



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS: ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE UMA DOSE REDUZIDA DE SÉMEN CONGELADO EM DIFERENTES LOCAIS DE DEPOSIÇÃO**

Joana Cabral da Gama de Alpoim Moreira

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Dr. José Manuel Cardoso de Sousa Prazeres

ORIENTADOR

Dr. José Manuel Cardoso de Sousa

Prazeres

CO-ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS: ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE UMA DOSE REDUZIDA DE SÉMEN CONGELADO EM DIFERENTES LOCAIS DE DEPOSIÇÃO**

Joana Cabral da Gama de Alpoim Moreira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Dr. José Manuel Cardoso de Sousa Prazeres

ORIENTADOR

Dr. José Manuel Cardoso de Sousa

Prazeres

CO-ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2010

LISBOA

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Dr. José Prazeres por me ter aceite o estágio na Clínica Veterinária de Santo Estevão e pela sua orientação. Quero também agradecer à Dra. Maria Antónia Nabais e à Dra. Susana Rodrigues pela sua ajuda.

Quero também agradecer de igual modo à Prof. Dra. Graça Ferreira Dias pela sua disponibilidade e amizade durante todos estes anos e especialmente na elaboração desta tese.

Por último agradeço também à minha família, marido e filhos pela a ajuda preciosa sem a qual não teria sido possível concluir este trabalho.

## RESUMO

### **Inseminação artificial em éguas: estudo da utilização de uma dose reduzida de sémen congelado em diferentes locais de deposição**

O tema foi escolhido devido à utilização cada vez maior de sémen congelado na clínica equina e da necessidade de se reduzir a quantidade de sémen utilizado devido ao seu custo e também por vezes pela sua escassez. De modo a maximizar a fertilidade dos cavalos que se reproduzem por inseminação artificial, o número total de espermatozóides com motilidade progressiva por dose deve ser  $300-500 \times 10^6$  para sémen fresco e o dobro para sémen que vai ser transportado (Samper, 2005). Embora não exista uma dose padrão para o sémen congelado, a fertilidade diminui quando o número total de espermatozóides com motilidade progressiva é inferior a  $250 \times 10^6$  por dose (Samper, 1999). Mais ainda, a inseminação de éguas na junção útero-tubárica é uma técnica que tem sido eficaz quando se reduz o número de espermatozóides usados por inseminação (Squires *et al*, 2000).

Assim sendo, o objectivo deste trabalho foi comparar as taxas de gestação em éguas inseminadas com uma redução da dose convencional de sémen congelado em locais diferentes de inseminação: corpo uterino vs corno uterino, usando o método guiado por via transrectal. Com sémen de seis ganhões diferentes foram inseminadas oito éguas, no corpo uterino (n=4) ou no corno uterino (n=4) escolhidas aleatoriamente e com uma dose de  $200 \times 10^6$  espermatozóides totais. A taxa de gestação para as éguas inseminadas no corpo uterino foi idêntica às inseminadas no corno uterino (3/4 vs 3/4; 75%) ( $p>0,05$ ). O número de inseminações necessário para obter uma gestação no grupo das éguas inseminadas no corno uterino (2,66/égua) foi semelhante ao do grupo das éguas inseminadas no corpo uterino (1/égua) ( $p>0,05$ ). Em média foram necessárias 1,83 inseminações para obter uma gestação.

Este estudo, embora com número muito reduzido de éguas, confirma o que outros autores já publicaram; que é possível obter taxas de gestação aceitáveis com sémen congelado quando se reduz a dose convencional de espermatozóides. Também se conclui que o local de deposição do sémen, corpo uterino ou ponta do corno uterino, usando a técnica guiada por via transrectal, parece não fazer diferença nas taxas de gestação quando se usa uma dose inseminante de  $200 \times 10^6$  espermatozóides totais, como confirmado por outros estudos.

**Palavras-chave:** sémen congelado, cavalo, inseminação artificial, corpo uterino, corno uterino

## ABSTRACT

### **Artificial insemination in mares: a comparative study using low dose frozen semen in different deposition sites**

The subject was chosen due to the growing use of frozen semen in the equine practice and the need for reducing sperm numbers due to its cost and sometimes lack of availability. In order to maximize fertility of horses bred by artificial insemination (AI), the total number of progressively motile sperm per dose should be  $300 - 500 \times 10^6$  for fresh semen and double for transported semen (Samper, 2005). Even though there is no standard dose for frozen semen, fertility decreases when the total number of progressively motile sperm after thawing is  $< 250 \times 10^6$  per dose (Samper, 1999). Furthermore, insemination at the uterotubal junction is a practical technique that can be used successfully when the number of spermatozoa used per insemination is decreased (Squires *et al.*, 2000).

Therefore, the objective of this study was to compare the pregnancy rates in mares inseminated with a reduction of the standard dose of frozen semen at different sites of insemination: uterine body *versus* tip of uterine horn; using the rectally guided method. Eight mares were inseminated with semen from six different stallions, in the uterine body (n=4) or in the uterine horn (n=4), randomly assigned and with an insemination dose of  $200 \times 10^6$  total sperm cells. Pregnancy rate for the mares inseminated in the uterine body was identical for those inseminated in the uterine horn (3/4 vs 3/4; 75%) ( $p>0,05$ ). The number of inseminations needed to obtain a pregnancy in the mares inseminated in the tip of the uterine horn (2,66/mare) was similar to the group of mares inseminated in the uterine body (1/mare) ( $p>0,05$ ). In average, 1.83 inseminations were needed to obtain a pregnancy.

This study, even though with a reduced number of mares, confirms what other have reported. It is possible to obtain acceptable pregnancy rates with frozen semen when the standard dose of sperm cells is reduced. It also concludes that the site of deposition of the inseminate, using the rectally guided technique, appears to make no difference in the pregnancy rates when using an insemination dose of  $200 \times 10^6$  total sperm, as confirmed by other studies.

**Keywords:** frozen semen, horse, artificial insemination, uterine body, uterine horn

## ÍNDICE

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular

### 2. Objectivos do trabalho

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Breve revisão anatómica

### 2. Fisiologia da reprodução

#### 2.1. Sazonalidade

#### 2.2. Manipulação do período de transição

##### 2.2.1. Luz artificial

##### 2.2.2. Fármacos

#### 2.3. Indução da ovulação em éguas cíclicas

#### 2.4. Sincronização do estro em éguas cíclicas

#### 2.5. Reprodução no cio do poldro

### 3. Inseminação Artificial

#### 3.1. Técnica de inseminação artificial

#### 3.2. Fenómenos fisiológicos

##### 3.2.1. Fertilização

##### 3.2.2. Resposta inflamatória ao sémen

#### 3.3. Factores que contribuem para o sucesso da inseminação

##### 3.3.1. Éguas candidatas

##### 3.3.2. Fertilidade do sémen

##### 3.3.3. Perícia do inseminador e previsão da ovulação

#### 3.4. Inseminação artificial com sémen fresco ou refrigerado

#### 3.5. Inseminação artificial com sémen congelado

##### 3.5.1. Transporte e armazenamento de sémen congelado

##### 3.5.2. Descongelação e inseminação

##### 3.5.3. Selecção de éguas para inseminação

##### 3.5.4. Local de inseminação e efeito do número de espermatozóides

##### 3.5.5. Momento e frequência da inseminação

## III. MATERIAIS E MÉTODOS

## IV. RESULTADOS

## V. DISCUSSÃO

## VI. CONCLUSÃO

## VII. BIBLIOGRAFIA

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Distribuição dos casos clínicos por sistemas do organismo

**Figura 2** – Influência do fotoperíodo no ciclo reprodutivo da égua

**Figura 3** – Inseminação artificial

**Figura 4** – Endometrite

**Figura 5** – Má conformação perineal

**Figura 6** – Contentor de azoto líquido

**Figura 7** – Endométrio tipo II

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Medicamentos e doses utilizadas no manejo das éguas na fase de transição

**Tabela 2** – Classificação do grau de endometrite segundo Kenney e Doig

**Tabela 3** – Relação da categoria das éguas, idade e local de inseminação com a taxa de gestação

**Tabela 4** – Inseminação no corpo uterino vs corno uterino

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL	corpo lúteo
DNA	ácido desoxirribonucleico
EUA	estados unidos da américa
EV	endovenoso(a)
FSH	hormona estimuladora dos folículos
GnRH	hormona libertadora de gonadotrofinas
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IA	inseminação artificial
IM	intramuscular
PGF2 $\alpha$	prostaglandina F2 $\alpha$
Kg	quilogramas
LH	hormona luteinizante
PMN	neutrófilos polimorfonucleares
PSI	puro sangue inglês
UI	unidades internacionais
UV	ultravioleta

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular

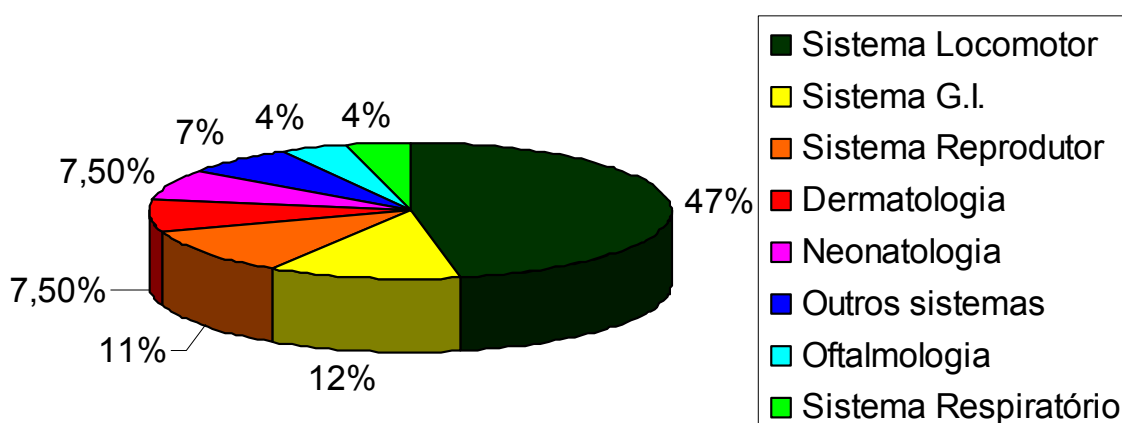
O estágio curricular decorreu na Clínica Veterinária de Santo Estevão, entre Março e Junho de 2010, sob a orientação do Dr. José Prazeres na área da medicina e cirurgia equina.

