulo luminoso, seja artificial ou natural, durante 8 a 10 semanas, são necessários para as éguas iniciarem a atividade cíclica. Os programas mais comuns são a manutenção diária e constante de 14/16 horas de luz ou aumentar 30 minutos de exposição de luz gradualmente até serem atingidas as 14/16 horas. Estudos demonstram que os melhores resultados são obtidos quando a luz adicional é repartida e adicionada ao início e ao fim do dia ou adicionada toda ao final do dia, mimetizando o melhor possível o que acontece naturalmente. ⁴⁹

O período de transição também pode ser antecipado através da administração de hormonas. Uma das hormonas usadas para este efeito é a progesterona, cujo propósito é a inibição da libertação de LH. Este efeito é importante porque durante o período de transição, a incapacidade de ovulação do folículo dominante deve-se ao facto de não

haver LH suficiente armazenado. Assim, durante a administração de progesterona, ocorre a inibição da libertação de LH, proporcionando tempo suficiente para que ocorra a produção e armazenamento desta hormona em quantidade necessária para induzir a maturação do folículo e sua posterior ovulação, que ocorrerá 15 dias após o término do tratamento. Este método é eficiente apenas em éguas em períodos de transição tardios. Neste período, também é possível o uso de hCG, mas existem poucos estudos feitos nesse sentido, dado que nesta fase não é garantido que um folículo pré-ovulatório ovule em 48h.
10,49

Em período de anestro, é possível a administração de GnRH ou dos seus análogos, de forma a potenciar o crescimento folicular e a ovulação, sendo mais eficaz no período final de anestro (quando o período de duração do dia e o diâmetro do folículo são maiores). Os programas de administração pulsátil apresentam resultados superiores aos programas de administração contínua. Estudos demonstram que quando combinado com hCG, podem ter resultados positivos.^{10,49} É ainda possível o uso de antagonistas dos recetores de D2 dopamina para acelerar a saída do anestro sazonal, estando descrito a administração diária de domperidona ou sulpirida, com resultados positivos na antecipação da ovulação. Nesta fase de transição, a ovulação é induzida após 12 a 22 dias de tratamento, sendo que em anestro são necessários 50 a 60 dias de tratamento, com melhores respostas quando aplicado juntamente com programas de iluminação artificial.
10

Durante a época reprodutiva, de modo a aumentar as taxas de fertilidade e do consequente sucesso do programa reprodutivo, está estudado que a ovulação deverá ocorrer dentro de 24 a 48 horas após a inseminação. Quando se está a controlar um número elevado de éguas é extremamente útil a administração de hormonas para induzir a ovulação em éguas cíclicas, garantindo que ocorre naquele período pós- inseminação, minimizando o nº de observações e o nº de inseminações. Este facto passa a ter ainda mais importância quando utilizados garanhões subférteis ou sémen congelado, visto que devemos garantir que a IA deve ser realizada o mais próximo possível da ovulação. Para este efeito, pode ser usada a administração de hCG para induzir a ovulação de folículos pré-ovulatórios de grandes dimensões, sendo o seu efeito mais eficaz quando usado no 2º e 3º dia do estro, nos primeiros meses da época reprodutiva e quando administrado por injeção intravenosa (IV). Com uma resposta semelhante à hCG, pode ser usado também

o reLH (LH recombinante equino). Sendo também muito frequente para este efeito a administração de análogos de GnRH, como a triptorrelina e a deslorelina, que apresentam um período de vida mais longo que a GnRH exógena e são altamente bem sucedidos a induzir a ovulação em éguas cíclicas.⁴⁹

A administração de hormonas pode ser usada também para auxiliar na sincronização do estro numa égua ou em grupos de éguas cíclicas. Na presença de um CL, pode ser administrado $PGF_{2\alpha}$, para reduzir o tempo de vida útil do CL, induzindo o estro (em 2 a 4 dias) e conseqüentemente uma ovulação mais rapidamente (em 7 a 12 dias). Fator importante a ter em conta na presença de um CL é saber há quanto tempo o CL se desenvolveu, visto que só a partir do quinto dia de vida útil do CL é que este passa a ser responsivo a $PGF_{2\alpha}$, induzindo assim a luteólise.⁴⁹

Outra hormona que pode ser usada para sincronização é a progesterona ou os seus análogos. Quando administrada durante um período de 14 a 15 dias, bloqueia a libertação de LH pela hipófise, bloqueando assim a ovulação, mas permitindo a regressão do CL. Quando a administração de progestagénios é terminada as éguas retornam ao estro e ovulam.⁴⁹

4. Como avaliar a eficácia e eficiência de um programa de IA

A avaliação de um programa de IA é feita recorrendo á medição de parâmetros (taxas) que permitam verificar a eficiência e/ou eficácia reprodutiva. Em raças de puro-sangue os parâmetros são frequentemente medidos por ciclo éstrico ou por época reprodutiva (*tabela 1*).^{50,51}

Quando as taxas são calculadas para a época reprodutiva é avaliada a eficácia global de alcançar o resultado pretendido, não tendo em conta o número de IA que foram necessárias para atingir esse resultado.^{50,51}

Por outro lado, quando as taxas são calculadas por ciclo éstrico é medida a eficiência de alcançar o resultado, sendo esta particularmente importante quando o objetivo reprodutivo é um poldro/por égua/por ano.⁵⁰ Quanto maior a eficiência, mais cedo os poldros vão nascer durante a época aumentando assim o seu valor comercial,

reduzindo simultaneamente também o custo associado ao manejo veterinário, por necessidade de um menor número de intervenções. ⁵¹

Tabela 2- Parâmetros de avaliação da eficiência e eficácia reprodutiva. Adaptado de Nath, L. C. (2011)

PARÂMETROS	DESCRIÇÃO
Taxa de gestação (geralmente calculada aos 14, 21, 45 dias)	Número (nº) de éguas gestantes /nº de éguas inseminadas ou cobertas para uma determinada data (* 100)
Taxa de gestação por ciclo	nº de éguas gestantes num ciclo/ nº de éguas inseminadas ou cobertas em cada ciclo (* 100)
Taxa de gestação ao 1ºcio	nº de éguas gestantes no 1ºcio/ nº de éguas inseminadas ou cobertas no 1ºcio(* 100)
Taxa de fertilidade ao parto	nº de éguas paridas/ nº de éguas inseminadas ou cobertas (*100)
Taxa de mortalidade embrionária precoce	nº de embriões absorvidos antes dos 40 dias de gestação/ nº de embriões totais (* 100)
Taxa de nados mortos	nº de poldros nascidos mortos/ nº de poldros nascidos totais (* 100)
Taxa de aborto	nº abortos/ nº de éguas gestantes (* 100)
Nº de inseminações ou cobrições por gestação (IA´s por gestação)	nº de inseminações ou cobrições por gestação positiva até diagnóstico
Ciclos por gestação	nº médio de ciclos éstricos seguidos por gestação positiva
Serviços por ciclo	nº de IAs ou cobrições por ciclo éstrico

De todos estes parâmetros, a taxa de gestação por ciclo e o número de cobrições ou inseminações por gestação são considerados os parâmetros mais relevantes para avaliar um programa de IA.⁵¹ A taxa de gestação por ciclo reflete a verdadeira fertilidade da égua e do garanhão, visto que tem em conta o número de IAs por gestação.^{51,52} Neste contexto na avaliação da fertilidade individual de um garanhão, esta é mais valiosa no fornecimento de informações do que a taxa de gestação por época.⁵¹

A taxa de gestação por época, não tem em conta o número de IAs/ciclos em que a égua foi inseminada até um diagnóstico de gestação positivo e por isso, esta pode ser muito melhorada através do trabalho do MV ao longo da época, podendo mascarar casos de subfertilidade.^{51,52}

A taxa de fertilidade ao parto, é uma medida importante a ter em conta, visto que, engloba as perdas gestacionais sendo a mais representativa a nível económico.⁵²

A taxa de gestação ao 1ºcio, é normalmente mais alta do que a taxa global de gestação, isto ocorre porque a grande maioria das éguas mais férteis ficam gestantes logo na primeira inseminação, sendo que só as éguas menos férteis precisaram de um maior número de IAs. Neste contexto, as éguas podem ser consideradas ligeiramente menos férteis em cada ciclo subsequente, pois exigem maior número de inseminações para ficarem gestantes.⁵¹

A eficiência reprodutiva tem vindo a melhorar ao longo dos anos, devido ao facto do manejo veterinário de éguas e garanhões estar em constante evolução. Um estudo no Reino Unido refere uma evolução crescente de 13% na taxa de gestação aos 14 dias por ciclo, do ano 1982 para 2002.⁵¹ Na Austrália e Nova Zelândia foi relatado um aumento de 15% entre os anos 80 e a atualidade.⁵¹

Num estudo, a taxa de fertilidade ao parto foi de 68%, a taxa de gestação por ciclo foi de 55,3 % para éguas problema e 61,4% para éguas paridas.⁵² Estudos realizados no Reino Unido e na Suécia relataram que 78,5% de todas as gestações confirmadas ao dia 15 resultaram em poldros vivos.⁵⁰ Num outro estudo na Finlândia, foram obtidas taxas de gestação por ciclo de 47%, taxa de gestação por época de 80%, taxa de fertilidade ao parto foi de 65,9%, taxa de gestação ao 1ºcio inferior a 50%.⁵³

Num estudo realizado na Noruega, a taxa de fertilidade ao parto foi de 74,3%, a taxa de gestação por época foi de 79,0%, taxa de fertilidade no 1ºcio de 47%, taxa de fertilidade no 2ºcio foi de 46,3%.⁵⁴

Num estudo no Reino Unido, foi verificada taxa de gestação ao 15ºdia por ciclo de 59,92 % que diminuiu para 53,69% quando registrado no dia 35. ⁵⁵

5. Descrição de fatores com potencial impacto num programa de IA

5.1. Fatores relacionados com a égua

5.1.1. Época do ano

Um estudo realizado no Reino Unido, verificou uma taxa global de gestação por ciclo superior em maio (62,7%) do que em junho e julho combinados (52,6%).⁵⁶

Num outro estudo realizado no Iraque, a maior taxa de gestação foi obtida na primavera (30,13%) nas estações de outono e verão foram obtidos resultados semelhantes (24,65% e 23,28% respectivamente) tendo sido no inverno que foram atingidos os valores mais baixos (21,91%). Relativamente aos meses em questão, foi em agosto e outubro que a percentagem de éguas gestantes foi superior (13,96% em ambos) seguida de março (12,32%) depois de janeiro (10,95%) fevereiro, abril e setembro com igual percentagem de éguas gestantes (8,21%) tendo sido registrado em julho, novembro e dezembro os valores mais baixos de fertilidade (2,73% para todos).⁵⁷

Um estudo realizado em França, constatou que inseminações precoces no ano favoreceram a fertilidade (março), no entanto, inseminações demasiado precoces (janeiro-fevereiro) não obtiveram essa vantagem pelo facto das éguas ainda estarem em transição, visto que todas as inseminações foram feitas pré-ovulação onde o risco de não ocorrer ovulação em épocas de transição é elevada. Tendo sido, no outono que foram registados os desempenhos reprodutivos mais baixos.⁵⁸

5.1.2. Idade da égua

Num programa de IA, outro fator a ter em conta é a idade das éguas, o que pode afetar a eficiência reprodutiva. A atividade reprodutiva inicia-se na puberdade, com início

dos ciclos éstricos, entre os 10 e os 36 meses de idade, correspondendo ao grupo de éguas nulíparas (éguas que vão iniciar a sua vida reprodutiva).^{5,59} Esta descrito que a fertilidade da égua aumenta da puberdade até aos 5 anos de idade, ocorrendo um período de estabilização entre os 6 e os 15 anos, seguido por um declínio até a senescência.⁶⁰

De acordo com a literatura, a eficiência reprodutiva é menor em animais mais velhos e a animais muito jovens, não havendo uma idade precisa a partir da qual ocorre uma redução significativa da fertilidade. Alguns autores definem essa redução a partir dos 15-16 anos, outros a partir dos 12 anos e ainda outros defendem a redução da fertilidade a partir dos 10 anos de idade.⁶⁰

Outros estudos demonstraram que éguas jovens (2 a 5 anos) antecipam o período de anestro quando comparado com éguas mais velhas (> 10 anos), sendo estas mais propensas a exibir atividade reprodutiva contínua durante a estação não reprodutiva. Uma das razões apresentadas para este facto prende-se com o facto de as éguas mais velhas apresentarem uma condição corporal superior e por conseguinte, concentrações mais elevadas de leptina circulante, o que afeta a sua sazonalidade.⁶¹

Existe uma correlação negativa entre o avanço da idade das éguas e a eficiência reprodutiva. À medida em que, as éguas se aproximam da faixa etária de 12 a 14 anos, observa-se uma redução na fertilidade dentro da população equina.^{3,59} Um estudo, onde foi utilizado a transferência de embriões obteve em égua jovens (6-10 anos) taxas de gestação muito superiores (83%) do que com animais mais velhos (20-26 anos) (19%).⁶²

Outros estudos demonstraram que os parâmetros de eficiência reprodutiva avaliados, como número de IA/Ciclo, número de IA/ciclo gestante e o número de IA/Ciclo vazio, foram semelhantes nos grupos de éguas de todas as idades. No entanto, o número de ciclos por conceção foi superior no grupo de éguas entre os 15 e os 19 anos.⁶⁰

Apesar de muitas éguas ainda apresentarem ciclicidade reprodutiva após os 20 anos, está descrito em estudos que é a partir desta idade que o processo de senescência é mais evidente, caracterizando-se pelo alongamento da fase folicular e o crescimento mais lento do folículo pré-ovulatório.^{60,63}

5.1.3. Tipo de cio

A limitada época reprodutiva e a longa duração da gestação das éguas (tempo médio de 335 a 340 dias) fazem com que o objetivo reprodutivo de um poldro por égua por ano, só seja alcançável perante a existência de uma nova concepção numa janela temporal de 25 a 30 dias pós-parto. Este objetivo exerce uma pressão considerável para que a reprodução da égua ocorra o mais rápido possível após o parto, tornando muito atrativo a utilização do cio do poldro na prática do manejo reprodutivo reprodução equina.^{64,65,66}

O cio do poldro é definido como o primeiro estro após o parto, que ocorre 5 a 12 dias depois do parto na grande maioria das éguas, sendo que a ovulação ocorre geralmente entre 9 a 20 dias pós-parto.^{49,65,66,67}

O sucesso e a utilização do cio do poldro em relação aos cios subsequentes têm sido objeto de divergência entre investigadores.⁶⁸ Alguns autores defendem que a utilização deste cio tem inúmeras vantagens, tais como: redução da probabilidade de entrada em anestro após a ovulação do cio do poldro para éguas que parem no início do ano, o que aumentaria o intervalo entre o parto e a concepção; evitar o atraso na data do parto do ano seguinte e taxas de gestação por época frequentemente semelhantes entre éguas inseminadas no cio do poldro ou no cio seguinte. Outros autores evitam a sua utilização com base nas seguintes desvantagens: taxas de gestação inferiores e maior probabilidade de perdas de gestação.⁶⁶

Devido à grande proximidade com o momento do parto, está descrito que a utilização deste cio apresenta uma taxa de gestação 10 a 20% mais baixa e uma taxa de morte embrionária precoce superior do que quando utilizado o cio seguinte.^{49,65,66,67}