As actividades desenvolvidas compreenderam o seguimento de 323 casos clínicos, englobando os efectuados na clínica e os em regime ambulatorio.

Na figura 1 encontram-se representados os casos clínicos no que diz respeito aos diferentes sistemas do organismo. O sistema locomotor foi o mais bem representado com 151 casos (47%), em segundo lugar o sistema gastrointestinal com 39 casos (12%) e em terceiro lugar o sistema reprodutor com 35 casos (11%). A dermatologia e a neonatologia tiveram 24 casos cada (7,5%), os outros sistemas 23 casos (7%) e a oftalmologia e o sistema respiratório 13 casos cada (4%). Os outros sistemas incluíram a dentisteria, endocrinologia e a hematologia. Entre a totalidade dos casos clínicos, 297 (92%) envolveram apenas intervenções médicas e 26 (18%) necessitaram de intervenção cirúrgica.

Não estão incluídos nos casos clínicos as actividades de profilaxia como as vacinações e desparasitações, os resenhos e as colheitas de sangue e aplicações de microchip para identificação do genótipo.

Figura 1 – Distribuição dos casos clínicos por sistemas do organismo





Como médica veterinária pude ajudar os meus colegas em inúmeras intervenções mas foi na área da reprodução que concentrei os meus esforços e que me levou a desenvolver um estudo de minha autoria nesta mesma área.

## **2. Objectivos do trabalho**

O objectivo deste trabalho foi comparar a taxa de gestação após a redução da dose convencional de sémen congelado e também comparar as taxas de gestação quando se usam locais diferentes de inseminação: corpo uterino vs corno uterino, usando o método guiado por via transrectal.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Breve revisão anatômica

O diencéfalo é constituído por três regiões ou glândulas (hipotálamo, hipófise ou glândula pituitária e glândula pineal) que contribuem com sinais neuronais e endócrinos para o desenvolvimento e manutenção da função reprodutiva. O hipotálamo está localizado medialmente e é a região mais ventral do diencéfalo formando a parte mais inferior das paredes laterais do terceiro ventrículo (Dyce, Sack & Wensing, 1987). A hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) é produzida no hipotálamo. A hipófise está suspensa por baixo do hipotálamo pelo infundíbulo e assenta num recesso no pavimento do crânio. A hipófise é composta pelos lobos anterior, intermédio e posterior. O lobo anterior está associado à produção da hormona estimuladora dos folículos (FSH) e da hormona luteinizante (LH). A glândula pineal é uma estrutura pequena que se projecta dorsalmente do pedunculo cerebral atrás de uma invaginação do tecto do terceiro ventrículo e é responsável pela produção de melatonina. O movimento de sinais neurais e endócrinos entre o cérebro e os ovários constitui um meio de comunicação geralmente chamado de eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Bergfelt, 2000).

O aparelho reprodutor é constituído pelos ovários e genitalia tubulares, e tecidos vascular, nervoso e linfático associados e ligamentos suspensores. A maioria do aparelho reprodutor situa-se na cavidade abdominal e o restante fica dentro da cavidade pélvica. A pélvis óssea à volta da cavidade pélvica está rodeada pelas metades simétricas dos ossos da bacia (íleo, isquio e púbis), sacro e as últimas vértebras da cauda. A entrada interna para a cavidade pélvica representa a pélvis proximal, e a pélvis distal está geralmente demarcada pela posição da prega transversa que separa a vagina do vestíbulo. A cavidade pélvica distal pode ser mais pequena que a proximal, mas expande-se durante o parto à medida que os ligamentos sacrociáticos que rodeiam a pélvis distal começam a relaxar durante os últimos dias de gestação. Ambas as cavidades proximal e distal podem representar impedimentos fundamentais do parto (Ginther, 1992; McKinnon & Voss, 1993).

A porção cranial do aparelho reprodutor inclui os ovários, oviductos, útero, cérvix e vagina, e a porção caudal inclui a vulva, que é frequentemente subdividida para incluir o vestíbulo, os lábios vulvares e o clítoris.

As variações de forma, tamanho e localização do aparelho reprodutor da égua são influenciadas pela raça, época reprodutiva, idade, estado reprodutivo e condições patológicas. Contudo, as mudanças mais imediatas são influenciadas pelo nível da distensão e pela actividade do cólon, recto e bexiga urinária. Os ovários e o útero estão em contacto íntimo com as vísceras abdominais e por isso podem posicionar-se por cima das

vísceras, e o útero ficar com aspecto de T ou podem ficar suspensos entre as ansas intestinais e ficar com aspecto de Y quando vistos dorsalmente (Bergfelt, 2000).

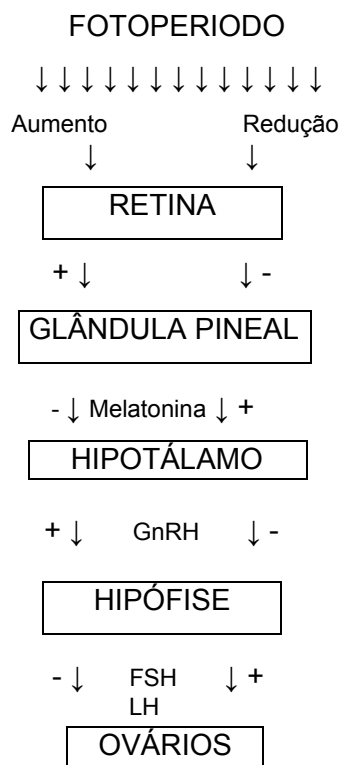
Os ovários da égua adulta são únicos entre as espécies domésticas porque são relativamente grandes e porque a medula ou zona vascular tem localização superficial, enquanto que o córtex ou zona cortical que contém os folículos se encontra no interior do ovário. Este arranjo estrutural dos tecidos é responsável pela forma de rins dos ovários, na qual o córtex tem um acesso limitado apenas pela região de depressão da porção livre ventral, a fossa da ovulação (Ginther, 1992).

## **2. Fisiologia da reprodução**

A égua é um animal poliéstrico sazonal, *i.e.*, durante a época reprodutiva a égua não gestante tem ciclos éstricos repetidos. O ciclo éstrico pode ser considerado como contendo uma fase folicular (estro) na qual a égua se encontra sexualmente receptiva ao garanhão, o aparelho genital está preparado para aceitar e transportar o sémen aos oviductos para fertilização e que envolve o processo da ovulação e uma fase lútea (diestro) na qual a égua não está receptiva ao garanhão e o aparelho genital está preparado para aceitar e desenvolver um embrião. O período de diestro termina com a regressão do corpo lúteo (CL) e a iniciação da seguinte fase folicular. A duração média do ciclo éstrico nas éguas durante a época de reprodução fisiológica é de vinte e um dias, sendo que o estro dura 4-7 destes dias. A duração do diestro permanece relativamente constante em 14-15 dias e não é afectada pela época. A duração do estro é mais variável (variando entre 2-12 dias), sendo tipicamente mais longo no início da época reprodutiva (Blanchard, Varner & Schumacher, 1998).

O padrão regular do ciclo éstrico baseia-se no delicado equilíbrio entre as hormonas produzidas pela glândula pineal, o hipotálamo, a hipófise e os ovários (Figura 2).

Figura 2 – Influência do fotoperíodo no ciclo reprodutivo da égua (adaptado de Blanchard *et al.*,(1998))



O hipotálamo produz a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) que é libertada para o sistema hipotalâmico-hipofisário e estimula a síntese e a libertação das gonadotrofinas: a hormona estimuladora dos folículos (FSH) e a hormona luteinizante (LH) a partir da glândula hipofisaria anterior. O estrogénio produzido pelos folículos em maturação tem um feedback positivo na libertação de LH (i.e. promove ainda mais libertação de LH) na presença de baixas concentrações de progesterona circulante. A inibina e o estrogénio produzidos pelos folículos em crescimento têm um efeito de feedback negativo na libertação de FSH (i.e., inibem a libertação de FSH). A progesterona produzida pelo CL tem um efeito de feedback negativo na libertação de LH (Blanchard *et al*, 1998).

A fase folicular do ciclo éstrico é caracterizada pelo crescimento folicular com a produção de estrogénio. O desenvolvimento folicular ocorre durante o ciclo éstrico e podem aparecer grandes folículos (> 30 mm de diâmetro) mesmo em diestro. Contudo a maturação completa dos folículos geralmente ocorre apenas na presença de baixas concentrações plasmáticas de progesterona. Muitos folículos iniciam o processo de maturação normalmente em uma ou duas ondas por ciclo, mas geralmente apenas um folículo se torna dominante e ovula (Blanchard *et al*, 1998).

O desenvolvimento folicular ovárico ocorre em ondas durante o ciclo éstrico, gestação, e transição da época anovulatória para a ovulatória. Uma onda folicular tem sido descrita como a emergência sincronizada de um grupo de folículos antrais com diâmetros maiores

ou iguais a 5 mm. Os folículos crescem na ordem de 2-3 mm por dia até um folículo (folículo dominante) ser seleccionado para continuação do crescimento e os outros folículos grandes regredirem (folículos subordinados). A divergência no crescimento entre os dois maiores folículos ocorre quando o folículo maior atinge aproximadamente os 22 mm de diâmetro. As ondas foliculares que dão origem a um folículo com diâmetro superior a 30 mm são chamadas de ondas maiores ou principais. Estas ondas são ainda definidas como primárias e secundárias. Durante o ciclo éstrico as ondas principais primárias surgem no meio do diestro, no qual o folículo dominante ovula no fim do estro. As ondas secundárias principais precedem as primárias e surgem durante o fim do estro ou início do diestro, na qual o folículo dominante ovula, torna-se hemorrágico ou regride. Em adição às ondas foliculares principais, ocorrem ainda ondas foliculares pequenas ou menores. A diferença entre os dois tipos de ondas é que o folículo maior de uma onda pequena atinge no máximo um diâmetro de 30 mm e depois regride. Isto é, a diferença entre o diâmetro máximo entre o folículo maior e o segundo maior de uma onda menor é geralmente menos que 6 mm comparativamente com uma maior diferença de 15 mm entre o folículo dominante e o folículo maior subordinado de uma onda principal. Neste aspecto, o folículo maior de uma onda pequena parece não ter dominância. (Ginther, 1992).

Os folículos em crescimento de uma onda podem-se misturar com folículos em regressão de uma onda precedente sendo por isso necessária mais de um exame ecográfico para diferenciar o estado folicular (Ginther, 1995).

Os folículos pequenos, médios e grandes são geralmente esféricos e firmes. Contudo, uma grande percentagem de folículos pré-ovulatórios (85-90% dos folículos com diâmetro superior a 35 mm) tornam-se aparentemente menos túrgidos e conseqüentemente não esféricos imediatamente antes da ovulação (McKinnon *et al.*, 1993). A palpação transrectal de folículos com 10-15 mm de diâmetro pode ser difícil. A avaliação digital do tipo e da forma dos folículos é altamente subjectiva, em parte porque o desenvolvimento folicular ocorre centralmente dentro do ovário, e, a protusão dos folículos, especialmente dos mais pequenos, na superfície do ovário nem sempre é óbvia. Mais ainda, os ligamentos suspensores podem interferir com o procedimento da palpação (Rantanen & McKinnon, 1997). Embora a palpação dos folículos com mais de 15 mm não seja tão difícil, a estimativa táctil do número e da dimensão dos folículos é ainda subjectiva. Neste aspecto, a ultrasonografia é um meio mais objectivo para avaliar e monitorizar o desenvolvimento folicular, começando com folículos tão pequenos como os de 2 mm (Ginther, 1995).

A ovulação espontânea ocorre geralmente quando o folículo dominante atinge aproximadamente os 40 mm de diâmetro. Contudo, o diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório está relacionado com a época do ano, a raça e o tipo de cavalo. A ovulação é o processo através do qual o fluido folicular e o oócito são libertados de um folículo grande após rotura ao nível da fossa de ovulação. O esvaziamento do folículo é um processo

relativamente rápido, no qual 50-90% do fluido antral é libertado em 60 segundos. Eventualmente, o colapso da parede folicular no antrum pode ser palpado como uma depressão na superfície ovárica ou vista como uma área hiperecótica no local onde anteriormente estava o folículo pré-ovulatório (Ginther, 1995). Contudo, se passaram mais de 24 h entre exames, quando no início estava presente um grande folículo e na seguinte já não estava, a cavidade do folículo que roturou pode começar a encher-se de sangue e confundir-se com um folículo anovulatório, quando se usa unicamente um diagnóstico táctil. Neste aspecto, a ecografia permite diferenciar folículos anovulatórios de folículos que ovularam e já se encheram de sangue para formar um corpo hemorrágico (Bergfelt, Pierson & Adams, 1997).

A fase lútea inicia-se após a ovulação com a formação de um corpo lúteo que secreta progesterona. As concentrações máximas de progesterona circulante são atingidas aos seis dias após a ovulação. A égua raramente demonstra sinais comportamentais de cio quando a concentração plasmática de progesterona é superior a 1-2 ng/ml, mesmo na presença de grandes folículos nos ovários.

Os corpos lúteos primários resultam de ovulações de folículos dominantes de ondas primárias principais no fim do estro, quando prevalece o estrogénio (ovulações únicas ou duplas sincronizadas ou duplas não sincronizadas), enquanto que os corpos lúteos secundários resultam de ovulações de folículos dominantes de ondas secundárias durante o diestro ou durante a gestação, quando prevalece a progesterona. Os corpos lúteos acessórios resultam da ovulação de folículos de ondas foliculares durante a gestação e /ou da luteinização de folículos anovulatórios. Ambos os corpos lúteos secundários e acessórios são referidos como corpos lúteos suplementares (Ginther, 1992).

Os corpos lúteos primários e secundários começam a regredir, tipicamente no fim do diestro e os corpos lúteos suplementares regredem pelo 5º mês de gestação (Bergfelt, 2000).

No início da luteólise o folículo maior é tipicamente o folículo que aumenta de tamanho e ovula. Os restantes folículos sofrem atresia e eventualmente regredem. O diâmetro folicular aquando da ovulação geralmente varia entre 30-70 mm e aproximam-se dos 40-45mm, embora folículos mais pequenos ou maiores possam também ovular. Os folículos ovulatórios são geralmente maiores no início da época reprodutiva (Março-Maio) comparativamente com aqueles que ovulam no pico da época (Junho e Julho). Aproximadamente 80 % das éguas ovulam nas 48 h que precedem o fim do estro (cio). A incidência de ovulações duplas é em média de 16%, sendo que os Puro-Sangue Inglês (PSI), Warmbloods e Drafts têm uma maior incidência, e os Quarter Horses, Appaloosa e pôneis uma menor incidência (Blanchard *et al*, 1998).

O tempo de vida do corpo lúteo depende da libertação endógena de prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) pelo endométrio, de forma pulsátil, entre os dias 13 e 16 pós ovulação. A PGF<sub>2α</sub> entra na circulação e atinge os ovários por via sistémica. A PGF<sub>2α</sub> provoca uma rápida

luteólise resultando numa diminuição da concentração de progesterona circulante, que por sua vez liberta o bloqueio de secreção de LH. A maturação folicular e os sinais comportamentais característicos da fase folicular do ciclo éstrico começam então. A variação da duração da fase lútea é geralmente resultado de disfunções uterinas que provocam a secreção de PGF2 $\alpha$  que encurta o diestro ou persistência espontânea do CL que prolonga o diestro devido à falta de libertação de PGF2 $\alpha$  (Daels, 1993).

## 2.1. Sazonalidade

A variação sazonal da duração da luz diária tem uma profunda influência na performance reprodutiva da égua. O cavalo é um reprodutor sazonal e este padrão é regulado pela luz diária ou fotoperíodo. O cavalo responde positivamente (aumentando a eficiência reprodutiva) a aumentos na quantidade de luz e negativamente (reduzindo a eficiência reprodutiva) a diminuições na quantidade de luz. A duração do fotoperíodo modula a actividade reprodutiva através da regulação da secreção de GnRH. A glândula pineal parece sinalizar o hipotálamo através da secreção de melatonina. Quando o comprimento do dia é curto, a melatonina libertada pela glândula pineal inibe a síntese e a libertação de GnRH (Ginther, 1992).

A transição entre as épocas é um processo gradual e progressivo mas o ano reprodutivo da égua está dividido por razões descritivas em quatro períodos que correspondem a alterações no comprimento do dia: anestro, transição para a época reprodutiva, época reprodutiva fisiológica e transição para o anestro (Blanchard *et al.*, 1998).

Na égua, durante o período de transição da época reprodutiva para o anestro sazonal e o retorno à ciclicidade ovárica, o fotoperíodo é o factor externo mais importante que influencia o sistema endócrino (Ferreira-Dias, Alpoim-Moreira *et al.*, 2005).