A taxa de sucesso da utilização do cio do poldro depende da rápida involução uterina (remodelação tecidual, contratilidade uterina, redução do tamanho e do conteúdo de fluidos).^{49,66} Existem alguns métodos que podem auxiliar na aceleração da involução uterina, tais como: lavagens uterinas repetidas durante a primeira semana após o parto; a administração de ocitocina nos primeiros 10 dias após o parto (promovendo a contratilidade uterina e a expulsão de líquido intrauterino) e administração de hormonas,

sendo que nenhuma delas garante uma redução significativa da taxa de involução uterina.⁴⁹

Tendo isso em conta, a melhor forma para melhorar as taxas de sucesso utilizando o cio do poldro é esperar para que a involução uterina esteja completa. Esta pode ser feita de três formas: atrasar o cio do poldro, diminuir o intervalo entre o cio do poldro e o cio seguinte e a sua utilização sem qualquer tratamento, mas atrasando a IA dentro do período de cio do poldro.⁶⁹

Para atrasar o cio do poldro, pode ser feita uma terapia com progesterona durante 8 a 15 dias após o parto, sendo também utilizada a combinação de progesterona com estradiol-17. Muitos autores desaconselham a administração de progesterona em éguas com risco de desenvolvimento de infecções uterinas (muito perto do período pós-parto) porque a progesterona reduz a capacidade do útero de atrair neutrófilos, comprometendo a capacidade de prevenir eventuais infecções, não sendo recomendado para éguas que apresentem complicações no parto.⁶⁹

Para diminuir o intervalo entre o cio do poldro e o cio seguinte, deve ser administrado PGF_{2α} 5 a 7 dias após a ovulação do cio do poldro.⁴⁹

É importante referir que muitos autores defendem que o melhor maneio para a utilização do cio do poldro é a sua utilização na ausência de qualquer tratamento, atrasando a data da IA dentro do período do cio do poldro.⁶⁴ Estando descrito na literatura que éguas que ovulam 10-11 dias após o parto (ovulação mais tardia) apresentam taxas de sucesso superiores quando comparado com éguas que ovulam precocemente (< 10 dias) dentro do cio do poldro.⁴⁹

A maioria dos autores descrevem resultados inferiores com a utilização do cio do poldro, sendo que em éguas mais novas a diminuição da fertilidade é menos pronunciada.^{68,70,71}

Relativamente à perda embrionária quando utilizado o cio do poldro, os dados também são contraditórios, havendo alguns estudos que não encontram diferenças independentemente do cio utilizado e outros que relatam maior perda com a utilização do cio do poldro.⁷²

Apesar da maior parte dos estudos relatar menores taxas de gestação quando utilizado o cio do poldro, estas taxas podem ser suficientemente altas para justificar a colocar a égua à reprodução neste cio.⁶⁶

Contradizendo os estudos anteriores, existem ainda estudos que relatam taxas de fertilidade muito semelhantes, independentemente do uso do cio do poldro ou os cios seguintes e ainda outros que relatam maior taxa de sucesso com utilização do cio do poldro.^{73,74}

É importante ainda mencionar que tudo o que foi descrito anteriormente se refere a éguas com parto normal. Éguas com problemas no parto (distocia ou retenção de membranas fetais) apresentam uma involução uterina retardada, não sendo boas candidatas para a utilização do cio do poldro.⁶⁶

5.1.4. Estado reprodutivo

O estado reprodutivo da égua no início da época, é um fator importante que pode influenciar a fertilidade.⁷⁵ A gestão reprodutiva e o manejo das éguas, consoante o seu estado reprodutivo, vai influenciar fortemente as taxas de gestação passíveis de ser alcançadas.⁵¹

O estado reprodutivo das éguas pode ser definido por nulípara, parida ou em lactação e alfeira.⁵¹

Uma égua nulípara é uma égua virgem que nunca foi colocada à cobrição anteriormente. Normalmente corresponde a um grupo de éguas jovens, no entanto, este grupo também pode englobar éguas mais velhas nunca colocadas à reprodução que ingressaram em programas de reprodução após o final da carreira desportiva.⁵¹

Uma égua parida ou em lactação é uma égua que pariu recentemente um poldro resultante de uma cobrição bem-sucedida na época anterior. Elevadas taxas de gestação por ciclo são esperadas neste grupo, devido ao seu histórico reprodutivo favorável.⁵¹

As éguas alfeiras são éguas que foram cobertas na época anterior, mas que não ficaram gestantes, nestas estão incluídas éguas que sofreram uma perda embrionária ou que abortaram (éguas problema) e portanto, é esperado taxas de gestação mais baixas por

ciclo, contudo as taxas de gestação por época podem apresentar resultados superiores, visto que englobam todas as tentativas que foram feitas durante toda a época.⁵¹

Vários estudos identificaram as éguas nulíparas e as paridas como as mais férteis de um grupo de éguas reprodutoras e éguas alfeiras como as éguas com menos probabilidade de produzir poldros saudáveis.⁷⁵

Vários autores que obtiveram menores taxas de fertilidade em grupos de éguas nulíparas quando comparado com os restantes grupos, verificaram que o mesmo apresentava uma grande percentagem de éguas mais velhas e em fim de carreira desportiva.^{58,76}

Num estudo no Reino Unido, foi verificado uma maior taxa de morte embrionária em éguas paridas do que em éguas nulíparas, embora as taxas de gestação finais tenham sido semelhantes entre os grupos de éguas com estados reprodutivos diferentes. Éguas paridas apresentaram ainda uma menor percentagem de ovulações duplas do que éguas alfeiras.⁵⁵

5.1.5. Lado e tipo de ovulação

A frequência do lado em que ocorre a ovulação em éguas não está bem esclarecida, mas pode envolver o efeito da idade ou estado reprodutivo da égua.⁷⁷

Num estudo onde foi avaliado as desigualdades no lado da ovulação, constatou-se que a ovulação correu com maior frequência no ovário esquerdo (61%) do que no ovário direito (39%) em éguas nulíparas. Em éguas paridas e alfeiras a frequência do lado de ovulação foi igual em ambos os ovários.⁷⁷ Relativamente às ovulações duplas estas ocorreram com maior frequência em éguas alfeiras do que em éguas paridas. As taxas de gestação foram superiores para ovulações duplas, com 0 a 2 dias de intervalo entre ambas (84%) do que para ovulações singulares (54%).⁷⁷

Num estudo realizado no Reino Unido, foram registadas ovulações unilaterais em 85,7% das ovulações, sendo que 14,3% foram ovulações duplas, das quais 10% (bilaterais) e 4,3% (unilaterais).⁵⁵

Noutro estudo realizado no Reino Unido, os resultados obtidos indicaram uma incidência semelhante na ocorrência de ovulação do lado direito (49,5%) e do lado esquerdo (50,5%). Foram registadas ovulações duplas em 22,4% dos ciclos éstricos, das quais 57,2% foram bilaterais e 42,8% unilaterais. A idade não afetou o lado em que ocorre a ovulação, mas foi verificado uma menor percentagem (15%) de ovulações duplas em éguas jovens (3-5 anos) com valor crescente associado ao aumento da idade, atingindo valores máximos (35,1%) no grupo de éguas mais velhas (18-22 anos).⁷⁸

Noutros estudos realizados nos EUA e no Irão, também não foram verificadas alterações significativas na frequência de ovulação relativamente ao lado de ovulação.
79,113

5.1.6. Endometrite

A maioria dos problemas de infertilidade nas éguas são complexos e multifatoriais. Estes fatores isolados ou em combinação podem levar à infertilidade. Todos os anos existem éguas que não ficam gestantes de um ano para o outro, sendo que, essa falha representa uma perda económica e genética significativa para a indústria equestre.⁶⁷ Existem três tipos de égua problema (éguas subférteis): as éguas que não entram em ciclo éstrico; as éguas que apresentam um estro regular, mas que não ficam gestantes; as éguas que apresentam ciclo regular, ficam gestantes, mas sofrem de morte embrionária precoce. Em muitos estudos, a endometrite tem sido descrita como a causa mais frequente para o desenvolvimento das duas últimas condições.⁶⁷

A endometrite é uma inflamação aguda que envolve o endométrio. São fatores predisponentes ao seu desenvolvimento: o parto, os exames reprodutivos (devido à manipulação mesmo quando respeitadas todas as condições higiénicas), a IA ou a monta natural (como resposta ao sémen) e por auto contaminação (em caso de má conformação do períneo com valores de índice de *Caslick* superiores a 150 aumentando a probabilidade de contaminação por fezes, uma má coaptação dos lábios vulvares e falta de integridade da barreira vestibulo-vaginal).⁸⁰

Após a IA ou monta natural, é desencadeada uma resposta inflamatória transitória ao sémen, caracterizada pela ativação dos mecanismos de defesa, recrutamento de células polimorfonucleares (PMNs), libertação de prostaglandinas e aumento da contratilidade

uterina, de forma a tentar eliminar bactérias e excesso de spz introduzidos no útero. Este processo é um mecanismo natural do corpo e é designado de endometrite fisiológica após cobrição/inseminação, que em éguas saudáveis apresenta uma duração máxima de 48 horas, tendo o seu pico cerca de 6-12 horas após a inseminação.^{80,81,82} Após a ovulação e fecundação o embrião demora entre 5-6 dias a chegar ao útero. Assim, o endométrio deve estar completamente livre de inflamação até 96h após a ovulação de forma a maximizar a possibilidade de sobrevivência do embrião.⁸²

Éguas que apresentam uma resposta imunológica deficiente e mecanismos físicos de defesa contra a infeção comprometidos (éguas suscetíveis) não conseguem resolver a inflamação fisiológica induzida em menos de 48 horas, permitindo o desenvolvimento de uma endometrite persistente pós-cobrição/inseminação (EPPC).^{82,83} Esta é descrita como a 3ª condição médica mais frequente em éguas adultas, sendo que, estudos referem que 10-15% das éguas são suscetíveis ao desenvolvimento de EPPC.^{82,83}

A presença de líquido intrauterino identificado por ecografia é sugestiva de endometrite, no entanto, algumas éguas não apresentam líquido, mas podem apresentar PMNs e outras apresentam líquido na ausência de PMNs.⁸⁴ O diagnóstico de endometrite envolve uma abordagem multimodal em conjunto com a avaliação da sua história clínica, sendo a cultura microbiana endometrial, a citologia e a biópsia as técnicas mais frequentemente usadas.⁸³

Tem sido estabelecida uma relação muito forte entre o desenvolvimento de EPPC e um conjunto de condições da égua (como a idade, a conformação perineal, a contratilidade uterina, a competência cervical e posição do útero), levando à manutenção de excesso de líquido intrauterino, a neutrofilia persistente e a produção prolongada de citocinas pró-inflamatórias. Sendo todas estas substâncias embriotóxicas, comprometem o estabelecimento de uma gestação, assim como o desenvolvimento de infeção bacteriana concomitante (endometrite infecciosa).^{80,81,83}

Estudos demonstraram que a atividade mioelétrica, que indica o aumento das contrações uterinas observado em éguas saudáveis após a inseminação, ocorre em média 2 horas mais tarde em éguas suscetíveis. Estas são frequentemente éguas mais velhas e múltiparas, que apresentam vários fatores predisponentes, nomeadamente defeitos anatómicos ou degenerativos, conformação ou alteração adquirida dos órgãos

reprodutivos internos e externos. Tendo sido descrito por diversos autores taxas de mortalidade embrionária precoce 3 vezes superiores em éguas com endometrite.^{81,82}

No entanto, estudos demonstram que a idade média das éguas saudáveis (14 anos) e éguas suscetíveis (16 anos) não é significativamente diferente, sendo que a falha no relaxamento cervical foi encontrada em ambas.^{82,84}

A IA realizada mais de 12 horas após a ovulação também pode predispor ao desenvolvimento de EPPC, devido ao aumento dos níveis de progesterona que reduzem as defesas uterinas.⁸²

Quando a inflamação se prolonga por várias semanas, passa a designar-se endometrite crónica, podendo levar a uma condição fibrótica grave, progressiva e irreversível no endométrio da égua. A presença de linfócitos e células plasmáticas de forma prolongada contribui para o desenvolvimento de alterações degenerativas crónicas, induzindo luteólise prematura e resultando numa perda embrionária, devido ao aumento nas concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e subsequente deficiência em progesterona.⁸⁵ Quando esta condição se mantém por anos, passa a designar-se endometrose.⁸⁴

5.1.7. Consanguinidade

Um animal é considerado consanguíneo quando é descendente de dois parentes que possuem uma relação de parentesco. Através da consanguinidade, ao longo de gerações, o número de indivíduos heterozigotos diminui, à medida que o número de homozigotos aumenta, resultando em uma população mais homogénea que tende a ser predominantemente homozigótica. Animais consanguíneos são caracterizados por uma maior prevalência de pares de genes homozigóticos.⁸⁶

Sendo a raça Puro Sangue Lusitano uma raça de população fechada, o número de animais inscritos no livro genealógico é limitado, sendo que foi observado um aumento no coeficiente de consanguinidade desde o encerramento do livro genealógico em 1989.⁸⁶ O facto de não ser permitida a utilização de animais não registados no livro genealógico como reprodutores, provocou uma diminuição significativa no tamanho efetivo da população, aumentando o número de acasalamentos de animais com uma relação de parentesco, sendo a principal causa do aumento das taxas de endogamia.⁸⁷ Nos últimos

anos, os valores médios de consanguinidade na população de Puro Sangue Lusitano variaram entre 9% e 10%.⁸⁶ No entanto, a utilização de um maior número de garanhões em relação ao número de fêmeas na população tem ajudado a controlar este valor.⁸⁶

A grande maioria dos acasalamentos são selecionados com base no desempenho desportivo e características morfológicas, sem ter em conta a fertilidade como critério de seleção, desvalorizando a alta sensibilidade das características reprodutivas a altos níveis de consanguinidade.⁸⁷

Está descrito que a endogamia excessiva está associada ao aumento da retenção de placenta em éguas.⁸⁸ Num estudo em que foi utilizada uma combinação de análise genómica de alto rendimento e estimativas genéticas de fertilidade, os resultados demonstraram uma correlação forte e negativa entre a homozigosidade genómica e a fertilidade.⁸⁷ Noutro estudo, verificou-se que altos níveis de endogamia apresentam uma correlação positiva com o aumento da perda gestacional no meio e no final da gestação (desde o 70º dia de gestação até 24h após o parto) já que no concerne a perdas gestacionais no início da gestação, não foram associadas a uma diferença significativa nas métricas de endogamia.⁸⁸

Num estudo, a quantidade de descendentes diminuiu entre 0,5 a 1% para coeficientes crescentes de 1% de endogamia.⁵⁸

5.2. Fatores relacionados com o garanhão

5.2.1. Parâmetros sazonais

Apesar de haver vários estudos que tentam relacionar os caracteres seminais com a fertilidade, sabe-se hoje que um único parâmetro não pode ser relacionado com a fertilidade. Nesta tentativa diversos estudos verificaram que o aumento da motilidade total do sémen e da sua velocidade, estava associado a um aumento da taxa de gestação tanto por ciclo como por época e o aumento da percentagem de anomalias morfológicas foi associada à sua diminuição.^{89,90} Relativamente à avaliação da motilidade progressiva do sémen, como meio de avaliação de fertilidade dos garanhões, apenas quando avaliadas para a taxa de gestação no cio do poldro se conseguiu discriminar grupos de alta, média

ou baixa fertilidade, demonstrando assim a dificuldade de relacionar caracteres de forma individualizada com a fertilidade.⁹⁰

5.2.2. **Processamento do sémen**

Diversos estudos compararam a fertilidade do sémen fresco, refrigerado e congelado, tendo sido obtidos resultados de fertilidade superiores quando a IA foi realizada com sémen fresco.^{51,54,58,76,89,91}

Outros autores, compararam a fertilidade por ciclo do sémen refrigerado com o sémen congelado, sendo que foram obtidos resultados semelhantes para ambos, 59,4% e 51,3% , respetivamente. Quando avaliada a fertilidade por época não foram encontradas diferenças significativas, entre os dois tipos de sémen sendo que neste estudo o sémen fresco não foi avaliado.⁹² Outros estudos, relatam taxas de fertilidade significativamente superiores para o sémen refrigerado quando comparado com o sémen congelado.^{51,91}

Outro estudo, onde se avaliou a fertilidade do sémen refrigerado, relatou uma taxa de gestação média por ciclo de 48%, a baixa taxa de sucesso foi associada a outras causas secundárias que possam prejudicar o sémen e não à alteração da temperatura de refrigeração, sendo que os garanhões não foram selecionados com base nas suas características reprodutivas.⁹³

5.2.3. **Idade do garanhão**

Assim como nas éguas, a atividade reprodutiva nos garanhões inicia-se na puberdade, estendendo-se ao longo de toda a vida. A partir dos 3 anos, a maioria dos animais já atingiu a puberdade e é capaz de cobrir éguas, no entanto, a sua capacidade de produção de spz é limitada. A idade em que o animal é capaz de produzir spz em número suficiente para cobrir um conjunto maior de éguas ocorre geralmente a partir dos 5 anos de idade.⁴⁰

Diversos estudos constataram que os garanhões mais férteis tinham idades entre os 5 e os 8 anos, sendo que ocorre uma redução significativa, mas lenta da fertilidade do garanhão com o aumento da idade, sobretudo a redução da qualidade do sémen, a partir

dos 20 até aos 29 anos. Ao contrário das éguas os garanhões amadureciam mais tarde, mas também envelheciam mais tarde e mais lentamente.^{36,40,58,94}

À medida que o garanhão vai envelhecendo, a concentração de sémen por ejaculado tendo a diminuir, o volume do ejaculado e a motilidade dos spz tendem a apresentar níveis mais baixos, verificando-se o mesmo em garanhões muito jovens. Foi constatado que a concentração espermática máxima foi verificada na faixa etária entre os 10 e os 14 anos e a mínima em garanhões entre os 20 e os 26 anos.⁴³ Noutro estudo, os valores de concentração superiores foram obtidos nos garanhões mais jovens (entre os 4 e os 6 anos).⁴²

A idade do macho é uma das principais causas de variação na morfologia e nas dimensões morfométricas dos spz com impacto na fertilidade.⁴³ Um estudo refere que a maior percentagem de spz com anomalias foi encontrada na faixa etária entre os 10 e os 14 anos, apresentando valores muito semelhantes entre os 15 e os 26 anos e um valor mínimo em idade inferior a 10 anos.⁴³ Noutro estudo, a maior percentagem de spz com anomalias foi identificada no grupo dos garanhões mais velhos (entre os 15 e os 22 anos).⁴²

5.2.4. Doenças do garanhão que afetam a fertilidade

Existe uma grande variedade de doenças relatadas em garanhões que afetam a fertilidade, sendo que algumas são particularmente importantes de ser referidas, por serem mais comuns ou como potenciais causadoras de baixa fertilidade.⁹⁵

Neste contexto, é importante referir a degeneração testicular (DT) estando descrita como uma causa comum e progressiva de infertilidade em garanhões. Esta pode ser focal ou difusa, unilateral ou bilateral. É definida por um conjunto de achados clínicos, como a diminuição do tamanho testicular, da fertilidade e da qualidade do sémen. Esta pode ser subdividida de duas formas. A DT de causa conhecida (como por exemplo, subsequente a um trauma, exposição ao calor e ao frio, a radiação, a toxinas específicas ou isquemia, etc.) sendo que, a gravidade depende do tempo de exposição, havendo possibilidade de recuperação quando apenas uma área é afetada e não é progressiva.⁹⁵

A segunda forma de degeneração testicular é a DT de causa idiopática (sem causa conhecida). Está associado mais frequentemente a animais mais velhos, sendo que também pode afetar animais jovens. Geralmente, é progressiva, à medida que o garanhão envelhece (a partir dos 20 anos) afetando negativamente as funções testiculares (produção de gâmetas e de hormonas) resultando numa diminuição da fertilidade, podendo levar mesmo à esterilidade.^{95,96} A sua patogénese ainda é pouco definida, mas vários estudos hormonais feitos em garanhões mais velhos e subférteis indicam que a possível causa se encontra nos testículos e não no eixo hipotálamo-hipófise.⁹⁵ Em casos avançados, o desenvolvimento da doença pode levar à azoospermia (ausência de spz no líquido seminal).⁹⁵

Relativamente ao pénis, é importante relatar as doenças infecciosas sexualmente transmissíveis, sendo a mais comum em garanhões causada pelo herpesvírus equino tipo 3 (EHV-3), responsável pelo exantema coital equino (ECE). É um vírus extremamente contagioso, mas não invasivo, provoca lesões como erosões e/ou ulcerações na genitália externa da égua e do garanhão, provocando dor e podendo levar a infertilidade temporária, sendo na maior parte dos casos benigno.^{97,98} A interrupção forçada e temporária da reprodução de animais infetados e a possibilidade de disseminação e surtos em centros reprodutivos são a principal preocupação com impacto negativo a nível económico para a indústria equina.⁹⁸ A realização de IA diminuiu os surtos da doença, sendo que foram registados surtos em centros de IA e transferências de embriões (TE) associados à utilização de materiais contaminados em várias éguas.⁹⁹

Existem uma grande variedade de bactérias colonizadoras da genitália externa do garanhão. A maior parte destas pertencem à sua flora comensal, sendo que outras são patogénicas e podem provocar o desenvolvimento de uma infeção no garanhão, com eliminação da bactéria durante a monta e/ou no sémen, com possibilidade de transmissão para éguas suscetíveis, resultando no desenvolvimento de endometrite aguda e conseqüentemente numa diminuição da fertilidade. As bactérias mais frequentemente isoladas são a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Taylorella equigenitalis*.^{100,101}

A *K. pneumoniae* está presente sobretudo nas fezes, sistema respiratório e reprodutivo, pode provocar infecção genital, estando localizada sobretudo na pele do pênis ou na fossa glandular.¹⁰⁰

A *P. aeruginosa* é frequentemente encontrada na pele da genitália externa do garanhão e da égua, podendo não causar infecções. No entanto, na presença de lesões na pele ou na mucosa, torna-se altamente infecciosa, levando ao desenvolvimento de endometrites nas éguas, podendo levar a aborto e a infertilidade.¹⁰⁰ Um estudo que utilizou um garanhão portador de *P. aeruginosa* como reprodutor, tanto para monta natural como para IA, relatou que não houve incidência da redução da fertilidade. No entanto, mais de 50% das éguas sujeitas a monta natural desenvolveram doença uterina e metade das éguas reproduzidas por monta natural testou positivo para *P. aeruginosa*, comparando com as 22% que desenvolveram doença após a IA.¹⁰²

A *Taylorella equigenitalis* é o organismo responsável pelo desenvolvimento da metrite contagiosa equina (MCE), sendo considerada a única verdadeira doença venérea sexualmente transmissível em cavalos.^{100,103} São bactérias colonizadoras da genitália externa do garanhão (fossa uretral, uretra ou bainha) sendo este portador assintomático. No entanto, em éguas é responsável pelo desenvolvimento de vaginite purulenta grave, cervicite e endometrites graves.^{100,103} Este também pode ser transmitido por instrumentos contaminados (espéculos vaginais, VA, luvas, etc.) e sêmen contaminado seja fresco, refrigerado ou congelado.¹⁰⁰ Nas éguas, é responsável por graves lesões a nível do endométrio, provocando uma grande diminuição da fertilidade e pode mesmo causar aborto. As éguas ao recuperarem, ficam portadoras da doença e a bactéria pode ser cultivada a partir da fossa clitoriana.^{100,103}

As vesículas seminais também podem ser afetadas pela infecção bacteriana, desenvolvendo uma vesiculite seminal infecciosa em garanhões, onde os principais agentes isolados são a *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus vulgaris* e *Brucella abortus*. Apesar de não ser muito comum, é importante referir devido à sua possibilidade de transmissão venérea e efeito deletério na fertilidade.¹⁰³

A presença de sangue no sêmen, conhecida como hemospermia, pode manifestar-se de maneira regular ou intermitente e foi identificada como um fator vinculado à

redução da fertilidade ou subfertilidade em garanhões. Ocorre mais frequentemente em garanhões muito usados para reprodução e está associado a diversas lesões e doenças do trato reprodutivo masculino.¹⁰⁴ Um estudo demonstrou que apenas a presença do sangue no sémen não é indicativo de subfertilidade. Os resultados demonstraram que a quantidade de sangue no ejaculado era determinante. Ejaculados com até 5% de sangue obtiveram taxas de gestação elevadas, contrariamente a ejaculados com concentrações sanguíneas elevadas (50%).¹⁰⁴

5.3. Consanguinidade

Em garanhões está descrito que elevados níveis de endogamia afetam a qualidade do sémen, com um maior impacto na concentração de spz no ejaculado.^{88,94,101}

Foi sugerido que a diminuição da fertilidade masculina é uma das primeiras consequências relacionadas com o aumento da endogamia, uma vez que as mutações ocorrem com maior frequência na linhagem germinativa masculina. Assim, é plausível inferir que a redução observada no desempenho reprodutivo em uma população altamente endogâmica é principalmente atribuída à diminuição da fertilidade masculina, o que se pode manifestar na redução da qualidade do sémen.¹⁰¹

Um estudo realizado com cavalos Puro Sangue Lusitano verificou que à medida que endogamia aumentava, ocorreu um declínio significativo na motilidade dos spz, na sua concentração, no número total de spz e no número total de spz móveis por ejaculado.⁹⁴ Outro estudo realizado com pôneis demonstrou que animais com elevados níveis de consanguinidade apresentavam uma redução da percentagem de spz móveis progressivos e aumento de anomalias morfológicas.¹⁰¹

A endogamia resulta em carga mutacional nas populações que pode impactar negativamente a viabilidade populacional. A preservação da diversidade genética é crucial uma vez que desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde global da população. Através da introdução de indivíduos geneticamente diferentes em populações com elevados níveis de endogamia, é possível reduzir a consanguinidade numa população.¹⁰¹

III- Estudo de caso

1. Objetivos

O objetivo do presente estudo retrospectivo foi avaliar os principais fatores que podem afetar a fertilidade de um programa de inseminação artificial em éguas de Puro Sangue Lusitano. Foi avaliado o efeito do:

- 1) Ano;
- 2) Mês de IA;
- 3) Idade da égua;
- 4) Tipo de cio;
- 5) Estado reprodutivo;
- 6) Lado e tipo de ovulação;
- 7) Edema pré e pós inseminação;
- 8) Presença de endometrite;
- 9) Consanguinidade da égua e do garanhão;
- 10) Efeito do garanhão;
- 11) Tipo de sémen;
- 12) Motilidade do sémen (antes e depois da adição de diluidor).

2. Material e métodos

Foram avaliados os registos de 447 éguas da coudelaria de Alter Real distribuídas ao longo de 8 épocas reprodutivas diferentes, correspondentes aos anos de 2016 a 2023. Em média por ano, foram utilizadas 56 éguas. Foram seguidos e registados 824 ciclos, sendo que o número de ciclos seguidos em cada época varia de 88 a 121.

A caracterização da amostra para as éguas inclui informações sobre o estado reprodutivo do ano anterior, idade, tipo de cio e consanguinidade e para os garanhões sobre o sémen utilizado e consanguinidade. A idade média das éguas por época foi de 12 anos. Para a análise estatísticas as éguas foram agrupadas em classes de idade, o mesmo procedimento sendo utilizado para avaliar o efeito da consanguinidade. As classes formadas podem ser identificadas na seguinte tabela (tabela 3).

Os dados disponíveis incluem informações sobre os 36 garanhões utilizados para as inseminações, com um total de 824 colheitas de sêmen e a frequência de uso de cada um na amostra. O garanhão mais utilizado apresenta um total de 76 colheitas e o menos utilizado apenas 1 vez.

Foi calculada a fertilidade com bases nas seguintes fórmulas:

- Fertilidade aos 14 dias por ciclo= nº de éguas gestantes aos 14 dias/ nº de éguas inseminadas ou cobertas por ciclo (* 100)
- Fertilidade por época= nº de éguas gestantes/ nº de éguas inseminadas ou cobertas na época (* 100)

Foi utilizado o programa SPSS versão 24, sendo realizados testes de análise de variância e qui quadrado. As diferenças foram consideradas significativas para um valor de $p < 0,05$.

Tabela 3- Divisão em classes dos fatores de estudo e sua representatividade em percentagem no presente estudo. (n= 8687)

Animais	Fatores de estudo	Classes	Representatividade (%)
Éguas	Estado reprodutivo	Parida	63,1
		Alfeira	28,4
		Nulípara	8,5
	Idade (anos)	≤ 10 anos	40,6
		>10 e < 15 anos	19,4
		≥15 anos	40
	Tipo de cio	Cio normal	89,6
		Cio do poldro	10,4
	Consanguinidade (%)	< 10	50,7
≥ 10		49,3	
Garanhões	Sêmen	Fresco	80,0
		Refrigerado	2,1

		Congelado	18,0
	Consanguinidade	< 10	46,6
	(5)	≥ 10	53,4

Todas as éguas foram sujeitas a controlo reprodutivo (anexo 1) através de palpação e ecografia transretal utilizando uma sonda de 5 MHz ao longo da época reprodutiva, onde foram registadas informações relativamente ao desenvolvimento folicular e edema uterino, de forma a monitorizar e a controlar a fase do ciclo éstrico em que esta se encontrava.

Durante o acompanhamento ecográfico, após ser verificada a existência do folículo dominante, este era seguido e registado o seu tamanho. Quando o diâmetro médio era igual ou superior a 35 mm, era feita a indução da ovulação (hCG ou triptorrelina) e a égua inseminada 24h depois, aquando da utilização de sémen fresco. Na utilização de sémen congelado a égua era seguida de 6 em 6 horas, a partir das 24 horas após a indução, sendo a inseminação realizada 12 horas antes da ovulação ou até 6 horas após.

No caso de ser utilizado sémen fresco ou refrigerado, o método de inseminação utilizado foi a IA intrauterina onde o sémen é introduzido diretamente no útero. Neste caso, uma sonda de inseminação com uma seringa acoplada que contém o sémen é guiada através da cérvix até ao útero com auxílio do dedo indicador. Após confirmar que a sonda se encontra no local correto o êmbolo da seringa é pressionado de forma a depositar o sémen no útero.

No caso de ser utilizado sémen congelado, o método de inseminação utilizado foi a IA intrauterina profunda, no qual o sémen é depositado no corno uterino do lado ipsilateral à ovulação. Neste caso, a sonda de inseminação é mais comprida, e após passar o cérvix é guiada para o corno uterino através de palpação transretal.

O agente indutor de ovulação, foi a triptorrelina (*Decapeptyl*®, 0,1 mg/ml, SC), agonista de GnRH, de forma a estimular a ovulação em 36 a 48h ou a hCG (Chorolun®, 1500 UI).¹¹⁸

Quando no controlo ecográfico, foi registado a presença de CL há mais de 5 dias, foi administrado dinoprost (*Dinolytic*® 5 mg/animal, IM), PGF2alfa, de forma a provocar a regressão do CL e retorno à atividade cíclica mais rapidamente.¹¹⁸

Em relação ao edema, foi registado o grau pré-IA e pós- IA, segundo o sistema de pontuação usado para avaliar a evolução do edema uterina em éguas (retirado de McCue, 2011) em 0 (nenhum), 1 (ligeiro), 2 (moderado) e 3 (intenso).