O período do pico da fertilidade (*i.e.*, a época reprodutiva fisiológica ou período de receptividade ovulatória) ocorre próximo do maior dia do ano ou solstício de Verão (21 de Junho). Depois a égua entra num período de transição que se inicia com o equinócio de Outono (21 de Setembro). Durante este período a égua exhibe um comportamento errático de cio sem ovulação correspondente. Se a ovulação ocorrer a função do corpo lúteo não será mantida. As éguas entram então num estado de anestro ou quiescência sexual que ocorre junto ou após o dia mais curto do ano ou solstício de Inverno (21 de Dezembro). O período de anestro é caracterizado por ovários pequenos e inactivos e pela ausência de ovulação na maioria das éguas. Contudo, não é raro que algumas éguas exibam períodos de comportamento de cio erráticos durante o período de anestro. O período de anestro geralmente engloba os meses de Inverno, no hemisfério Norte (Ginther, 1992). Nos meses de Inverno, 80% das éguas ou mais entram numa fase anovulatória prolongada que se denomina de anestro de Inverno. O início do período de transição pode ser definido como o

primeiro aumento significativo no diâmetro folicular maior do que o registado durante o anestro profundo. De um ponto de vista prático, o período de transição começa quando as éguas exibem um folículo que atingiu um diâmetro de 20-25 mm. O termo transição tardia pode ser usado quando um ou mais folículos tem diâmetro superior a 30 mm (McCue, 2006).

As éguas podem exibir várias ondas de crescimento e regressão folicular durante o período de transição. O número total de folículos presentes em cada ovário aumenta durante a transição e o exame ecográfico revela um aspecto clássico tipo cacho de uvas dos folículos de pequeno e médio diâmetro. O período de transição pode durar até 50-70 dias ou mais até ocorrer a primeira ovulação da época. Num estudo efectuado por Atayde e Rocha (2010) concluiu-se que, devido à sua grande variabilidade, os padrões do comportamento éstrico durante a transição vernal não contribuem para a previsão da data da primeira ovulação. Também, nesse mesmo estudo se reportou que não existe um parâmetro ecográfico que por si só seja um indicador fiável de eminência da primeira ovulação do ano. Também Watson *et al.* (2003) reportaram que o edema endometrial pode aparecer quando apenas existem folículos não ovulatórios e não produtores de estradiol, e especulou que durante o período de transição o útero pode ser mais sensível a pequenas variações na concentração de estradiol.

Geralmente, uma vez que a égua ovula ela vai continuar a ciclar em intervalos regulares. No que diz respeito ao comportamento, as éguas em transição podem apresentar períodos prolongados ou irregulares de cio. Isto deve-se à extrema sensibilidade aos baixos níveis de estrogénios que são produzidos pelos folículos em desenvolvimento (McCue, 2006).

Foi demonstrado na universidade do Colorado que durante o período de anestro sazonal a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo e a hormona luteinizante (LH) na hipófise se encontram em baixa concentração (Sílvia, Squires & Nett, 1986). À medida que a égua progride para o período de transição as concentrações de GnRH são restabelecidas no hipotálamo. Contudo a reposição de LH na hipófise leva mais tempo (Sílvia *et al.*, 1986). O aumento da luz diária está associado com a reposição do equilíbrio hormonal necessário para o início da ciclicidade (Nequin, King, Matt & Jurak, 1990). A hipófise faz parte do mecanismo que monitoriza os eventos relacionados com o fotoperíodo. Vários estudos demonstraram que um aumento do fotoperíodo acelera a ovulação em éguas em anestro de transição, através de um mecanismo que envolve a supressão de melatonina na glândula pineal e por isso eliminando o efeito inibitório da melatonina no hipotálamo (Clay, Squires, Amann & Nett, 1989). De facto, um reconhecimento a longo termo de sinais metabólicos antes de alterações no fotoperíodo, ou a necessidade de se atingir um valor crítico antes de um sinal inibitório cessar a ciclicidade ovárica, foram referidos (Fitzgerald & Schmidt, 1995). Além disso, um aumento na leptina, sugere que esta hormona possa estar



envolvida na reactivação do eixo reprodutivo e na manutenção da actividade ovárica (Ferreira-Dias *et al.*, 2005).

Depois do período de anestro, a égua entra noutro período, o de transição de receptividade anovulatória que coincide com o equinócio vernal (21 de Março). Este período é caracterizado por um período de cio longo e errático que finalmente termina na ovulação, iniciando então o período de receptividade ovulatória. Este padrão cíclico é uma tendência e não inclui todas as éguas porque uma pequena percentagem (aproximadamente 15-20%) continua a ciclar regularmente durante todo o ano. Outros estudos também demonstraram esta ocorrência em éguas lusitanas (Ferreira-Dias *et al.*, 2005). Mesmo populações de éguas junto ao equador tendem a demonstrar um padrão sazonal na sua ciclicidade reprodutiva (Ginther, 1992).

Os factores ambientais tais como a disponibilidade de alimento e a temperatura podem também influenciar o sistema endócrino e por isso mediar as funções reprodutivas e imunitárias (Nelson & Demas (1996) e Klein & Nelson (1999)).

A sazonalidade reprodutiva resulta efectivamente no nascimento dos poldros na Primavera, quando as condições ambientais são as mais favoráveis à sobrevivência dos poldros (Daels, 1993). O papel da sazonalidade em vários aspectos da performance reprodutiva ajuda a exemplificar este ponto. Por exemplo, o início do estro está sob influência directa da duração do comprimento do dia. À medida que o comprimento do dia aumenta, a duração do estro diminui e a incidência de ovulação aumenta, ambos resultando em mais concepções com menor número de inseminações (Ginther, 1992). Os períodos de cio mais curtos e as maiores taxas de ovulação ocorrem em Junho, resultando em poldros nascidos em Maio. Mais ainda, existem factores ainda mal conhecidos que incentivam a égua gestante a parir durante a época reprodutiva fisiológica. Éguas com poldros nascidos no início do ano, tendem a ter gestações mais longas do que aquelas com poldros nascidos mais tarde na época reprodutiva. Outro factor que favorece a reprodução em Maio e Junho ocorre em éguas que entram no cio do poldro no início do ano, porque estas tendem a ovular mais tarde após o parto do que aquelas que entram no cio do poldro mais tarde no ano. Todos estes fenómenos sugerem que existe um mecanismo inerente que conduz a reprodução e o parto para a época reprodutiva fisiológica (Maio-Julho) (Ginther, 1992).

Os cavalos têm sido descritos como reprodutores ineficientes quando comparados com outras espécies e a performance reprodutiva na égua tem sido descrita como fraca quando comparada com outras espécies domésticas. Isto é contudo falacioso e deriva das tentativas do Homem de redefinir a época reprodutiva como mais lhe convém. A época reprodutiva operacional para os cavalos é estabelecida, no Hemisfério Norte, entre 15 Fevereiro a 15 Julho. A ineficiência reprodutiva nos cavalos deriva da sua reprodução fora da época reprodutiva fisiológica; de outro modo a fertilidade intrínseca do cavalo é bastante aceitável.

Algumas características do ciclo reprodutivo da égua podem contribuir para esta baixa eficiência reprodutiva e são: padrão sazonal da ovulação; ciclos erráticos durante o período de transição entre o anestro e a ciclicidade normal e a longa fase folicular necessária ao desenvolvimento de um folículo ovulatório (McKinnon, 2009).

## **2.2. Manipulação do período de transição**

### **2.2.1. Luz artificial**

A época reprodutiva fisiológica pode ser manipulada com sucesso para melhor se ajustar a uma época reprodutiva operacional aumentando artificialmente o fotoperíodo. A duração mínima de luz necessária ainda não foi definitivamente estabelecida mas a experiência no campo indica que fornecendo 14-16 h de estímulo de luz (artificial e natural) por dia é adequado. Um programa de luz necessita pelo menos de 8-10 semanas para desencadear uma resposta e por isso, as éguas no hemisfério norte começam a ser expostas a sistemas de luz no dia 1 de Dezembro de modo a que no dia 15 de Fevereiro já apresentem uma actividade cíclica normal (Palmer, Driancourt & Ortavant, 1982). A intensidade de luz mínima é de 100 lux. Uma luz incandescente de 100-200 W numa box de 3,5 x 3,5 m deverá ser suficiente (McCue, 2006).

A exposição das éguas em anestro profundo a um fotoperíodo artificial estimulador tem sido usada por várias décadas para acelerar a primeira ovulação do ano. As éguas que são mantidas sob luzes artificiais também atravessam um período de transição com duração relativamente normal, mas a transição começa mais cedo no ano. Na maioria dos casos, a duração do início da exposição adequada à luz até à ovulação é de 60-70 dias (Guillaume, Duchamp & Nagy, 2000).

### **2.2.2. Fármacos**

Existem inúmeras terapias hormonais que têm sido utilizadas na tentativa de estimular o desenvolvimento folicular e acelerar a primeira ovulação no ano em éguas de transição (Tabela 1).

A administração de doses baixas de GnRH endógena e agonistas e de FSH equina têm sido usadas com sucesso para induzir o crescimento folicular em éguas na fase de transição. Doses mais elevadas de agonistas GnRH e de hCG induzem a ovulação de folículos grandes (> 35 mm de diâmetro) na fase de transição tardia (McCue, 2006).

Os antagonistas da dopamina, tais como a domperidona e o sulpiride, podem não ser eficazes em todas as situações. A taxa de sucesso será maior em éguas em transição e em éguas mantidas em box sob luz artificial (McCue, 2006). O sulpiride é eficaz a acelerar o

início da fase de transição e a primeira ovulação enquanto que a domperidona apenas funciona em algumas éguas (Mari *et al.*, 2009).