Foi considerada a existência de endometrite para éguas com presença de líquido intrauterino visualizado ecograficamente, 24 horas após a IA, ou a presença de citologia inflamatória. Na presença de líquido uterino (>1cm e < 2 cm) a égua foi tratada com ocitocina (Facilpart® 25-100 UI/animal, SC,IM,IV). Quando a quantidade excedeu os 2 cm, foi realizada a lavagem uterina e posterior administração de ocitocina.¹¹⁸

O diagnóstico de gestação foi efetuado aos 14 dias pós-ovulação através de ecografia transretal.

O sémen foi obtido nas instalações da Coudelaria de Alter, com recurso a manequim e vagina artificial INRA. Após a recolha, o sémen, foi avaliado e processado de forma a obter-se a dose inseminante, tal como descrito anteriormente. Foi utilizado sémen fresco, refrigerado e congelado. A dose inseminante preparada para sémen fresco e refrigerado foi de 500-1000 milhões de spz/móveis e para sémen congelado de 200 milhões de spz/móveis.

3. Resultados

3.1. Efeito do ano

O ano não teve influência estatisticamente significativa na fertilidade avaliada aos 14 dias (por ciclo) (p=0,7) (tabela 4).

Tabela 4- Efeito do ano na fertilidade aos 14 dias (n= 824).

ANO	n	Média ± Desvio padrão
2016	88	0,51 ± 0,503
2017	121	0,45 ± 0,500
2018	85	0,54 ± 0,501
2019	100	0,56 ± 0,499
2020	110	0,52 ± 0,502
2021	121	0,45 ± 0,500
2022	109	0,52 ± 0,502
2023	90	0,48 ± 0,502
Total	824	0,50 ± 0,500

Do mesmo modo o ano não apresentou influência estatisticamente significativa na fertilidade por época reprodutiva ($p=0,3$) (tabela 5).

Tabela 5- Efeito do ano na fertilidade da época (n=447)

ANO	n	Média ± Desvio padrão
2016	48	0,63 ± 0,489
2017	59	0,76 ± 0,429
2018	52	0,71 ± 0,457
2019	58	0,76 ± 0,432
2020	57	0,74 ± 0,444
2021	61	0,79 ± 0,413
2022	58	0,83 ± 0,381
2023	54	0,67 ± 0,476
Total	447	0,74 ± 0,440

3.2.Efeito do mês em que ocorreu a inseminação

O mês em que foi realizada a IA apresentou uma influência estatisticamente significativa ($p=0,015$) na fertilidade avaliada aos 14 dias (por ciclo) (tabela 6). A maior taxa de fertilidade foi obtida no mês de março (57%) seguida do mês de maio (54%)

fevereiro (51%) abril (46%) junho (36%) tendo sido o mês de janeiro o mês com a taxa de fertilidade mais baixa (30%).

Tabela 6- Efeito do mês na fertilidade aos 14 dias (n=824)

MÊS IA	n	Média ± Desvio padrão
Janeiro	20	0,30 ± 0,470
Fevereiro	72	0,51 ± 0,503
Março	209	0,57 ± 0,496
Abril	252	0,46 ± 0,499
Maiο	216	0,54 ± 0,500
Junho	55	0,36 ± 0,485
Total	824	0,50 ± 0,500

A grande maioria das inseminações ocorreu em março e maio. O mês em que foi realizada a IA teve uma influência estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando avaliada para a fertilidade geral da época (tabela 7). Das 5 éguas que ficaram gestantes aos 14 dias no mês de janeiro nenhuma perdeu a gestação o que leva a que a fertilidade da época por ano seja de 100% em janeiro, seguido de março (95%) e fevereiro (83%), abril (81%), maio (69%). Na medida em que as éguas deixam de ser inseminadas a 10 de junho, na maioria dos anos, as éguas que não ficaram gestantes nesse mês não voltaram a ser inseminadas, pelo que em junho a fertilidade por época foi inferior (23%).

Tabela 7- Efeito do mês de inseminação na fertilidade por época (n=447)

MÊS IA	n	Média ± Desvio padrão
Janeiro	5	1,00 ± 0,000
Fevereiro	24	0,83 ± 0,381
Março	102	0,95 ± 0,217
Abril	119	0,81 ± 0,397
Maiο	144	0,69 ± 0,462
Junho	53	0,23 ± 0,423
Total	447	0,74 ± 0,440

3.3.Efeito da idade da égua

A idade da égua não apresentou um efeito estatisticamente significativo ($p=0,275$) quando avaliada para a fertilidade por ciclo (tabela 8).

Tabela 8- Fertilidade aos 14 dias em função da idade (n=824)

IDADE	n	Média ± Desvio padrão
≤ 10 anos	378	0,53 ± 0,500
> 10 anos e ≤ 15 anos	259	0,50 ± 0,501
> 15 anos	187	0,45 ± 0,499
Total	824	0,50 ± 0,500

A idade da égua teve um efeito estatisticamente significativo ($p<0,001$) quando avaliada para a fertilidade geral da época (tabela 9). A análise sugere que o grupo dos animais com idades inferiores a 10 anos e o grupo dos 10 aos 15 anos obtiveram valores superiores de fertilidade (ambos com 78%) quando comparado com o grupo dos animais mais velhos (58%).

Tabela 9- Fertilidade por época em função da idade (n=447)

IDADE	n	Média ± Desvio padrão
≤ 10 anos	213	0,78 ± 0,412
> 10 anos e ≤ 15 anos	139	0,78 ± 0,418
> 15 anos	95	0,58 ± 0,496
Total	447	0,74 ± 0,440

A idade da égua não teve efeito estatisticamente significativo ($p=0,289$) no número de ciclos seguidos por égua por época (tabela 10).

Tabela 10- Número de ciclos médios seguidos em função da idade (n=446)

IDADE	n	Média ± Desvio padrão
≤ 10 anos	212	1,7925 ± 1,03234
> 10 anos e ≤ 15 anos	139	1,8849 ± 1,05005
> 15 anos	95	1,9895 ± 0,99461
Total	446	1,8632 ± 1,03061

3.4. Efeito do tipo de cio

O efeito do tipo de cio teve uma influência estatisticamente muito significativa ($p < 0,001$) quando avaliada para a fertilidade por ciclo (tabela 11). A análise sugere que a fertilidade por ciclo é superior quando a IA é realizada no cio do poldro (98%) quando comparado com a utilização do cio normal (45%).

Tabela 11- Efeito do tipo de cio na fertilidade aos 14 dias (n=824)

TIPO DE CIO	n	Média ± Desvio padrão
Normal	738	0,45 ± 0,498
Cio do poldro	86	0,98 ± 0,152
Total	824	0,50 ± 0,500

O efeito do tipo de cio teve uma influência estatisticamente significativa ($p = 0,009$) quando avaliada para a fertilidade geral da época (tabela 12). A análise sugere que a fertilidade por época é superior quando a IA é realizada no cio do poldro (85%), quando comparado com a utilização do cio normal (71%).

Tabela 12- Efeito do tipo de cio na fertilidade por época (n=447)

TIPO DE CIO	n	Média ± Desvio padrão
Normal	361	0,71 ± 0,454
Cio do poldro	86	0,85 ± 0,360
Total	447	0,74 ± 0,440

3.5. Número de ciclos seguidos e o número de inseminações

O número de ciclos seguidos para que a égua ficasse gestante variou em função da época, sendo que esta variação não apresentou efeito estatisticamente significativo ($p=0,3$) na fertilidade (tabela 13). A análise sugere que o ano de 2017 foi ano em que foram necessários seguir mais ciclos até que as éguas fossem gestantes, sendo no ano de 2023 o ano que se foi necessário seguir menos ciclos.

Tabela 13- Número de ciclos seguidos por égua por época (n=447)

ÉPOCA	n	Média ± Desvio padrão
2016	48	1,8333 ± 1,19098
2017	59	2,0847 ± 1,05517
2018	52	1,6346 ± 0,95031
2019	58	1,7414 ± 1,03552
2020	57	1,9474 ± 1,12474
2021	61	1,9836 ± 1,11791
2022	58	1,8966 ± 0,89226
2023	54	1,7222 ± 0,81070
Total	447	1,8613 ± 1,03026

O número de inseminações totais realizadas por égua durante toda época teve uma influência estatisticamente significativa ($p<0,001$) (tabela 14). A análise sugere que o ano de 2017 foi o que necessitou de maior número de IA's por égua por época (3,2203) sendo que foi no ano 2023 que esse valor atingiu valores mais baixos (1,7593).

Tabela 14- Número de IA´s totais por égua por época (n=445)

ÉPOCA	n	Média ± Desvio padrão
2016	48	3,1259 ± 2,81806
2017	59	3,2203 ± 2,52619
2018	52	2,5000 ± 1,48852
2019	57	2,7544 ± 1,86395
2020	57	2,2982 ± 1,56941
2021	61	2,2295 ± 1,55342
2022	57	2,0351 ± 1,01708
2023	54	1,7593 ± 0,84530
Total	445	2,4831 ± 1,85701

3.6.Efeito do estado reprodutivo

O estado reprodutivo da égua não apresentou efeito estatisticamente significativa (p=0,6) quando avaliada para a fertilidade por ciclo (tabela 15).

Tabela 15- Efeito do estado reprodutivo na fertilidade aos 14 dias (n=824)

REPRODUÇÃO ANTERIOR	n	Média ± Desvio padrão
Alfeira	234	0,48 ± 0,501
Parida	520	0,51 ± 0,500
Nulípara	70	0,54 ± 0,502
Total	824	0,50 ± 0,500

O estado reprodutivo da égua não apresentou efeito estatisticamente significativa (p=0,216) quando avaliada para a fertilidade geral por época (tabela 16).

Tabela 16- Efeito do estado reprodutivo na fertilidade por época (n=447)

REPRODUÇÃO ANTERIOR	n	Média ± Desvio padrão
Alfeira	124	0,73 ± 0,448
Parida	282	0,73 ± 0,446
Nulípara	41	0,85 ± 0,358
Total	447	0,74 ± 0,440

3.7. Efeito do lado e tipo de ovulação

O lado e o tipo de ovulação tiveram uma influência estatisticamente significativa ($p=0,003$) quando avaliada para a fertilidade por ciclo (tabela 17). A análise sugere que a fertilidade atingiu valores máximos (100%) quando a ovulação foi dupla. Tendo sido verificado a fertilidade mais baixa (47%) quando a ovulação ocorreu do lado esquerdo.

Tabela 17- Efeito do lado e tipo de ovulação na fertilidade aos 14 dias (n=823)

OVÁRIO	n	Média ± Desvio padrão
Direito	348	0,54 ± 0,499
Esquerdo	467	0,47 ± 0,500
Dupla	8	1,00 ± 0,000
Total	823	0,50 ± 0,500

O lado e o tipo de ovulação não apresentaram um efeito estatisticamente significativa ($p=0,597$) quando avaliada para a fertilidade geral por época (tabela 18).

Tabela 18- Efeito do lado e tipo de ovulação na fertilidade por época (n=447)

OVÁRIO	n	Média ± Desvio padrão
Direito	199	0,74 ± 0,438
Esquerdo	241	0,74 ± 0,440
Dupla	7	0,57 ± 0,535
Total	447	0,74 ± 0,440

3.8. Efeito da presença de edema pré e pós-IA

A presença de edema antes da IA, não apresentou um efeito estatisticamente significativa ($p=0,075$) quando avaliada para a fertilidade por ciclo (Tabela 19).

Tabela 19- Efeito do edema pré-IA na fertilidade aos 14 dias (n=777)

EDEMA PRÉ- IA	n	Média ± Desvio padrão
0	190	0,43 ± 0,497
1	343	0,52 ± 0,500
2	185	0,56 ± 0,497
3	59	0,47 ± 0,504
Total	777	0,50 ± 0,500

A presença de edema depois da IA, não teve um efeito estatisticamente significativa ($p=0,723$) quando avaliada para a fertilidade por ciclo (Tabela 20).

Tabela 20- Efeito do edema pós-IA na fertilidade aos 14 dias (n=660)

EDEMA PÓS-IA	n	Média ± Desvio padrão
0	401	0,51 ± 0,501
1	191	0,53 ± 0,500
2	56	0,46 ± 0,503
3	12	0,42 ± 0,515
Total	660	0,51 ± 0,500

3.9. Efeito de endometrite

A presença de endometrite apresentou influência estatisticamente significativa ($p=0,003$) quando avaliada para a fertilidade por ciclo (Tabela 21). A análise sugere que a fertilidade atingiu valores superiores (53%) em animais sem endometrite quando comparado com animais que apresentavam a inflamação (40%).

Tabela 21- Efeito da presença de endometrite na fertilidade aos 14 dias (n=806)

ENDOMETRITE	n	Média ± Desvio padrão
Ausência de sinais de endometrite	645	0,53 ± 0,500
1	161	0,40 ± 0,491
Total	806	0,50 ± 0,500

3.10. Efeito da consanguinidade

A consanguinidade teve efeito estatisticamente significativo na fertilidade dos garanhões ao ciclo ($p=0,003$) (Tabela 22). A análise dos valores sugere maior fertilidade quando o nível de consanguinidade do garanhão é inferior a 10% (56%).

Tabela 22- Efeito da consanguinidade nos garanhões na fertilidade aos 14 dias (n=824)

CONSANGUINIDADE	n	Média ± Desvio padrão
<10	384	0,56 ± 0,497
≥10	440	0,45 ± 0,498
Total	824	0,50 ± 0,500

A consanguinidade das éguas não teve efeito estatisticamente significativo na fertilidade da época ($p=0,111$) (Tabela 23).

Tabela 23- Efeito da consanguinidade nas éguas na fertilidade por época (n=447)

CONSANGUINIDADE	n	Média ± Desvio padrão
<10	227	0,77 ± 0,421
≥10	220	0,70 ± 0,457
Total	447	0,74 ± 0,440

3.11. Efeito do garanhão

O efeito do garanhão teve influência estatisticamente significativa ($p<0,001$) quando avaliado para a fertilidade por ciclo (tabela 24). A análise sugere uma grande variabilidade da fertilidade consoante o garanhão utilizado que vai desde 100% a 0% de fertilidade.

Tabela 24- Efeito do garanhão na fertilidade aos 14 dias (n=824)

GARANHÃO	n	Média ± Desvio padrão
1	2	1,00 ± 0,000
2	76	0,51 ± 0,503
3	9	0,78 ± 0,441
4	22	0,82 ± 0,395
5	72	0,53 ± 0,503
6	18	0,61 ± 0,502
7	45	0,31 ± 0,468
8	1	
9	66	0,45 ± 0,502
10	36	0,56 ± 0,504
11	22	0,45 ± 0,510
12	23	0,61 ± 0,499
13	27	0,44 ± 0,506
14	54	0,24 ± 0,432
15	11	0,91 ± 0,302
16	4	0,50 ± 0,577
17	9	0,78 ± 0,441
18	10	0,60 ± 0,516
19	22	0,55 ± 0,510
20	33	0,55 ± 0,506
21	11	0,73 ± 0,467
22	5	0,00 ± 0,000
23	7	0,71 ± 0,488
24	1	
25	36	0,50 ± 0,507
26	30	0,83 ± 0,379
27	31	0,45 ± 0,506
28	16	0,19 ± 0,403
29	6	0,67 ± 0,516
30	30	0,33 ± 0,479
31	32	0,50 ± 0,508
32	6	0,17 ± 0,408
33	7	0,43 ± 0,535
34	8	0,50 ± 0,535
35	4	0,75 ± 0,500
36	32	0,50 ± 0,508
Total	824	0,50 ± 0,500

O efeito do garanhão, não apresentou efeito estatisticamente significativo ($p=0,09$) quando avaliada para a fertilidade geral por época (tabela 25).