A progesterona ou progestagénios sintéticos não aceleram consistentemente a primeira ovulação quando administrados a éguas em anestro profundo ou no início da transição mas podem sincronizar o retorno do estro e avançar a primeira ovulação em éguas em transição tardia e é eficaz em suprimir os períodos de estro prolongados e frequentemente irregulares em éguas em transição (McCue, 2006).

O início de qualquer tratamento a éguas em anestro de Inverno profundo tem uma menor taxa de sucesso e está associado a um maior risco de retorno ao anestro após a conclusão do tratamento do que quando o tratamento é feito com as éguas em transição (McCue, 2006).

Tabela 1 – Medicamentos e doses utilizadas no manejo das éguas na fase de transição [adaptada de McCue, ( 2006)]

<b>Fármaco</b>	<b>Nome Comercial</b>	<b>Dose</b>
Altrenogest	Regumate <sup>®</sup>	0.044 mg/kg, PO, SID
Buserelina (Agonista GnRH)	Receptal <sup>®</sup>	10-100 µg, IM ou SC, BID
Deslorelina (GnRH)	Ovuplant <sup>®</sup>	2.2 mg implante SC
Domperidona	Motilium <sup>®</sup>	1.1 mg/kg, PO, SID
FSH equina	eFSH	6.25 – 12.5 mg, IM, BID
Goserelina (Agonista GnRH)	Zoladex <sup>®</sup>	1/3 a 1/2 de implante de 3.6 mg, SC, dose única
hCG	Chorulon <sup>®</sup>	1500-3000 U.I., IV
Progesterona	Genérico	150 mg/kg, IM, SID
Sulpiride	Dogmatil <sup>®</sup>	0.5 mg/kg, IM, BID

A razão do uso de tratamentos com progestagénio/progesterona para acelerar o início do estro ovulatório está fundamentada em éguas que no estro de transição têm insuficiente acumulação/libertação de LH pela hipófise para promover a maturação e a ovulação de um folículo dominante. O tratamento com progestagénio, que geralmente inibe a libertação de LH durante a sua administração, provoca a acumulação e subsequente libertação de LH suficiente para induzir a maturação folicular e a ovulação quando a suplementação de progestagénio é interrompida (Alexander & Irvine, 1991). A progesterona (150 mg/Kg por dia, IM) ou altrenogest (0,044 mg/Kg por dia, PO) durante 10-15 dias pode iniciar uma ovulação ligeiramente mais cedo e mais previsível e ciclos éstricos regulares se administrada a éguas mais tarde no estro de transição (folículos com diâmetro superior a 20 mm) (Squires, Heesemann, Webel, Shideler & Voss, 1983).

O estradiol em combinação com a progesterona, também pode ser utilizado para encurtar ligeiramente o período de transição tardio. A razão para o seu uso é semelhante à dos progestagénios /progesterona. A adição de estradiol à progesterona resulta numa maior supressão do desenvolvimento folicular do que os progestagénios sozinhos, por isso o tamanho folicular é menor após o tratamento com esteróide. Então, o intervalo até ao início do estro e subsequente ovulação é tipicamente maior do que com o tratamento apenas com progestagénio/progesterona (Taylor, Pemstein & Loy, 1982)

O tratamento com progestagénio/progesterona, associado ou não ao estradiol, tem sido usado no fim dos programas com luz artificial (mais ou menos 60 dias após o início da luz artificial) a parece ter um efeito aditivo na indução de ciclos éstricos (Taylor *et al.*, 1982).

### **2.3. Indução da ovulação em éguas cíclicas**

De modo a otimizar a fertilidade, a ovulação deve ocorrer dentro das 24-48 h após a cobertura com um garanhão fértil. Quando se usa sémen congelado ou quando se utilizam garanhões sub-férteis, a semi-vida dos espermatozoides pode estar reduzida, requerendo que a inseminação seja mais próxima da ovulação. A administração de hCG (“Human chorionic gonadotropin” ou gonadotrofina coriônica humana) é uma das possibilidades e a mais prática e económica para induzir a ovulação de um folículo grande pré-ovulatório em éguas cíclicas (Blanchard *et al.*, 1998).

A injeção de hCG (1500-3300 U.I., EV) é suficiente para induzir a ovulação de folículos pré-ovulatórios com mais de 35 mm de diâmetro. Se administrarmos hCG quando os folículos pré-ovulatórios atingirem os 35 mm de diâmetro, a maioria das éguas irá ovular dentro de 48h. Se o dia de estro é desconhecido e o folículo tem mais de 35 mm, o intervalo até á ovulação é menos preciso e pode ocorrer mais cedo após a administração de hCG. Este fármaco é de grande valor quando usado nos primeiros meses da época reprodutiva, quando os critérios para prever a ovulação em éguas cíclicas (ex., tamanho e textura do folículo, relaxamento do cérvix e dia do estro) são menos fiáveis. A hCG pode ser utilizada em combinação com outras hormonas utilizadas para sincronizar o estro ou para diminuir a duração do período de transição tardio (tais como a progesterona ou a busarelina, por exemplo). Têm sido encontrados anticorpos à hCG no soro das éguas que receberam injeções repetidas de hCG. Contudo os anticorpos não interferem com a ovulação espontânea subsequente nas éguas tratadas (Blanchard *et al.*, 1998).

### **2.4. Sincronização do estro em éguas cíclicas**

A longa duração do estro da égua com a ovulação a ocorrer variavelmente entre o dia 1-10 após o início do estro requer um maneio reprodutivo caro e laborioso. O maneio reprodutivo

do cavalo seria largamente beneficiado pelo desenvolvimento de um método fiável e económico para controlar mais precisamente o estro e a ovulação na égua (Squires *et al.*, 1994).

A maioria dos métodos de sincronização utilizada para controlar a ovulação nas espécies domésticas actua modificando a fase lútea do ciclo éstrico. A administração de PGF2 $\alpha$  às éguas faz-se para reduzir o tempo de vida do corpo lúteo e com isto induzir o estro. O tratamento com PGF2 $\alpha$  é frequentemente utilizado em éguas, em casos individuais, quando se suspeita ou se conhece a presença de um corpo lúteo maduro. O tratamento de éguas com PGF2 $\alpha$  que tenham um corpo lúteo maduro resulta em média, no aparecimento do estro em 2-4 dias e na ovulação em 7-12 dias. O início do estro é mais fácil de sincronizar do que o dia da ovulação. O momento da ovulação após a administração de PGF2 $\alpha$  permanece bastante variável devido à fase folicular ter um papel mais preponderante no controlo da duração total do ciclo éstrico das éguas (Taylor *et al.*, 1982). Éguas em diestro com folículos grandes presentes (com diâmetro superior a 35 mm) irão retornar ao estro e ovular mais rapidamente do que éguas com folículos menores. Em muitos destes casos pode não ocorrer estro comportamental, ser parcial, ou ficar resumido a um ou dois dias. Por isso, tanto o estro como a ovulação podem facilmente não ser detectados se não houver métodos de detecção diários e monitorização do estado folicular logo após a administração de PGF2 $\alpha$ .

A sincronização precisa do estro e da ovulação de grupos de éguas é mais difícil devido à sensibilidade incompleta do corpo lúteo equino à administração de PGF2 $\alpha$  antes dos seis dias após a ovulação. Este fenómeno impede a sincronização precisa da ovulação em grupos de éguas através da administração de uma ou várias injeções de PGF2 $\alpha$ . Contudo devido ao custo, disponibilidade e facilidade de administração, os métodos de sincronização que utilizam PGF2 $\alpha$ , sozinha ou combinada com outras hormonas, são muito comuns (Taylor *et al.*, 1982).

A administração de progestagénio na forma de progesterona em óleo (150 mg/Kg/dia, IM) ou altrenogest (0.044 mg/kg/dia, PO) para prolongar artificialmente a fase lútea do ciclo éstrico tem sido utilizada para sincronizar o estro nas éguas. A razão para o seu uso baseia-se no facto dos progestagénios inibirem a libertação de LH e por isso bloquearem a ovulação. Quando administrados por um período suficientemente longo a éguas cíclicas o corpo lúteo regride mas a ovulação subsequente é bloqueada pelos progestagénios exógenos. Quando a administração de progestagénio cessa as éguas retornam ao estro e ovulam. A administração de progestagénios durante 14-15 dias é mais eficaz do que por períodos mais curtos, porque permite que as éguas que tenham ovulado recentemente no início do tratamento tenham tempo suficiente para que ocorra a regressão espontânea do corpo lúteo. O intervalo até ao estro é também variável após cessar a administração de progestagénios mas é em média de 4-7 dias. A ovulação ocorre em média aos 7-12 dias

após terminado o tratamento com progestagénios. O desenvolvimento folicular não é uniformemente inibido mesmo com doses relativamente altas de progestagénios e, por isso pode existir uma grande variedade quanto ao estado folicular após terminar o tratamento, resultando em intervalos muito variáveis até à ovulação entre éguas (Blanchard *et al.*, 1998). O controlo do crescimento folicular durante o período de tratamento é necessário para se conseguir um controlo preciso da ovulação na égua. Vários estudos nos últimos vinte anos levaram ao desenvolvimento de um controlo mais preciso da ovulação na égua. Descobriu-se que a administração diária de 10 mg de estradiol-17 $\beta$  suprime o crescimento folicular. A administração diária de progesterona (para prolongar artificialmente a fase lútea) em combinação com a administração diária de estradiol (para suprimir o crescimento folicular) permite que o intervalo até à ovulação seja mais preciso e previsível após o tratamento com esteróides em éguas cíclicas, em éguas após o parto e em éguas primíparas e vazias, e que estiveram sob influência de um tratamento de luz durante pelo menos 60 dias (Squires *et al.*, 1994).