Tabela 25- Efeito do garanhão na fertilidade por época (n=447)

GARANHÃO	n	Média ± Desvio padrão
1	2	1,00 ± 0,000
2	48	0,71 ± 0,459
3	5	1,00 ± 0,000
4	17	0,76 ± 0,437
5	39	0,72 ± 0,456
6	11	0,73 ± 0,467
7	18	0,56 ± 0,511
8	1	
9	33	0,61 ± 0,496
10	22	0,77 ± 0,429
11	15	0,60 ± 0,507
12	15	0,87 ± 0,352
13	14	0,79 ± 0,426
14	15	0,47 ± 0,516
15	8	0,75 ± 0,463
16	2	1,00 ± 0,000
17	5	0,80 ± 0,447
18	8	0,75 ± 0,463
19	12	0,92 ± 0,289
20	18	0,83 ± 0,383
21	8	0,88 ± 0,354
22	1	
23	6	0,50 ± 0,548
25	15	0,93 ± 0,258
26	25	0,88 ± 0,332
27	14	0,93 ± 0,267
28	3	0,33 ± 0,577
29	4	1,00 ± 0,000
30	13	0,69 ± 0,480
31	17	0,88 ± 0,332
32	2	0,50 ± 0,707
33	4	0,50 ± 0,577
34	4	0,50 ± 0,577
35	3	0,67 ± 0,577
36	20	0,65 ± 0,489
Total	447	0,74 ± 0,440

3.12. Efeito do tipo de sêmen

O tipo de sêmen teve uma influência estatisticamente significativa ($p=0,007$) quando avaliado para a fertilidade por ciclo (tabela 26). A análise sugere que a fertilidade foi superior e igual quando utilizado sêmen fresco e refrigerado (53% para ambos) e inferior para o sêmen congelado (39%).

Tabela 26- Efeito do tipo de sêmen na fertilidades aos 14 dias (n=824)

TIPO DE SÊMEN	n	Média ± Desvio padrão
Fresco	659	0,53 ± 0,500
Congelado	148	0,39 ± 0,488
Refrigerado	17	0,53 ± 0,514
Total	824	0,50 ± 0,500

O tipo de sêmen não apresentou efeito estatisticamente significativo ($p=0,296$) quando avaliada para a fertilidade geral por época (tabela 27).

Tabela 27- Efeito do tipo de sêmen na fertilidade por época (n=447)

TIPO DE SÊMEN	n	Média ± Desvio padrão
Fresco	375	0,74 ± 0,440
Congelado	61	0,77 ± 0,424
Refrigerado	11	0,55 ± 0,522
Total	447	0,74 ± 0,440

3.13. Efeito da motilidade do sêmen

A motilidade pré-diluição não apresentou um efeito estatisticamente significativo ($p=0,511$) na fertilidade por ciclo (tabela 28).

Tabela 28- Efeito da motilidade pré-diluição na fertilidade aos 14 dias (n=454)

MOTILIDADE PRÉ-DILUIÇÃO	n	Média ± Desvio padrão
,10	13	0,54 ± 0,519
,15	2	0,00 ± 0,000
,20	20	0,40 ± 0,503
,30	37	0,54 ± 0,505
,40	40	0,45 ± 0,504
,50	83	0,48 ± 0,503
,60	86	0,52 ± 0,502
,65	1	
,70	108	0,56 ± 0,498
,75	2	0,50 ± 0,707
,80	54	0,61 ± 0,492
,85	2	0,00 ± 0,000
,90	6	0,33 ± 0,516
Total	454	0,52 ± 0,500

A motilidade pós-diluição não teve um efeito estatisticamente significativo ($p=0,131$) quando avaliada para a fertilidade por ciclo (tabela 29).

Tabela 29- Efeito da motilidade pós-diluição na fertilidade aos 14 dias (n=344)

MOTILIDADE PÓS-DILUIÇÃO	n	Média ± Desvio padrão
,20	7	0,43 ± 0,535
,30	8	0,63 ± 0,518
,35	3	0,67 ± 0,577
,40	23	0,30 ± 0,470
,50	34	0,47 ± 0,507
,60	38	0,50 ± 0,507
,65	3	1,00 ± 0,000
,70	95	0,56 ± 0,499
,80	100	0,62 ± 0,488
,85	2	0,00 ± 0,000
,90	31	0,61 ± 0,495
Total	344	0,55 ± 0,498

4. Discussão

4.1. Efeito do ano

No presente trabalho, o efeito do ano não teve influência estatisticamente significativa na fertilidade avaliada aos 14 dias (por ciclo) por ano ($p=0,7$) nem quando a avaliada para a fertilidade geral da época reprodutiva por ano ($p=0,3$). Tendo sido encontrado uma tendência para os valores fertilidade manterem-se constantes ao longo dos anos (2016-2023). Contrariando o que foi descrito em estudos anteriores onde foram verificadas valores de fertilidade crescentes de um ano para o outro.⁵¹ No entanto, é necessário ter em conta que estes estudos foram realizados comparando os anos 80 até os anos 2000, onde ocorreu uma grande alteração do maneio utilizado em garanhões e em éguas.⁵¹ No presente estudo, ao longo destes anos as técnicas de maneio mantiveram-se semelhantes não tendo sido alvo de grandes alterações.

No entanto, podemos verificar que os valores de fertilidade quando avaliados ao ciclo apresentaram uma média total mais baixa (50%) do que quando a fertilidade foi avaliada por época reprodutiva (74%) apresentando assim uma melhor eficácia do que eficiência. Isto deve-se ao facto de a taxa de gestação por época não ter em conta o número de serviços/ciclos que foram necessários até um diagnóstico de gestação positivo, podendo ser muito melhorada através de um bom maneio, gestão e trabalho do MV.^{51,52}

O número de ciclos seguidos e o número de inseminações por égua por época representam a variável de resposta perante a variação de fertilidade, sendo que pode ser interessante comparar o impacto económico entre dois anos com a mesma fertilidade. Por exemplo, nos anos de 2017 e 2019 ambos obtiveram 76% de fertilidade, porém no ano de 2017 foram seguidos em média 2,08 ciclos/égua/época e necessárias em média 3,22 IA/égua/época e no ano 2019 foram seguidos em média 1,14 ciclos/égua/época e necessárias em média 2,15 IA/égua/época, verificando-se uma maior rentabilidade económica no ano de 2019, devido a uma menor utilização de recursos.

Uma justificação por este acontecimento são as condições climáticas variáveis a que os diferentes anos são sujeitos, tendo sido verificado que o ano de 2017, na região de Portalegre em Portugal foi sujeito a um período de seca moderado, enquanto o ano de

2019 foi registado um período de seca fraco. A equada de Alter Real encontra-se predominantemente em regime extensivo pelo que alterações na quantidade de oferta de pastagem, tem impacto na sua condição corporal e consequentemente na sua capacidade reprodutiva.¹¹⁷

4.2. Efeito do mês de IA

O mês de cobertura em que foi realizada a IA apresenta uma influência estatisticamente significativa na fertilidade quando avaliado ao ciclo ($p=0,015$) assim como, quando avaliada por época ($p<0,001$) estando de acordo com o verificado em diversos estudos.^{56,46,58}

Quando avaliada por ciclo, a maioria dos meses correspondentes à primavera obtiveram valores de fertilidade mais altos (exceção de abril) seguido dos meses de verão e por último os meses de inverno com menor fertilidade (com exceção de fevereiro). Estando de acordo com a bibliografia e a maior parte dos estudos, que constaram que a primavera corresponde à estação mais fértil.^{4,5,56} Estes resultados podem ser justificados pelo aumento do fotoperíodo devido ao aumento da duração dos dias, que normalmente está associado também ao aumento da temperatura.^{4,5} O mês de fevereiro foi o 3º mês mais fértil da época, apesar de ser inverno, o fotoperíodo já começa a ser maior, sendo o mês que muitas éguas saem do período de transição entrando na época reprodutiva. Nesta fase as éguas começam a ser inseminadas e alta taxa sucesso pode ser justificada, pelo facto da maior parte das éguas ainda se encontrar por inseminar, sendo que as éguas mais férteis apresentam uma taxa de sucesso elevada logo nas primeiras inseminações.⁵¹

Em abril ocorreu uma ligeira quebra da fertilidade, isso pode ser justificado pelo facto de nesta fase a maior parte das éguas já se encontrar gestante, sendo que o grupo que fica normalmente para esta fase são éguas que não ficaram gestantes nas primeiras tentativas e por isso requerem mais tempo e maior número de inseminações (éguas problema) levando a quebra da fertilidade deste mês.⁵¹

Quando avaliada à época, no presente estudo os meses de inverno apresentaram os valores de fertilidade mais elevados (sobretudo janeiro), no entanto o número reduzido de animais inseminados e a possível sobreposição com éguas em cio do poldro não

permite tirar conclusões. A primavera apresentou valores de fertilidade elevados (com exceção de maio), tendo sido o verão a estação com valores de fertilidade mais baixa, o que se pode justificar por em maio serem inseminadas as éguas não gestantes até essa altura, ou seja que eventualmente têm um maior nº de ciclos anteriores ou então éguas que pariram tardiamente na época reprodutiva, não tendo por isso muitas oportunidades de ficar gestantes. Estes resultados vão de encontro à maior parte dos estudos onde a taxa de fertilidade por época se manteve elevada nos meses de primavera.^{46,51,58}

4.3. Efeito da idade da égua

No presente estudo, a idade da égua não apresenta efeito estatisticamente significativo ($p=0,275$) quando avaliada para a fertilidade por ciclo. No entanto, foi notado uma tendência de decréscimo de fertilidade com o aumento da idade.

O mesmo fator quando avaliado para a fertilidade geral da época teve um efeito muito significativo ($P<0,001$). A análise sugere que as éguas com idades inferiores a 10 anos até aos 15 anos obtiveram valores iguais e superiores de fertilidade (78%) quando comparado com o grupo dos animais mais velhos (58%), estando de acordo com a literatura que defende uma correlação negativa entre o aumento da idade e a eficiência reprodutiva e uma redução da fertilidade a partir dos 15 anos.^{3,59,60} Estando também de acordo com os resultados obtidos noutros estudos.^{58,62}

Uma justificação para uma baixa taxa de fertilidade de um grupo pode ser então a manutenção de éguas idosas e de grande valor genético na população reprodutora, normalmente por apresentarem as características ideais que se quer transmitir à descendência. As principais causas para a diminuição da fertilidade de éguas com idades superiores aos 15 anos e multíparas estão associadas, a má conformação perineal, à menor capacidade de contratilidade uterina, à incapacidade de relaxamento cervical, ao maior tamanho do útero e subsequente maior grau de afundamento do mesmo. Estes levam ao aumento da probabilidade de acumulação de líquido intrauterino e de corpos estranhos, consequentemente ao desenvolvimento de endometrites (infeciosas e EPPC).^{59,60,105} Podem ainda estar associadas ao atraso na entrada da época reprodutiva, aumento da duração do estro, resposta reduzida a fármacos de indução de ovulação e aumento de perdas embrionárias e fetais.¹⁰⁵

Outras causas associadas a subfertilidade de éguas mais velhas é o desenvolvimento de oócitos anormais afetando a fertilidade, independentemente de esta não apresentar patologia ovidutal e uterina.⁶² Está ainda relatado, em éguas mais velhas o alongamento da fase folicular e uma taxa de crescimento mais lenta do folículo ovulatório que pode afetar o meio folicular e a viabilidade oocitária.⁶² Podendo ainda estar associado à expressão diferencial de recetores uterinos de progesterona.⁶⁸

Associado ao aumento da idade, foi estudado também o aumento do desenvolvimento do número de quistos endometriais, com efeito depreciativo das taxas de gestação, desempenhando um papel na redução da fertilidade.¹⁰⁶

Na coudelaria de Alter não é comum a utilização de éguas com idade inferior aos 4 anos para reprodução, pelo que estas não fizeram naturalmente parte do presente estudo, no entanto está descrito que a atividade da égua aumenta da puberdade até aos 5 anos e que os piores resultados reprodutivos podem ser devidos à utilização de animais demasiado jovens, podendo ser a causa da redução da taxa de fertilidade de um grupo.⁶⁰

O efeito da idade não apresentou influência significativa no número de ciclos seguidos/égua/época ($p=0,289$), no entanto, verifica-se uma tendência de aumento do número de ciclos necessários para obter uma gestação com o aumento da idade da égua. Sendo que a partir dos 15 anos, o número de ciclos necessários apresenta valor máximo de 1,99.

4.4. Efeito do tipo de cio

No presente estudo, o efeito do tipo de cio utilizado na IA teve influência estatisticamente significativa na fertilidade, tanto quando avaliada ao ciclo como por época ($p<0,001$ e $p=0,009$, respetivamente). Em ambos os casos, foi verificado uma fertilidade bastante superior quando utilizado o cio do poldro (98% e 85%, respetivamente por ciclo e por época) em comparação com os valores obtidos através da utilização de um cio normal (45% e 71%).