Um problema adicional que contribui para a variabilidade do intervalo até a ovulação é a tendência para o corpo lúteo permanecer após terminar o tratamento com progestagénio. Isto ocorre porque (1) algumas éguas ovulam após o tratamento com esteróides ser iniciado e o corpo lúteo resultante continua a produzir progesterona após o tratamento com progestagénio exógeno ter terminado e, (2) alguns corpos lúteos das éguas persistem espontaneamente (corpo lúteo persistente) por mais tempo do que o tempo de vida lútea habitual, e permanecem funcionais após terminar o tratamento com progestagénios. A administração de PGF2 $\alpha$  após terminar o tratamento com progestagénio tem por isso sido recomendada para garantir que os corpos lúteos que permanecem regridam e que as éguas tratadas retornam ao estro em tempo útil. (Blanchard *et al.*, 1998)

A taxa de sincronização de cio relativamente elevada ou a ovulação associada a um regime de progestagénio e estrogénio é atribuída à uniformidade da população folicular nas éguas. Uma desvantagem do regime com esteróides é o trabalho e o tempo que consome (injecções diárias por vários dias) para se conseguir uma população homogénea de folículos pequenos a médios. Mais ainda, o intervalo entre o início do tratamento até à ovulação pode ir até aos 20-25 dias com ou sem tratamento com hCG. Assim sendo, a aspiração folicular transvaginal guiada por ecografia como método de ablação folicular pode ser um método alternativo para a sincronização do crescimento folicular e ovulação entre éguas (Bergfelt, 2000).

A ecografia transrectal tem sido usada passivamente para avaliar os folículos ovários, enquanto que a ecografia transvaginal tem sido utilizada mais agressivamente para manipular o desenvolvimento folicular e outros eventos reprodutivos (Ginther, 1995 e Squires & Cook, 1998). A abordagem transvaginal pode ser utilizada para guiar uma agulha longa e de grande calibre de diâmetro, através da parede vaginal até a um folículo ovário

para remover o conteúdo folicular (ie., oócito, células da granulosa e fluido folicular). A aspiração ou remoção dos conteúdos foliculares resultam na destruição do folículo de modo a impedir o seu futuro desenvolvimento. Então, a ablação ou remoção de uma população de folículos permite que se desenvolva um novo grupo de folículos (Bergfelt, 2000).

Recentemente a ablação folicular combinada com tratamentos com PGF<sub>2</sub>α e hCG foi usada como uma abordagem alternativa para sincronizar o desenvolvimento folicular e a ovulação num grupo de éguas cíclicas (Bergfelt, 2000).

## **2.5. Reprodução no cio do poldro**

O cio do poldro é o primeiro cio ou período de estro que ocorre após o parto. As éguas geralmente entram em cio 6-8 dias após o parto. O intervalo médio do parto até à primeira ovulação é de dez dias, embora as éguas possam ovular logo aos 7-8 dias ou só aos 14-15 dias pós parto e ser considerado clinicamente normal (Blanchard *et al.*, 1998). As taxas de gestação são geralmente mais elevadas para éguas que ovulam dez ou mais dias após o parto do que para éguas que ovulam antes dos nove dias pós parto (Loy, 1980). A decisão de usar o cio do poldro é de cada criador. A vantagem de usar o cio do poldro é a de não perder tempo, contudo a fertilidade é menor.

O útero da égua sofre profundas alterações após o parto. O fluido e os detritos da placenta (os lóquias) são expelidos, o tecido que reveste o útero regenera-se e o tamanho do útero diminui. A maioria das éguas tem uma inflamação significativa no útero durante a primeira semana após o parto (Koskinen & Katila, 1987). Embora muitos programas de reprodução especifiquem que as éguas não devem ser cobertas/inseminadas a não ser que a cultura do líquido uterino seja negativa, alguns estudos indicam que a presença ou a ausência de bactérias não está correlacionada com a fertilidade nas éguas no cio do poldro. Isto já não é verdade para os ciclos seguintes ao cio do poldro, onde a presença de bactérias é uma causa significativa de fertilidade reduzida (Gygax, Ganjam & Kenney, 1979). A maioria das éguas tem uma ovulação no cio do poldro e continua a ciclar em intervalos de aproximadamente vinte e um dias. Contudo, algumas éguas têm a ovulação do cio do poldro seguida por um período variável de anestro até a égua voltar à actividade cíclica normal. Apenas um pequeno número não irá ciclar de todo durante 2-3 meses. A falta de desenvolvimento de folículos e/ou de ovular após o parto é primeiramente devido aos efeitos da época. Consequentemente, as éguas que parem entre Janeiro e Março no hemisfério norte, são supostamente as mais afectadas. A ausência de crescimento folicular nas éguas após o parto tem ocasionalmente sido atribuído à lactação e algumas éguas retornam ao cio logo após o poldro ser desmamado (Ginther, 1992).

Têm sido usadas bastantes estratégias para aumentar a fertilidade das éguas no período inicial do pós-parto. A exposição das éguas gestantes a um fotoperíodo artificial durante o

ultimo trimestre vai diminuir a duração da gestação em 7-10 dias e diminuir o risco de retorno a um estado de inactividade ovárica ou anestro após o parto (Hodge, Kreider & Potter, 1982). A administração de progesterona ou Regumate® (Intervet International B.V., Boxmeer, Holand) a éguas em pós parto tem sido usada na tentativa de adiar a primeira ovulação e aumentar as taxas de gestação. Também era prática corrente fazer lavagens uterinas às éguas 1-2 dias pós parto. Contudo, estudos clínicos concluíram que a lavagem uterina de rotina não aumentava as taxas de gestação em éguas com pós-parto normal. Por vezes também se usa ocitocina ou prostaglandinas em éguas pós parto para promover contracções uterinas e com isso eliminar os fluidos e os detritos e estimular a involução uterina, como tentativa para aumentar as taxas de concepção no cio do poldro (Nie, Johnson & Wenzel, 2003). Uma estratégia simples e comum para otimizar a taxa de concepção pós parto em éguas com parto normais é examinar a égua nos dias sete e nove pós parto. As éguas que ovulam no dia nove ou antes não são inseminadas e administra-se prostaglandina cinco dias após a ovulação para que retornem ao estro. As éguas que ainda têm um grande folículo aos nove dias pós parto são utilizadas na reprodução usando as técnicas convencionais. O uso de agentes indutores da ovulação (hCG ou GnRH) é desaconselhado até ao dia nove ou dez, uma vez que as ovulações precoces no período pós parto podem não ser tão férteis (Blanchard *et al.*, 1998). Geralmente, os criadores são aconselhados a cobrir/inseminar as éguas no cio do poldro. Contudo éguas que tiveram complicações no parto ou pós-parto (distócia, retenção de placenta, corrimento prolongado) podem ter uma taxa de gestação de cio de poldro diminuída ou uma taxa de perda embrionária aumentada. Consequentemente, pode ser aconselhável cobrir/inseminar estas éguas no segundo cio pós parto (30 dias) ou num período de cio mais tarde.

### **3. Inseminação artificial**

A utilização da inseminação artificial na espécie equina data de 1930. Um trabalho pioneiro na inseminação artificial em equinos com sémen fresco foi realizado por Ivanow na União Soviética e por Gotze na Alemanha (Gotze, 1949). Naqueles tempos o objectivo principal da inseminação artificial era o de restringir a transmissão de doenças. Hoje em dia a inseminação artificial tornou-se uma peça fundamental nos programas de reprodução em muitas raças. Nas raças de desporto europeias tais como a Hanoveriana, Holsteiner, Warmblood Holandês ou Sela Francês a inseminação artificial contribuiu substancialmente para o progresso genético. As tecnologias de reprodução assistida tais como a inseminação artificial são hoje aceites pela maioria das raças no mundo inteiro com a excepção dos cavalos Puro-Sangue Inglês (PSI) de corridas, embora algumas raças americanas como os quarto de milha (Quarter Horse) só apenas recentemente permitiram o registo de poldros nascidos por inseminação artificial com sémen congelado. Muitas tecnologias de reprodução



assistida usadas hoje na medicina humana foram desenvolvidas a partir de muitos trabalhos de investigadores veterinários. Contudo, ao contrário do seu crescente impacto nos programas de reprodução equinos, a inseminação artificial e outras técnicas de reprodução assistida são raramente utilizadas por razões veterinárias, *i.e.* para aumentar as taxas de gestação em éguas subfértéis e garanhões. Isto não só é limitado pelos custos, necessidades de equipamento específico e baixo sucesso de certas técnicas mas também devido ao limitado interesse e experiência de muitos médicos veterinários equinos (Aurich, 2006).

O sucesso de um programa de inseminação artificial depende de:

A – Garanhão : - exame reprodutivo detalhado no início da época reprodutiva

- confirmação da qualidade do sémen

- arrefecimento e armazenamento apropriados do sémen após colheita

B – Égua: - exame reprodutivo satisfatório

- indução de um estro ovulatório

- previsão precisa do momento da ovulação

- inseminação no tempo correcto em relação à ovulação

- armazenamento, descongelação e maneio apropriados do sémen

- técnica de inseminação correcta

- exames ginecológicos e tratamentos pós inseminação quando necessários

- diagnóstico de gestação correcto aos 14-16 dias pós-inseminação artificial

(Pycock, 2008).