Estes resultados são contraditórios ao descrito, onde seria esperado taxas de gestação 10 a 20% inferiores com a utilização do cio do poldro.^{49,65,66,67} Contradizendo a

maior parte dos estudos, onde foram obtidos piores resultados quando a inseminação foi feita no cio do poldro comparando com os cios subsequentes.^{55,68,70,71} Discordando também de um estudo onde se verificou taxas de fertilidade semelhantes independentemente do cio utilizado.⁷³ E de outro estudo que obteve taxas de gestação superiores para o cio do poldro, mas não significativamente diferentes das taxas de gestação de um cio normal.⁷⁴

No presente estudo, as taxas de gestação foram superiores para o cio do poldro e significativamente diferentes das taxas de gestação do cio normal, isto pode ser justificado pela seleção das fêmeas (relativamente à idade, ausência de problemas ao parto, inseminação apenas a partir dos 10 dias pós-parto e condição corporal) em que foi feita a reprodução no cio do poldro.⁶⁶

A média da idade das éguas de Alter Real é de 12 anos. Tendo sido verificado em estudos que em éguas mesmo que mantidas em boas condições corporais, por cada ano de aumento de idade, existe menos 6% de probabilidade de sucesso no cio do poldro, verificando-se que o sucesso do mesmo é dependente da idade.^{14,68} O sucesso do cio do poldro no presente estudo, pode então estar associado ao facto da idade média ser inferior aos 15 anos, idade onde a maior parte os autores defende um decréscimo da fertilidade.⁶⁰ Éguas jovens estão também associadas a uma mais rápida involução uterina, fator imprescindível para uma boa taxa de sucesso no cio do poldro.^{49,107}

A elevada taxa de sucesso no presente estudo, pode ser também justificada pelo facto de apenas serem inseminadas éguas no cio do poldro que não apresentem problemas ao parto, a escolha de éguas apenas reprodutivamente saudáveis influencia os resultados obtidos.⁶⁶ Foi demonstrado que éguas com distócia ou retenção de placenta, atrasam a involução uterina, não sendo claramente boas candidatas para a inseminação no cio do poldro e podendo levar a baixas taxas de fertilidade.⁶⁶ A inseminação de éguas no cio do poldro com acumulação de líquido intrauterino deve ser evitada e as éguas que acumularem líquido após a inseminação uma lavagem uterina deve ser realizada para garantir o sucesso.⁶⁶ Foi constatado que a taxa de mortalidade embrionária é 3 vezes superior em éguas com acumulação de líquido intrauterino durante o cio do poldro quando comparado com éguas com ausência de líquido.¹⁰⁷

Este sucesso pode também ser justificado pelo facto de na coudelaria de Alter Real apenas serem inseminadas éguas no cio do poldro depois dos 10 dias pós-parto. Estando descrito na literatura que éguas que ovulam 10-11 dias após o parto (ovulação mais tardia) apresentam taxas de sucesso superiores quando comparado com éguas que ovulam precocemente (< 10 dias) dentro do cio do poldro.⁴⁹ Isto pode ser justificado porque, quando mais tarde ocorrer a ovulação, maior será a margem temporária para que se dê o restabelecimento do endométrio e a expulsão total do líquido antes da entrada do embrião no útero, garantindo melhores condições uterinas para o desenvolvimento de uma nova gestação.⁴⁹

É importante ainda referir que a eguada é mantida durante todo o ano com uma boa alimentação (sistema de produção extensivo onde as pastagens representam a dieta principal das éguas e a adição de ração consoante as necessidades e a época do ano) o que lhes permite ter e manter uma boa condição corporal (> ou = 3) mesmo no período pós-parto. Estando de acordo com um estudo realizado em Portugal com cavalos lusitanos, foi verificado valores superiores de fertilidade quando os animais apresentavam score de condição corporal à concepção de 3.0 numa escala de 0 a 5.¹⁰⁸

A variabilidade de sucesso no cio do poldro demonstra que a sua utilização depende muito do maneio da exploração, tornando-se imprescindível avaliar as taxas de sucesso de anos anteriores para cada égua e ver se esta é uma boa candidata a inseminar nesta fase.⁴⁹

4.5. Efeito do estado reprodutivo

No presente estudo, o estado reprodutivo da égua não teve influência estatisticamente significativa para a fertilidade, nem quando avaliada ao ciclo ($p=0,6$) nem por época ($p=0,216$). No entanto, verificou-se uma tendência para os melhores resultados de fertilidade serem atingidos quando são utilizadas éguas nulíparas, estando de acordo com os estudos.⁷⁵ Ainda assim, contraria os resultados obtidos noutros estudos que concluíram que o grupo menos fértil era o das éguas nulíparas.^{51,55,58}

Isto pode ser justificado pelo facto de na coudelaria de Alter Real o grupo das éguas nulíparas, ser constituído sobretudo por éguas jovens, sendo a média das idades 9

anos (existe apenas uma égua com 12 anos, tendo a maioria 5 anos quando colocadas à reprodução pela primeira vez).

Nos outros estudos, em que foram atingidas taxas de fertilidade baixas com a reprodução de éguas nulíparas, estava associado ao facto de nos mesmos o grupo ser constituído por éguas mais velhas nunca antes reproduzidas que ingressaram em programas de reprodução após o final da carreira desportiva.⁵¹ Nestas é frequente a acumulação de líquido intrauterino, devido ao inadequado relaxamento da cérvix durante o estro e alterações dos tecidos como consequência do envelhecimento, sendo suscetíveis a EPPC levando a dificuldades reprodutivas embora nunca tenham sido reproduzidas antes.⁵⁶ O mesmo não se verificou na eguada de Alter.

4.6. Efeito do lado e tipo de ovulação

No presente estudo, o lado em que ocorreu a ovulação e o tipo de ovulação foi um fator que influenciou de forma significativa a fertilidade quando avaliada ao ciclo ($p=0,003$) não tendo sido verificado o mesmo quando avaliada por época ($p=0,597$). Os valores máximos de fertilidade foram atingidos quando ocorre uma ovulação dupla, sendo que estas ocorrem com menor frequência, estando de acordo com os resultados obtidos em outros estudos.^{55,77} Está descrito que uma das vantagens da superovulação é o aumento da fertilidade em éguas normais e subférteis, pois aumenta a probabilidade de haver um embrião bem-sucedido, aumentando também a eficiência reprodutiva quando é usado sémen de garanhões subférteis.^{109,110,111}

Verificou-se que as ovulações ocorreram com maior frequência do lado esquerdo, estando em concordância com o estudo, no entanto, neste estudo foi verificado apenas a frequência de ovulação de um lado ou de outro, não tendo sido associado à fertilidade.⁷⁷ Estes resultados estão em discordância com os obtidos noutros estudos, em que não foram verificadas alterações significativas na frequência de ovulação relativamente ao lado da ovulação.^{78,113}

No presente estudo, a ovulação ocorreu com maior frequência do lado esquerdo, sendo que o lado direito apresentou taxas de fertilidade ligeiramente superiores, não

justificáveis. Nas éguas a técnica de IA, não varia consoante o lado de ovulação, por isso a fertilidade apresenta valores semelhantes.

4.7. Efeito da presença de edema pré e pós-IA

No presente estudo, a variação dos graus de edema antes da IA ($p=0,075$) e após a IA ($p=0,723$) não afetaram significativamente a fertilidade. No entanto, foi verificado uma tendência de fertilidade superior quando antes da IA o grau de edema era 2 e após a IA o grau de edema era 1. Estando de acordo com o citado por diversos autores, onde antes da IA a égua encontra-se em estro, nesta fase está descrito que ecograficamente o útero apresenta evidência de edema, produzindo um efeito de “laranja fatiada” e variando entre o grau 1 a 2. Após a IA, se a égua ficar gestante irá entrar em diestro e o edema deve reduzir de grau 1 a 0.^{4,22}

4.8. Efeito da presença de endometrite

No presente estudo, a presença de endometrite influenciou de forma significativa a fertilidade ($p=0,003$), sendo que, animais que desenvolveram esta inflamação do endométrio apresentaram uma redução de 13% da fertilidade quando comparados com animais saudáveis. Estando de acordo com os estudos que descreveram a endometrite como a principal causa associada a éguas problema e conseqüentemente à redução da fertilidade.⁶⁷

Na coudelaria de Alter Real ao longo deste período de 8 anos, aproximadamente 20 % das éguas desenvolveram endometrite, estando de acordo com estudos, onde se verificou que a endometrite é uma condição bastante frequente e que 10-15% das éguas são suscetíveis ao desenvolvimento de EPPC.^{82,83}

Ao desenvolvimento da mesma foi estabelecida uma relação forte com um determinado conjunto de condições da égua, nomeadamente a idade, estando esta por si só associada a outras condições como: a má conformação perineal; a contratilidade uterina reduzida; a incapacidade de relaxamento cervical e útero pendular.^{80,81,83} Está

descrito que éguas mais velhas e múltíparas, apresentam mais frequentemente estes fatores, sendo mais suscetíveis do que éguas mais novas.⁸¹

No presente estudo, a idade média das éguas que desenvolveram endometrite foi de 12 anos, estando em discordância com os resultados obtidos noutros estudos onde se verificou que a idade de éguas suscetíveis foi de 16 anos.⁸² Outro estudo, demonstrou que determinadas condições predisponentes como a falha no relaxamento cervical, é encontrada em éguas independentemente da idade.⁸⁴

Está descrito a administração preventiva de ocitocina em éguas suscetíveis 4 a 6 horas após a IA, para auxiliar na expulsão do líquido intrauterino. Após a IA, deve ser realizada uma avaliação ecográfica, no caso de ser detetado líquido intrauterino, deve ser avaliado a quantidade de líquido para decidir a terapêutica mais adequada. Entre 1 a 2 cm de líquido deve ser administrado ocitocina. Quando a quantidade de líquido é superior a 2 cm, recomenda-se a lavagem com fluidos isotónicos (nomeadamente LR) antes da administração de ocitocina.¹¹⁴

Éguas com histórico de endometrite crónica, se possível deve ser feita apenas uma IA por estro, devendo receber uma infusão de antibióticos ou lavagem com fluidos isotónicos após a inseminação. No caso de serem feitas mais inseminações por estro, as lavagens devem ser realizadas após cada IA. Se a égua tiver predisposição para o desenvolvimento de infeção uterina pode ser adicionado antibióticos ao LR. Após a ovulação, existe um período de segurança de 2 dias, onde podem ser realizadas as lavagens uterinas, após esse período existe o perigo de interferir com o desenvolvimento do embrião.¹¹⁴

4.9. Efeito da consanguinidade

No presente estudo, a consanguinidade foi um fator com influência estatística na fertilidade dos garanhões ao ciclo ($p=0,003$) tendo sido registada um queda na fertilidade de 11% quando os valores de consanguinidade ultrapassam os 10% nos garanhões.

Foi estudado também o seu impacto nas éguas, tendo sido verificado que o mesmo não afetou a fertilidade das éguas ($p=0,111$), estando de acordo com o descrito onde se sugere que o aumento da endogamia, tem principal impacto na fertilidade masculina,

devido à maior frequência de mutações na linhagem germinativa masculina, levando à redução da qualidade do sémen, sendo que o impacto no mesmo não foi estudado no presente estudo.^{87,101}

A endogamia pode ser reduzida pela introdução de indivíduos geneticamente diferentes, sobretudo garanhões e pela escolha de indivíduos com base no seu desempenho reprodutivo como acontece com outras espécies, como por exemplo os touros.^{86,87,101}

4.10. Efeito do garanhão

No presente estudo, o garanhão foi um fator com influência estatisticamente significativa na avaliação da fertilidade ao ciclo ($p < 0,001$) no entanto, não teve efeito significativo quando avaliado para a fertilidade geral da época ($p = 0,09$).

Através destes resultados conseguimos constatar que a fertilidade varia com individualidade do garanhão escolhido, havendo animais que apresentam fertilidade de 100% e outros de 0%, estando de acordo com os estudos onde se observou uma grande variabilidade individual na fertilidade ao ciclo dos garanhões, tendo uma variação de 17,7% a 73,0% no estudo realizado na Noruega e de 37% a 90% no estudo realizado no Reino Unido.^{54,55} Estas percentagens aumentaram sempre quando avaliadas para a fertilidade geral da época, sendo que o mesmo se verifica no presente estudo para a grande maioria dos garanhões.^{54,55}

4.11. Efeito do sémen

No presente estudo, o tipo de sémen influenciou significativamente a fertilidade por ciclo ($p = 0,007$), no entanto não teve influência quando avaliado para a fertilidade geral da época ($p = 0,296$), estando de acordo com verificado em diversos estudos onde o tipo de sémen não influenciou a fertilidade quando todas as tentativas de obter uma gestação durante a época foram contabilizadas.^{76,92}

Neste estudo constatou-se taxas de fertilidade superiores e iguais quando utilizado sémen fresco e refrigerado (53%) e valores inferiores de fertilidade quando utilizado o sémen congelado (39%), contrariando os resultados obtidos noutros estudos onde se verificou taxas de fertilidade superiores com a utilização de sémen fresco.^{54,58,76,89} Em relação ao sémen congelado os resultados do presente estudo vão de encontro ao obtido noutros estudos, onde se atribuiu ao sémen congelado a taxa de fertilidade mais baixa, comparativamente com o sémen refrigerado.⁹² No entanto, contraria os resultados doutro estudo onde as taxas de fertilidade do sémen refrigerado e congelado foram semelhantes.⁷⁶ Os resultados no presente estudo, encontram-se dentro dos valores que foram descritos na literatura para a fertilidade com sémen congelado (dentro de 32% a 73% por ciclo).^{51,91}

A avaliação da qualidade do sémen fresco e refrigerado é feito praticamente através das mesmas técnicas. A qualidade do sémen fresco tende a representar a qualidade inerente ao sémen do garanhão, enquanto o sémen refrigerado reflete também fatores que afetam a manutenção da qualidade do sémen ou problemas inerentes à longevidade dos spz.¹¹⁵

O facto de no presente estudo a fertilidade do sémen refrigerado se ter igualado à fertilidade do sémen fresco, dá indícios que os principais problemas encontrados num programa com sémen refrigerado, nomeadamente problemas associados ao garanhão, ao maneiio do sémen no laboratório, ao transporte e ao médico veterinário, que são responsáveis pela redução comum da fertilidade do sémen refrigerado quando comparado com a IA com sémen fresco, no presente estudo foram realizados de forma a manter e a potenciar ao máximo a qualidade do sémen, permitindo atingir valores equiparáveis aos do sémen fresco.¹¹⁶

4.12. Efeito da motilidade do sémen

No presente estudo, o valor da motilidade do sémen antes ($p=0,511$) e depois ($p=0,131$) da diluição não teve efeito estatisticamente significativo na fertilidade avaliada ao ciclo. O que nos indica que no presente estudo não houve relação entre o valor da motilidade do sémen e a obtenção de mais ou menos fertilidade, contrariando os resultados obtidos num estudo onde se verificou que sémen com maior motilidade estava associada a taxas de fertilidade superiores.⁸⁹

Por outro lado, os resultados do presente estudo estão de acordo com os obtidos por outros autores onde não se conseguiu estabelecer uma relação entre a motilidade e a taxa de gestação ao ciclo. No entanto, essa relação foi estabelecida para a fertilidade avaliada à época sendo que, a taxa de gestação por época apesar de ser usada historicamente para descrever a fertilidade do garanhão, não é a medida mais sensível de fertilidade, porque não considera o número de ciclos em que a égua foi inseminada até diagnóstico de gestação.⁹⁰ Neste mesmo estudo, os autores conseguiram estabelecer uma relação entre a motilidade e a fertilidade quando a análise foi realizada para as taxas de gestação no cio do poldro, podendo ser uma hipótese para avaliação eficaz da fertilidade do garanhão.⁹⁰

Constatou-se ainda, que dos parâmetros de avaliação do sémen aqueles que mais se relacionaram com a fertilidade do garanhão foram a percentagem de spz móveis totais (motilidade total) e a percentagem de spz morfológicamente normais. Destacando a importância de avaliar em conjunto tanto a motilidade como a morfologia para determinar e avaliar a fertilidade de garanhões reprodutores.⁹⁰

5. Conclusão

Os fatores que afetam um programa de IA, são diversos e cada um apresenta um impacto diferente a nível reprodutivo, que se traduz em resultados diferentes.

Neste trabalho, verificou-se que os diferentes fatores que afetaram a fertilidade da equada PSL tiveram diferentes origens, sendo imprescindível que sejam avaliados isoladamente e em conjunto, de forma a serem implementadas medidas corretivas que visam melhorar a rentabilidade geral do programa.

Na avaliação de um programa de IA é importante ter em conta tanto a eficiência como a eficácia do programa.

A eficácia é avaliada por época reprodutiva, sendo a avaliação que mais expressa o rendimento económico direto, visto que se traduz na produção ou não do produto final, que neste caso é o poldro saudável. Esta medida contabiliza todas as tentativas que foram executadas ao longo da época reprodutiva para obter uma gestação, sendo por isso uma métrica que reflete menos a fertilidade dos animais e mais o trabalho do médico

veterinário, gestão do programa, manejo dos animais e tratamento de animais subférteis. No presente estudo, a idade da égua foi o fator que mais influenciou a produção de um poldro saudável independentemente dos esforços e do trabalho aplicado durante toda a época reprodutiva, sendo que correu uma queda de 20% de fertilidade quando os animais tinham mais de 15 anos.