A inseminação artificial é a técnica utilizada para depositar espermatozóides normais e vivos no útero, no momento adequado (Samper, 2000). Embora este procedimento pareça simples, a perfeita coordenação das várias etapas resulta em taxas de gestação óptimas.

Nos equinos existem três métodos de inseminação artificial:

1- Sémen fresco – quando o sémen é colhido e usado imediatamente no seu estado puro ou diluído com um diluidor apropriado, ou até algumas horas após a colheita (geralmente menos de três horas)

2 – Sémen refrigerado – após a colheita, o sémen é diluído com um diluidor apropriado e arrefecido lentamente a 5-8°C e transportado para ser utilizado num prazo de 12-36 h após a colheita.

3 – Sémen congelado – o sémen é colhido e processado de forma apropriada e depois é armazenado num contentor de azoto líquido para ser utilizado durante vários dias, meses ou anos após a colheita (Samper, 2000)

É importante garantir que o dono esteja ciente que a inseminação artificial nos cavalos exige um elevado nível de perícia técnica. Logo desde o início o dono deve estar consciente que a inseminação artificial não é uma alternativa barata à cobrição natural. A boa comunicação

entre o dono da égua e do garanhão é vital bem como os respectivos médicos veterinários. Para um programa de inseminação artificial ter sucesso deve-se ter bastante atenção às questões sanitárias para reduzir o risco de transmissão de doenças. É também vital que o dono saiba das taxas de fertilidade médias associadas a cada técnica. Para o sémen refrigerado pode-se esperar taxas de gestação na ordem de 55-70% por ciclo e de 35-50% por ciclo para sémen congelado. A taxa de gestação total no fim da época varia entre 50-90 % com uma média de 75%, e a taxa de poldros vivos é de 65% (Pycocck, 2008).

### **3.1. Técnica de inseminação artificial**

A inseminação natural ou artificial da égua consiste na deposição de sémen dentro do útero da mesma. A égua deve estar devidamente contida e deve ser preparada para a inseminação de acordo com as técnicas de contaminação mínima descritas por Kenney e colegas (1975). A cauda deve ser ligada e levantada para longe de modo a evitar o contacto com a vulva e períneo. A vulva deve ser bem lavada com sabão líquido e depois limpa com água abundante. Este procedimento deve ser repetido pelo menos três vezes até a área estar visualmente livre de qualquer detrito. A vulva e a zona perineal devem então ser limpas com papel (Metcalf, 2000).

O médico veterinário deve colocar uma luva estéril e pegar numa pipeta (catéter) de inseminação estéril e proteger a ponta do catéter com os dedos de modo a garantir a sua esterilidade até chegar ao útero (Figura 3). Deve aplicar gel lubrificante não espermicida na luva e sobre a mão que envolve a ponta do catéter. O sémen, já preparado, deve estar contido numa seringa não espermicida e protegido na mão não estéril das condições ambientais adversas tais como a luz ultravioleta, frio, calor e ar (Broussard *et al.*, 1993).

A mão deve ser então introduzida, sempre protegendo a ponta do catéter, pelos lábios da vulva da égua passando pela vagina e depois inserindo um ou dois dedos no cérvix. Os dedos servem de guia para se poder avançar a pipeta de inseminação pelo cérvix e cerca de 1 cm no útero da égua. Se ao avançar a pipeta não se encontrar resistência, já dentro do útero, esta pode ser cuidadosamente avançada para o corno uterino pretendido (geralmente ipsilateral ao do folículo em desenvolvimento ou ovulação). Nem sempre isto é possível, pois quando existe edema pronunciado e pregas no útero é preciso muito cuidado para não lesionar o endométrio. Uma vez que a pipeta está colocada correctamente no útero deve-se empurrar lentamente o êmbolo da seringa e depositar o sémen neste local (Metcalf, 2000).

Figura 3. Inseminação artificial



Na cobrição natural o garanhão depois de ter penetrado a vagina da égua, empurra várias vezes ritmicamente até ocorrer a ejaculação intra-uterina. Isto provoca a rápida vasodilatação dos vasos sanguíneos que irrigam o corpo esponjoso do pénis e estimula as contracções uterinas, que por sua vez ajudam a propulsionar o sémen depositado até às papilas dos oviductos. Mais ainda, o pénis engurgitado pode impedir o refluxo imediato do sémen durante a ejaculação no útero da égua. Por esta razão, parece lógico que num programa de inseminação artificial se tente reproduzir ao máximo o que se passa na natureza. Deve-se por isso tentar fechar manualmente e cuidadosamente a abertura externa do cérvix quando se remove o cateter, bem como massajar vigorosamente o esfíncter vestibulo-vaginal para prevenir que ocorra o refluxo do sémen do útero (Metcalf, 2000).

### **3.2. Fenómenos fisiológicos**

#### **3.2.1. Fertilização**

A fertilização do oócito da égua ocorre na ampola do oviducto. Antes de ocorrer a interacção entre o oócito e o espermatozóide ocorrem inúmeros fenómenos fisiológicos para que esta fusão tenha sucesso. O sémen que foi depositado no útero da égua é propulsionado em direcção ao oviducto através de fortes contracções uterinas. No tracto genital da égua, os espermatozóides têm que sofrer o processo de capacitação e a reacção acrossómica, uma série complexa de eventos que resulta na remodelação da membrana plasmática do espermatozóide e na libertação de enzimas específicas que permitem ao espermatozóide penetrar no oócito. Embora os espermatozóides capacitados possam ser recuperados do útero de uma égua, é correntemente aceite que os espermatozóides não capacitados são seleccionados para residir no istmo do oviducto até o oócito estar presente (Dobrinski, Thomas & Ball, 1996). Os espermatozóides ligam-se às células epiteliais do oviducto, um

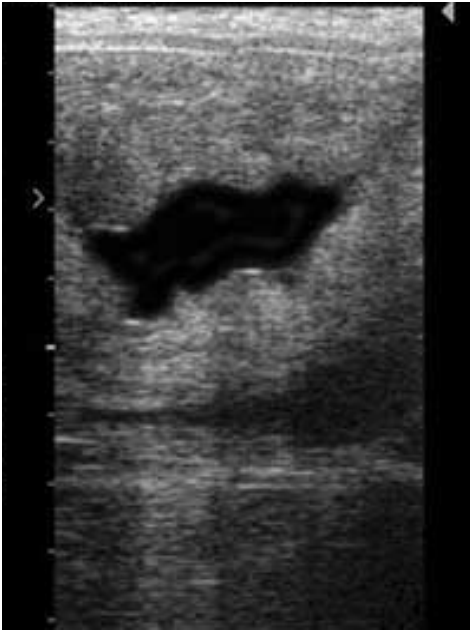
processo que parece estar aumentado nas éguas em estro, em comparação com o diestro (Thomas, Ball, & Brinsko, 1994). Também os garanhões com fraca fertilidade podem ter espermatozoides com lesões inerentes que os impeçam de serem seleccionados para residirem no oviducto (Dobrisnki, Thomas, Smith & Ball, 1996). O efeito desta lesão é mais provável que seja devido à fraca capacidade de ligação do que à fraca mobilidade ou transporte deficiente dos espermatozoides (Dobrisnki *et al.*, 1996).

Os espermatozoides têm a capacidade de sobreviver numa cultura de células de oviducto pelo menos durante seis dias (Ellington, Ball & Blue, 1993). Isto suporta o relato de um caso em que uma égua ficou gestante como resultado de uma única cobrição sete dias antes da ovulação (Newcombe, 1994), bem como o estudo de Woods e colegas (1990) sobre taxas de gestação em éguas que foram inseminadas com sucesso mais de seis dias antes da ovulação. Por isso, o momento da inseminação em relação à ovulação está também dependente da viabilidade do sémen dentro do oviducto, que por sua vez, pode ser dependente do garanhão. Outros factores limitantes incluem os danos aos espermatozoides provocados por condições ambientais adversas tais como os raios ultravioleta (UV), frio, calor e ar; as condições desfavoráveis do aparelho reprodutor da égua; as condições patológicas do aparelho reprodutor do garanhão que possam causar hemospermia ou urospermia; ou mesmo o processo de arrefecimento ou criopreservação (Metcalf, 2000). O oócito ovulado é viável no oviducto por um curto período de tempo – talvez no máximo 12 h (Ginther, 1992), como indicado pelas baixas taxas de gestação de éguas inseminadas mais de 12 h após a ovulação (Woods, Bergfelt & Ginther, 1990; Katila, Koskinen, Kuntsi & Lindberg, 1988 e Palmer *et al.*, 1984). Os espermatozoides capacitados têm que estar disponíveis para uma fertilização com sucesso (Metcalf, 2000).

### **3.2.2. Resposta inflamatória ao sémen**

Não se pode assumir que ao inseminar com um número suficiente de espermatozoides viáveis e no momento óptimo em relação à ovulação irá ocorrer uma gestação na égua. A cobrição/inseminação induz uma resposta inflamatória aguda que é normal e benéfica. A razão de muitas éguas, especialmente éguas velhas, não ficarem gestantes é devido à deficiente eliminação uterina deste exsudado inflamatório (Figura 4). São os próprios espermatozoides que desencadeiam a resposta inflamatória mais aguda (Katila, 2001).