A eficiência é avaliada por ciclo éstrico, reflete a verdadeira fertilidade dos animais, pois contabiliza o número de ciclos seguidos e inseminações necessárias até se obter um diagnóstico positivo de gestação. É cada vez mais importante, pois reflete a capacidade do programa de cumprir o objetivo de um poldro/égua/época, aumentando assim o valor comercial do poldro, tendo como vantagem ainda a redução de custos devido à diminuição do número de intervenções e manuseamento necessário e ainda melhorando pela mesma razão a qualidade de vida do animal

No presente estudo, a eficiência foi superior, quando a ovulação foi dupla (100%) e ocorreu do lado direito (54%) comparativamente com o lado esquerdo; Quando animais não apresentaram endometrite (53%); quando o garanhão utilizado tinha uma taxa de consanguinidade inferior a 10 % (56%), quando as IA's foram realizadas com sémen de garanhões individualmente mais férteis e quando foi usado sémen fresco ou refrigerado (53%).

Por último, dois dos fatores avaliados mostraram influenciar tanto a eficiência como a eficácia do programa, sendo eles o mês da IA e o tipo de cio em que esta foi realizada. O mês em que a eficiência máxima foi atingida foi março (57%), sendo o mês de janeiro (100%) onde se registou a máxima eficácia. A utilização do cio do poldro resultou numa melhoria tanto na eficiência como na eficácia do programa, refletindo a importância dos fatores relacionados como o manejo.

Este estudo reforça a importância de avaliar as diversas fontes de fatores que podem influenciar o programa de IA, visto que, tanto fatores com origem nas éguas, como no manejo, como no garanhão se demonstram determinantes para o sucesso do mesmo. Tornando-se imprescindível uma abordagem multimodal de forma a atingir a máxima rentabilidade.

Algumas limitações deste estudo prendem-se na forma como os dados foram obtidos, sendo que todos os registos são feitos de forma manual, o que pode levar a uma maior taxa de erro e possível falta de dados. Outro foi a forma como as éguas obtiveram o diagnóstico de endometrite, neste estudo esta foi baseada na presença de fluido intrauterino 24 horas após IA sendo que, para que o diagnóstico seja confirmado seria necessário realizar uma citologia e cultura microbiana endometrial.

Para futuros estudos poderá haver interesse adicionar na consanguinidade outros parâmetros de avaliação do sêmen para se averiguar com maior profundidade o impacto que este pode ter. Visto a fertilidade ser afetada por múltiplos de fatores, existem muitos que poderão ser adicionados em futuros estudos com condição corporal das éguas, a temperatura ambiental, idade dos garanhões, etc.

BIBLIOGRAFIA

1. Davies-Morel, M. (2003). Chapter 20- Artificial Insemination. *In Equine reproductive physiology, breeding and stud management second*, ISBN 0 85199 643 4 pp. 295-309.
2. Poggi, J.C.G, Ambrojo, K.S (2023). History oh Horses and the Biotechnologies Applied to its Reproduction. In *Equine Science- Applications and Implications of New Technologies*, pp.1-16.
3. Love.C.C.(2011) Chapter 146- Historical information. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1429–34.
4. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011). Chapter 2- Reproductive Physiology of the Nonpregnant Mare. *In Manual of Equine Reproduction Third*, ISBN: 978-0-323-06482-8 pp. 10–18.
5. Davies-Morel, M. (2003). Chapter 3- Endocrine Control of Reproduction in the Mare. *In Equine reproductive physiology, breeding and stud management second*, ISBN 0 85199 643 4 pp. 28-39.
6. McCue. M. P, Scoggin.F.C and Lindholm.G. R. A.(2011) Chapter 179- Estrus. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1716–27.
7. Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A. (2018). Ciclo reprodutivo da égua. *Em Reprodução em equinos- Manual Prático*, ISBN: 978-989-8550-75-0 pp.52-59.
8. Sharp.C.D. (2011) Chapter 178- Vernal transition into the Breeding Season. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1704–15.
9. King, S.S. (2011) Chapter 181- Autumnal Transition Out oh the Breeding Season. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1733–53.
10. Nagy, P., Guillaume, D., Daels, P.(2000) Seasonality in mares. *In Animal reproduction science*, 245-262.
11. Fredman, L. J., Garcia, M. C., & Ginther, O. J. (1979) Influence of Photoperiod and Ovaries on Seasonal Reproductive Activity in Mares. *In Biology of reproduction*.

12. Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A. (2018). Exame reprodutivo da égua. *Em Reprodução em equinos- Manual Prático*, ISBN: 978-989-8550-75-0 pp.59-74.
13. Troedsson, H.T.M., Ricketts, S. (2007) Section II- Female Reproductive Problems: Diagnosis and Management – Chapter 8- Fertility Expectations and Management for Optimal Fertility, *In Current Therapy in Equine Reproduction*, ISBN 13: 978-0-7216-0252-3 pp.53-69.
14. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011). Chapter 4 – Breeding Soundness Examination of the Mare. *In Manual of Equine Reproduction Third*, ISBN: 978-0-323-06482-8 pp. 39–53.
15. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011). Chapter 1 - Reproductive Anatomy of the Mare. *In Manual of Equine Reproduction Third*, ISBN: 978-0-323-06482-8 pp. 1–9.
16. Dascanio J.J. (2011) Chapter 164- External Reproductive Anatomy. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1577–81.
17. Pascoe, R.R. (2007) Section II- Female Reproductive Problems: Diagnosis and Management. Chapter 23- Vulvar Conformation. *In Current Therapy in Equine Reproduction*, ISBN 13: 978-0-7216-0252-3 pp.140-145.
18. Davies-Morel, M. (2003). Chapter 1- The Reproductive anatomy of the Mare. *In Equine reproductive physiology, breeding and stud management second*, ISBN 0 85199 643 4 pp. 1-15.
19. Zent, W.W., Steiner, V.J. (2011) Chapter 201- Vaginal Examination. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1900–03.
20. Kainer A.R. (2011) Chapter 165 - Internal Reproductive Anatomy. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1582–97.
21. McCue C.M.P, Scogging.F.C, Lindholm.R.G.A (2011) Chapter 179- Estrus. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1716-1727
22. Davies-Morel, M. (2003). Chapter 13-Mating Management. *In Equine reproductive physiology, breeding and stud management second*, ISBN 0 85199 643 4 pp. 147-168.

23. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011).) Chapter 5 – Transrectal Ultrasonography in Broodmare Praticce. *In Manual of Equine Reproduction Third*, ISBN: 978-0-323-06482-8 pp.54 –72.
24. Conboy H.S. (2011) Chapter 117 – Management of Stallions in Artificial Insemination. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1198–1207.
25. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011). Chapter 12 – Semen Collection and Artificial Insemination with Fresh Semen. *In Manual of Equine Reproduction Third*, ISBN: 978-0-323-06482-8 pp. 160–175.
26. Bettencourt, E.M.V., Antunes, L., Gonçalves, A.R., Branco, S., Rocha, A. (2018). Exame reprodutivo do garanhão. *Em Reprodução em equinos- Manual Prático*, ISBN: 978-989-8550-75-0 pp.14-46.
27. Davies-Morel, M. (2003) Chapter 20- Artificial Insemination. *In Equine reproductive physiology, breeding and stud management second*, ISBN 0 85199 643 4 pp. 295-309.
28. Brinsko, P.S. (2011) Chapter 123 – Semen Collection Techniques and Insemination Procedures. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1268–1277.
29. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011). Chapter 13 –Examination of Stallion for Breeding Soundness. *In Manual of Equine Reproduction Third*, ISBN: 978-0-323-06482-8 pp. 176–206.
30. Baumber-Skaife, J. (2011) Chapter 124- Evaluation of Semen. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1278–1291.
31. Samper, C.J., Psychock, F.J., Mckinnon, O.A. (2007) Section V-Semen Collection and Evaluation. Chapter 40- Evaluation of Raw Semen. *In Current Therapy in Equine Reproduction*, ISBN 13: 978-0-7216-0252-3 pp.253-257.
32. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011). Chapter 14 – Semen Preservation. *In Manual of Equine Reproduction Third*, ISBN: 978-0-323-06482-8 pp. 207–227.

33. Hodder, D.J.A., Liu, K.M.I. (2011) Chapter 125- Spermatozoal Motility. In *Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1292–1296.
34. Hernández-Avilés, C., Love, C. (2021). Cool-stored and frozen-thawed stallion semen: thoughts on collection, evaluation, processing, insemination, and fertility. *In Clinical Theriogenology*, 13, 280.
35. Rao Veeramachaneni, D.N. (2011) Chapter 126- Spermatozoal Morphology. In *Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1297–1307.
36. Sieme, H., Katila, T., & Klug, E. (2004). Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. In *Theriogenology*, 61, 769–784.
37. Graham, K.J. (2011) Chapter 127- Principles of Cooled Semen. In *Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1308–1315.
38. Sieme, H. (2011) Chapter 316-Freezing Semen. In *Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 2972–2982.
39. Graham, K.J. (2011) Chapter 314- Principles of Cryopreservation. In *Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 2959–2963.
40. Davies-Morel, M. (2003). Chapter 4- Endocrine Control of Reproduction in the Stallion. *In Equine reproductive physiology, breeding and stud management second*, ISBN 0 85199 643 4 pp. 40-46.
41. Amann, P.R (2011) Chapter 96 – Physiology and Endocrinology. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 881-908
42. Shawki, G., Barakat, T. M., Samy, A. M., AL-Mejren, A. A., & Mesalam, A. (2021). Effects of age and season on semen characteristics in Arabian stallions under subtropical conditions of Kuwait. *In Slovenian Veterinary Research*.
43. Waheed, M. M., Ghoneim, I. M., & Abdou, M. S. S. (2015). Morphometric Characteristics of Spermatozoa in the Arabian Horse With Regard to Season, Age, Sperm Concentration, and Fertility. *In Journal of Equine Veterinary Science* 35.
44. Crespo, F., Wilson, R., Díaz-Jimenez, M., Consuegra, C., Dorado, J., García Barrado, B., Gosalvez, J., Smit, R. L., Hidalgo, M., & Johnston, S. (2020). Effect of season on individual stallion semen characteristics. *In Animal Reproduction Science* 22.

45. Gamboa, S., Rodrigues, A. S., Henriques, L., Batista, C., & Ramalho-Santos, J. (2010). Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *In Theriogenology* 73.
46. Kareskoski, M., Heli, V., Virtala, A.-M. e Katila, T.(2019) "Analysis of factors affecting the pregnancy rate of mares after inseminations with cooled transported stallion semen." *In Theriogenology*, vol. 127, pp. 7-14.
47. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011).) Chapter 5 – Transrectal Ultrasonography in Broodmare Practice. *In Manual of Equine Reproduction Third*, ISBN: 978-0-323-06482-8 pp.54 –72.
48. Pycock, F.J. (2011) Chapter 203 – Ultrasonography *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1915–21.
49. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011). Chapter 3- Manipulation of Estrus in the Mare. *In Manual of Equine Reproduction Third*, ISBN: 978-0-323-06482-8 pp. 19–38.
50. Bosh, K. A., Powell, D., Shelton, B., & Zent, W. (2009). Reproductive performance measures among Thoroughbred mares in central Kentucky, during the 2004 mating season. *In Equine Veterinary Journal*, 41(9), 883-888.
51. Nath, L. C. (2011) Chapter 293- Reproductive efficiency. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 2779–2789.
52. Katila, T., Reilas, T., Nivola, K., Peltonen, T., & Virtala, A.-M. (2010). A 15-year survey of reproductive efficiency of Standardbred and Finnhorse trotters in Finland - descriptive results. *In Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 40.
53. Kareskoski, M., Venhoranta, H., Virtala, A.-M., & Katila, T. (2019). Analysis of factors affecting the pregnancy rate of mares after inseminations with cooled transported stallion semen. *In Theriogenology*, 127, 7-14.
54. Haadem, C. S., Nodtvedt, A., Farstad, W., Thomassen, R.(2015) A retrospective cohort study on fertility in the Norwegian Coldblooded trotter after artificial insemination with cooled, shipped versus fresh extended semen. *In Acta Veterinaria Scandinavica* 57:77.

55. Morris, L.H.A & Allen, W.R. (2002) Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *In Equine veterinary journal*, 34(1) 51-60.
56. Pycock, F.J (2006) How to Maximize the Chances of Breeding Successfully From the Older Maiden Mare. *In AAEP Proceedings*, vol.52.
57. Ishak,M.G. (2010) Effect of Different Seasons of the Year on the Pregnancy Rate in Mares in Iraq. *In Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, vol. 41, n. 6, pp. 125-129.
58. Langlois, B. e Blouin, C. (2004) Statisitcal analysis of some factores affecting the number pf horse births in France. *In Reprod.Nutre.Dev.* 44, pp.583-595.
59. Nath.C.L.(2011) Chapter 293- Reproductive Efficiency. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 2779–89.
60. Valle, G. R., Filho, J. M. S., Oliveira, H. N., Palhares, M. S., Mello, M. A., & Goloubeff, B.(1999) Efeito da Idade sobre a Fertilidade de Éguas Inseminadas com Sêmen Diluído, Resfriado a 14°C e Transportado. *Em Revista Brasileira de -Zootecnia*, 28(5), 1031-1036.
61. Fitzgerald, B. P., & McManus, C. J.(2000) Photoperiodic Versus Metabolic Signals as Determinants of Seasonal Anestrus in the Mare. *In Biology of Reproduction*.
62. Carnevale, E.M. e Ginther ,O.J.(1995) "Defective Oocytes as a Cause of Subfertility in Old Mares." *In Biol Reprod Mono*, vol. 1,pp. 209-214.
63. Valle, G. R., Silva Filho, J. M., Oliveira, H. N., Palhares, M. S., Mello, M. A., & Goloubeff, B. (1999). Efeito da Idade sobre a Fertilidade de Éguas Inseminadas com Sêmen Diluído, Resfriado a 14°C e Transportado.
64. Camillo, F., Marmorini, P., Romagnoli, S., Vannozzi, I., & Bagliacca, M. (1997) Fertility at the first post partum estrous compared with fertility at the following estrous cycles in foaling mares and with fertility in nonfoaling mares. *In World Equine Veterinary Congress, Padova, Italy*.
65. Blanchard, T. L., Thompson, J. A., Love, C. C., Brinsko, S. P., Ramsey, J., O'Meara, A., & Varner, D. D. (2012) Influence of day of postpartum breeding on pregnancy rate, pregnancy loss rate, and foaling rate in Thoroughbred mares. *In Theriogenology*, 77, pp.1290-1296.

66. Blanchard, T.L., Macpherson L.M. (2011) Chapter 236 – Breeding Mares on Foal Heat. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 2294–2301.
67. Katila, T., Reilas, T. (2001) The post partum mare. *In Pferdeheilkunde Equine Medicine 17*, pp.623-626.
68. Souza, J. R. M. de, Gonçalves, P. B. D., Bertolin, K., Ferreira, R., Ribeiro, A. S. S., Ribeiro, D. B., Rechsteiner, S. M. da E. F., Araújo, R. R. de, Pimentel, C. A., & Pimentel, A. M. H. (2020). Age-Dependent Effect of Foal Heat Breeding on Pregnancy and Embryo Mortality Rates in Thoroughbred Mares. *In Journal of Equine Veterinary Science*, 90.
69. Tom, A.E. Stout, VetMB, PhD (2012) How to Decide When to Breed the Postpartum Mare. *In How to manage the subfertile mare*.
70. Ishii, M., Shimamura, T., Utsumi, A., Jitsukawa, T., Endo, M., Fukuda, T., & Yamanoi, T. (2001). Reproductive Performance and Factors that Decrease Pregnancy Rate in Heavy Draft Horses Bred at the Foal Heat. *In Journal of Equine Veterinary Science*, 21(3), pp.131-136.
71. Mahal, J. S., Honparkhe, M., Kumar, A., & Singh, P. (2020). Conception Rates Following Breeding at Foal Heat Versus Induced Heat in Postpartum Indigenous Mares. *In International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(4).
72. Vanderwall, D. K. (2008). Early Embryonic Loss in the Mare. *In Journal of Equine Veterinary Science*, 28(11).
73. Lemes, K. M., Silva, L. A., Alonso, M. A., Celeghini, E. C. C., Pugliesi, G., Carvalho, H. F., Affonso, F. J., Silva, D. F., Leite. T. G., e Arruda, R. P.(2017). "Follicular dynamics, ovarian vascularity and luteal development in mares with early or late postpartum ovulation. *In Theriogenology* ,96, pp.23-30.
74. Talluri, T. R., Singh, C., & Prakash, V. (2021). Pregnancy outcomes in Thoroughbred mares inseminated with fresh semen from either stallion or jack at foal heat or subsequent estrus. *In Indian Journal of Animal Sciences*, 91(2), pp.105–108.
75. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. (2011). Chapter 4- Breeding Soundness Examination

- of the Mare. *In Manual of Equine Reproduction Third*, ISBN: 978-0-323-06482-8 pp. 39–53.
76. Squires, E., Barbacini, S., Matthews, P., Byers, W., Schwenzer, K., Steiner, J., & Loomis, P. (2006). Retrospective study of factors affecting fertility of fresh, cooled and frozen semen. *In Equine Veterinary Education*, pp.124-127.
 77. Ginther, O.J. (1983) Effect of reproductive status on twinning and on side of ovulation and embryo attachment in mares. *In Theriogenology*, volume 20, pp.383-395.
 78. Davies Morel, M.C.G., & O’Sullivan, J.A.M. (2001) Ovulation rate and distribution in the Thoroughbred mare, as determined by ultrasonic scanning: the effect of age. *In Animal Reproduction Science*, 66, 59–70.
 79. Rezagholizadeh, A., Gharagozlou, F., Akbarinejad, V., & Youssefi, R. (2015). Left-Sided Ovulation Favors More Male Foals Than Right-Sided Ovulation in Thoroughbred Mares. *In Journal of Equine Veterinary Science*, 35, 31–35.
 80. Rezagholizadeh, A., Gharagozlou, F., Akbarinejad, V., & Youssefi, R. (2015). Left-Sided Ovulation Favors More Male Foals Than Right-Sided Ovulation in Thoroughbred Mares. *In Journal of Equine Veterinary Science*, 35, 31–35.
 81. Pasolini, M.P., Prete, C., Fabbri, S., Auletta, L. (2016) Chapter 15- Endometritis and Infertility in the Mare - The challenge in Equine Breeding Industry- A Review. *In Genital Infections and Infertility*, ISBN 978-953-51-2487-0 pp.285-328.
 82. Maischberger, E., Irwin, J.A., Carrington, S.D. and Duggan, V.E. (2008) Equine post-breeding endometritis: A review. *In Irish Veterinary Journal Volume 61 Number 3*.
 83. Canisso, I.F., Segabinazzi, L.G.T.M., Fedorka, C.E. (2020) Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares—A Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *In Internacional Journal Of Molecular Sciences*.
 84. Katila, T., Ferreira-Dias, G. (2022) Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares, *In Animals jornal*, 12, 779.

85. Troedsson, H.T.M. (2011) Chapter 271 -Endometritis. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 2608–19.
86. Carolino, N., Vicente, A. (2022). *Consanguinidade no Cavalo Puro-Sangue Lusitano (PSL)*. Repositório do Instituto Politécnico de Santarém. [URL: https://repositorio.ipsantarem.pt/bitstream/10400.15/4092/1/VicenteCar_APLS_Consanguinidade_no_Cavalo_PSLusitano_2022.pdf]
87. Laseca, N., Molina, A., Ramón, M., Valera, M., Azcona, F., Encina, A., & Demyda-Peyrás, S. (2022). Fine-Scale Analysis of Runs of Homozygosity Islands Affecting Fertility in Mares. *In frontiers in veterinary science*.
88. Lawson, J. M., Shilton, C. A., Lindsay-McGee, V., Psifidi, A., Wathes, D. C., Raudsepp, T., & de Mestre, A. M. (2024). Does inbreeding contribute to pregnancy loss in Thoroughbred horses? *In Equine Veterinary Journal*.
89. Jasko, D.J., Moran, D.M., Farlin, M.E., Squires, E.L., Amann, R.P., Pickett, B.W. (1992) Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. *In: Proceedings of the 38th Annual Convention of American Association on Equine Practice*. pp. 649–660
90. Love, C.C. (2011) Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *In Theriogenology* 76, pp. 547-557.
91. Barbacini, S. (2011) Chapter 318 –Breeding with Frozen Semen. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1323–39.
92. Loomis, P.R. (2001). The equine frozen semen industry. *In Animal Reproduction Science*, 68, 191–200.
93. Metcalf, E.S. (1998). Pregnancy rates with cooled equine semen received in private practice. *In Proceedings of the 44th Annual Convention of American Association on Equine Practice*, pp. 16–18.
94. Gonçalves, A.R., Telo da Gama, L., Antunes, L., Guimarães, H., Bliebernicht, M., Duarte, J.C., Cosinha, C., Rego, B.D., Ferro da Costa, P., Guimarães, T., Rocha, A., Guimarães, T., Rocha, A., & Bettencour, T, E. (2023)- Impact of inbreeding and genetic parameter estimates for seminal traits in Lusitano horses- *Theriogenology*
95. Turner, M. O. R. (2007) Section IV- Male Reproductive Problems: Diagnosis and Management. Chapter 30- Testicular Abnormalities. *In Current Therapy in Equine Reproduction*, ISBN 13: 978-0-7216-0252-3 pp.195-204.

96. Turner, M. R. (2019) Declining testicular function in the aging stallion: Management options and future therapies. *In Animal Reproduction Science* 207.
97. Gaughan, M.E., Harreveld, D.P. (2007) Section IV- Male Reproductive Problems: Diagnosis and Management. Chapter 35- Penile Infections. *In Current Therapy in Equine Reproduction*, ISBN 13: 978-0-7216-0252-3 pp.222-226.
98. Barrandeguy, M., Thiry, E.(2012) Equine coital exanthema and its potential economic implications for the equine industry. *In The Veterinary Journal* 191, 35-40.
99. Barrandeguy, M., Perkins, J., Mac Donough, J., Vissani, A., Olguin, C., & Thiry, E. (2010). Occurrence of Equine Coital Exanthema in Mares from an Embryo Transfer Center. *In Journal of Equine Veterinay Science*, 30(3).
100. Conboy, S.H. (2007) Section IV- Male Reproductive Problems: Diagnosis and Management. Chapter 37- Significance of bacteria Affecting the Stallion's Reproductive System. *In Current Therapy in Equine Reproduction*, ISBN 13: 978-0-7216-0252-3 pp. 231-236.
101. Dini, P., Bartels, T., Revah, I., Claes, A. N., Stout, T. A. E., & Daels, P. (2020). A retrospective study on semen quality parameters from four different Dutch horse breeds with different levels of inbreeding. *In Theriogenology* 157, 18-23.
102. Guimarães, T., Carvalheira, J. e Rocha, A. (2012) Conception rate, uterine infection and embryo quality after artificial insemination and natural breeding with a stallion carrier of *Pseudomonas aeruginosa*: a case report. *In Acta Veterinaria Scandinavica*, 54.
103. Samper, C. J., Tibary, A. (2006) Disease transmission in horses. *In Theriogenology* 66, 551-559.
104. Turner, C.E., Walbornn, S.R., Blanchard, T.L., Varner, D.D., Brinsko, S.P., LaCaze, K.A., Teague, S.R., & Love, C.C. (2016). The effect of two levels of hemospermia on stallion fertility. *In Teriogenology* 86, pp.1399-1402.
105. Madill S. (2011) Chapter 296- Management of the Geriatric Mare. *In Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 2803–19.
106. Tannus, R.J. e Thun, R. (1995) Influence of Endometrial Cysts on Conception Rate of Mares. *In jornal of veterinary medicine*, series A.

107. Malschitzky, E., Schilela, A., Mattos, A. L. G., Garbade, P., Gregory, R. M., & Mattos, R. C. (2003). Intrauterine fluid accumulation during foal heat increases embryonic death. In *Pferdeheilkunde*, 19.
108. Fradinho, M.J., Correia, M.J., Grácio, V., Bliebernicht, M., Farrim, A., Mateus, L., Martin-Rosset, W., Bessa, R.J.B., Caldeira, R.M., Ferreira-Dias, G. (2014). Effects of body condition and leptin on the reproductive performance of Lusitano mares on extensive systems. In *Theriogenology*, 81, pp.1214–1222.
109. Squires, E.L., & McCue, P.M. (2007). Superovulation in mares. In *Animal Reproduction Science*, 99, 1–8.
110. Mckinnon, A.O, Squires, E.L. (2007) Section VI-Assisted Reproductive Techniques. Chapter 51- Embryo Transfer and Related Technologies. In *Current Therapy in Equine Reproduction*, ISBN 13: 978-0-7216-0252-3 pp. 319-334.
111. Roser, J.F., & Meyers-Brown, G. (2019). Enhancing Fertility in Mares: Recombinant Equine Gonadotropins. In *Journal of Equine Veterinary Science*, 76, 6-13.
112. Ginther, O.J., Silva, P.N., Gomez-Leon', V.E., Domingues, R.R., & Inskip, E.K. (2021) "Side of ovulation at each end of two- and three-wave interovulatory intervals and before and after pregnancy in cattle." In *Animal Reproduction Science*, volume 229.
113. Ginther, O.J., & Danguubiyam, S.V. (2018). Factors affecting side of ovulation in heifers and mares—A comparative study. In *Animal Reproduction Science*, 199, 72-78.
114. Pycock, J.F. (2007) Section II-Female Reproductive Problems: Diagnosis and Managemnet. Chapter 14-Therapy for Mares with Uterine Fluid. In *Current Therapy in Equine Reproduction*, ISBN 13: 978-0-7216-0252-3 pp. 93-104.
115. Love, C.C., Noble, J.K., Standridge, S.A., Bearden, C.T., Blanchard, T.L., Varner, D.D., & Cavinder, C.A. (2015). The relationship between sperm quality in cool-shipped semen and embryo recovery rate in horses. In *Veterinary Journal*, 84(9), pp.1587-1593
116. Robinson, S.J. (2011) Chapter 129 – Experiences with a Large-Scale Cooled- Transported Semen Program. In *Equine Reproduction Second*, ISBN 978-0-8138-1971-6 pp. 1323–39.

117. <https://www.ipma.pt/pt/oclima/observatorio.secas/pdsi/apresentacao/evoluistorica/>
118. Knottenbelt, D.C, Malalana, F.(2015) Saunders Equine Formulary 2^o Edition. Part 3- Index of drugs used in equine medicine. Section 6- hormones/steroides and non-steroidal anti-inflammatory drugs. In *Elsevier*, pp-121-160. ISBN 978-0-7020-5109-8

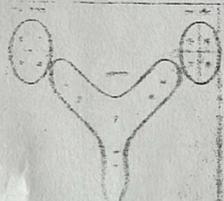
VI. Anexos

Anexo 1- Folha de registo das éguas


COUDELARIA DE ALTER: ÉPOCA REPRODUTIVA 2021


Nome:		
Data nascimento		
ID		
Marca fogo		
História reprodutiva		
História reprodutiva do ano anterior		
Exames anteriores:		
Citologia	Data:	
Cultura	Data	
TSA:	Data:	
Biopsia	Data:	

Ficha de exame ginecológico: S/N: Data



Data parto: _____

Tipo de parto: _____

Doenças pós parto: _____

Data primeira avaliação: _____

Garanhão pretendido: _____

Tipo de sêmen: _____

Data	Hora	Ovário esquerdo	Ovário direito	Edema útero 0-3	Administrações	Observações

Figura 28- Folha de registo das éguas após controlo reprodutivo (Autoria própria).

Anexo 2- Descrição do estágio curricular

O estágio curricular foi dividido em duas partes, a primeira parte do estágio curricular decorreu na Unidade Clínica, Coudelaria de Alter, sob a orientação da Professora Doutora Elisa Bettencourt e da Professora Doutora Susana Monteiro. Este estágio teve início no dia 3 de janeiro a 31 de março de 2023, tendo a duração de 3 meses. Durante este período, foi acompanhado o trabalho de 3 médicos veterinários, Doutora Helena Guimarães, Doutora Madalena Pinto Cardoso e Doutor João Cascais, na prática das atividades diárias na área de reprodução equina, clínica geral e ortopedia no dia a dia da Coudelaria, sendo que os estagiários faziam fins-de-semana alternados.

A segunda parte do estágio curricular decorreu no Centro de Colheita e Congelação de Sêmen Equino, Lusopecus, sob a orientação da Professora Doutora Elisa Bettencourt e da Doutora Cristina Rebelo Cosinha, teve início no dia 3 de abril a 30 de maio de 2023, tendo a duração de 2 meses. Durante este período foi acompanhado o trabalho de 3 médicos veterinários, Doutora Cristina Rebelo Cosinha, Doutora Margarida Resende Guedes e Doutor José Carlos Duarte, na prática das atividades diárias.

Ambas as partes do estágio, incidiram essencialmente na área de reprodução equina e neonatologia, sendo possível dividir as atividades realizadas e acompanhadas em três grupos principais: éguas, garanhões e poldros.

Na secção das éguas as principais atividades realizadas e acompanhadas foram a palpação transretal do trato reprodutivo da égua, o controlo reprodutivo ecográfico, indução da ovulação, indução da luteólise, inseminação artificial com sêmen fresco, refrigerado e congelado, diagnóstico de gestação, monitorização ecográfica da gestação, lavagens uterinas, tratamentos uterinos, recolhas e transferências de embriões, biópsias uterinas, citologias uterinas, zaragatoas uterinas, avaliação da condição corporal, colheita de sangue e de colostro para avaliação dos níveis de anticorpos. Foram acompanhados também casos clínicos tais como, casos de endometrite, feridas por traumatismo com ligação ao canal vaginal.

Na secção dos garanhões, as principais atividades realizadas e acompanhadas foram o exame do trato reprodutivo do garanhão através da palpação, medição com fita métrica e ecografia testicular e das glândulas acessórias, preparação e limpeza do pénis

para colheita de sémen, preparação da vagina artificial, colheita de sémen em manequins de monta, espermogramas, processamento de doses de sémen fresco e refrigerado e congelação de sémen. Foram acompanhados também casos clínicos tais como, ampolas obstruídas e castrações.

Por último na secção dos poldros, as principais atividades realizadas e acompanhadas foram o exame físico do poldro neonato, colheita de sangue para avaliação dos níveis de anticorpos, elaboração de resenhos, colocação de microship e avaliação da condição corporal. Foram acompanhados também casos clínicos tais como, hérnia umbilical, hérnia abdominal, atresia do ducto nasolacrimonial, deformidades flexurais, impactação do mecónio e diarreias neonatais.



Figura 29- A- Inseminação artificial com sémen fresco; B- Recolha de sémen recorrendo a vagina artificial e manequim; C- Alimentação de um poldro com leite de substituição. (Autoria própria).

Gráfico 1- Distribuição da casuística pelas áreas clínicas (n= 1328)