Figura 4 – Imagem ecográfica de endometrite



O sémen é depositado directamente dentro do útero quando as éguas são cobertas naturalmente ou por inseminação artificial. Isto significa que bactérias e os componentes seminais bem como detritos contaminam o útero o que resulta numa inflamação uterina (Katila, 1997). Anteriormente pensava-se que a resposta inflamatória à cobertura/inseminação era devida à contaminação bacteriana do útero no momento da inseminação. Hoje sabe-se que são os próprios espermatozóides e não as bactérias que são responsáveis pela reposta inflamatória aguda no útero equino após a inseminação. O plasma seminal também está envolvido na resposta inflamatória (Pycocock, 2008).

As primeiras células inflamatórias a chegar ao útero são os neutrófilos (PMN), observados no útero dentro de trinta minutos após a inseminação (Katila 1995). O útero equino produz fluido que tem propriedades quimiotácticas para os PMN (Allen & Pycocock, 1988). O complemento parece ser o elemento crucial que serve como um quimotáctico para os PMN, embora outros produtos do complemento também possam servir de quimotácticos (Allen *et al.*, 1988 e Pycocock & Allen, 1990). Hoje acredita-se que os espermatozóides iniciam a quimotaxia dos PMN através da activação do complemento (Troedsson, 1995). Isto sugere que a inflamação uterina que ocorre após inseminação é fisiológica e serve para limpar o útero do excesso de espermatozóides, plasma seminal e contaminantes associados à inseminação. Os espermatozóides danificados podem ser fagocitados mais rapidamente pelos PMN. Em éguas normais a inflamação tem o seu pico às 10-12 h e diminui dentro de 24-36 h após inseminação.

Na maioria das éguas esta endometrite transitória resolve-se espontaneamente dentro de 24-72 h de modo a que o ambiente do lúmen uterino seja compatível com a vida embrionária e fetal. É importante não ver esta endometrite como uma situação patológica. É pelo contrário uma resposta fisiológica para eliminar o excesso espermatozóides, plasma seminal e detritos inflamatórios do útero antes que o embrião desça do oviducto até ao lúmen uterino

5,5 dias após a fertilização. Contudo, se a endometrite persiste depois do dia 4 ou 5 do diestro, além de ser incompatível com a sobrevivência do embrião, a libertação prematura de PGF2 $\alpha$  resulta na luteólise e numa rápida redução da progesterona e no retorno precoce ao estro. Estas éguas são denominadas de susceptíveis e desenvolvem uma endometrite persistente (Allen *et al.*, 1988). De um modo geral a resistência reduzida à endometrite está associada com a idade avançada e a multiparidade. A susceptibilidade à endometrite não é um estado absoluto uma vez que a falha nos mecanismos de defesa apenas precisam de abrandar o processo da eliminação da infecção. Na prática observa-se uma grande variedade de susceptibilidade a endometrites e não se pode pensar em classificar imediatamente as éguas em resistentes ou susceptíveis (Pycock, Paccamonti & Jonker, 1997). Estudos sobre imunoglobulinas, opsoninas e a capacidade funcional dos PMN no útero de éguas susceptíveis não confirmaram a presença de uma resposta imunitária deficiente. Evans *et al.* (1986) sugeriram primeiro que a drenagem física reduzida pode contribuir para uma susceptibilidade aumentada a infecções uterinas. Sabe-se agora que a capacidade física do útero de eliminar bactérias, detritos inflamatórios e fluido é o factor crítico na defesa uterina. É uma conclusão lógica que qualquer falha nesta função, ou seja contractibilidade miométrica deficiente, resulte numa égua com susceptibilidade a endometrite persistente (Troedsson & Liu 1991; Troedsson, Liu & Ing, 1993 e LeBlanc, Neuwirth, Mauragis, Klapstein & Tran, 1994). A razão pela qual as éguas susceptíveis têm esta contractibilidade deficiente não é conhecida. Foi sugerido que a regulação da contracção muscular pelo sistema nervoso pudesse ser deficiente (Liu, Rakestraw & Coit, 1997). A acumulação de fluido resultante poder ser devida a uma falha de drenagem através do cérvix ou a uma reabsorção reduzida pelos vasos linfáticos. A drenagem linfática pode desempenhar um papel importante na persistência de inflamação pós inseminação/cobrição e as *lacunae* linfáticas são um achado comum nas biopsias endometriais de éguas susceptíveis à endometrite (Kenney, 1978; LeBlanc, Johnson & Calderwood Mays, 1995).

Esta interacção entre o útero e a dose inseminante pode ser influenciada por vários factores: volume da dose inseminante, concentração da dose inseminante, diluidor do sémen, número de espermatozóides mortos e plasma seminal.

Kotailen *et al.* (1994) mostrou que a intensidade da reacção dependia da concentração e /ou do volume da dose inseminante: o sémen concentrado como por exemplo o sémen congelado induzia uma reacção inflamatória mais forte no útero do que o sémen fresco ou refrigerado. Num trabalho realizado por Nikolopoulos e Watson (1997) revelou que o número de PMN uterinos era maior quando se inseminava com menos espermatozóides. Contudo, uma vez que os volumes usados neste mesmo estudo eram maiores, um número significativo da dose inseminante pode-se ter perdido através do refluxo cervical. Mais ainda, as éguas não foram sujeitas a amostragem de PMN até às 48 h após a inseminação e é

provável que a reacção inflamatória já tivesse atingido o seu pico nesta altura (Allen *et al.*, 1988 e Pycock *et al.*, 1990).

Desde que a concentração do sémen seja superior a  $25 \times 10^6$  espermatozóides/ml, o volume da dose inseminante por si não é um problema. O sémen não deve ser diluído em excesso resultando em baixas concentrações de espermatozóides. Nestes casos, o refluxo cervical que se segue à inseminação de um grande volume pode reduzir significativamente a fertilidade.

### **3.3. Factores que contribuem para o sucesso da inseminação**

#### **3.3.1. Éguas candidatas**

No passado, a fertilidade inerente aos oócitos da égua tendia a ser ignorada quando se previa a fertilidade relativa a uma possível cobertura. Em vez disso, o aparelho reprodutor da égua era o foco de toda a investigação. Contudo, em anos mais recentes, os investigadores observaram que a idade e a paridade de uma égua tinham um efeito profundo na sua fertilidade, não só devido a alterações associadas à idade demonstradas nas biopsias uterinas mas também devido à pior qualidade e menor número de oócitos viáveis, e com isso a produção de um menor número de embriões e com uma qualidade mais fraca (Metcalf, 2000). Carnevale e colegas (1994) observaram que éguas com mais de dez anos produziam embriões de pior qualidade do que éguas mais novas. Mais ainda, Brinsko e colegas (1994) verificaram que nas éguas mais velhas, a recuperação de embriões de dois dias tinha tanto sucesso como nas éguas mais jovens, mas a qualidade dos embriões era pior nas éguas mais velhas. Por isso, mesmo quando ocorre uma fertilização com sucesso, para além do facto de os gâmetas sofrerem uma redução de fertilidade associada à idade também a patologia do oviducto e ovário secundárias ao envelhecimento podem afectar a fertilidade da égua.

Na prática clínica as éguas são geralmente subdivididas em três categorias: virgens (éguas que nunca pariram), paridas (éguas com poldro) e vazias ou alfeiras. A categoria das alfeiras inclui os animais que na época reprodutiva anterior não ficaram gestantes ou que não conseguiram manter a gestação.

A idade e a história reprodutiva são provavelmente as informações mais importantes que o médico veterinário deve ter em conta quando examina uma égua. As éguas velhas e virgens podem ser um problema e pode ser considerado um síndrome porque a maioria delas tendem a acumular fluido uterino durante o estro, têm grande dilatação glandular, têm frequentemente folículos hemorrágicos anovulatórios e apresentam um cérvix que não consegue relaxar devido a alterações fibróticas ou por vezes a aderências. Éguas com 10-

15 anos começam a ter uma redução na sua potencial fertilidade e devem por isso ser consideradas potenciais candidatas a inseminação repetida.

Para escolher as éguas candidatas apropriadas de modo a maximizar uma inseminação artificial com sucesso, deve ser feito um exame reprodutivo completo. Este exame consiste não só na história reprodutiva mas também no seu estado hígido actual, reprodutivo e geral. As éguas com melhor condição corporal mais facilmente ficam gestantes e levam a gestação a termo. As éguas com má condição corporal podem ser sobrecarregadas secundariamente com uma má conformação perineal (figura 5) e por isso ficar mais predispostas a condições que podem causar subfertilidade.

Figura 5 – Má conformação perineal



Outros testes que fazem parte de um exame reprodutivo de rotina incluem um exame vaginal e cervical, manual e com espéculo; um exame manual e transrectal do aparelho reprodutor; citologia e cultura endometrial e uma biopsia endometrial. Os resultados destes testes podem eliminar possíveis candidatas para a reprodução (Metcalf, 2000).

A biopsia é primeiramente usada como um meio diagnóstico de doença uterina e como um indicador do prognóstico da capacidade de uma égua levar uma gestação a termo. As indicações primárias para colheita de uma biopsia endometrial incluem éguas alfeiras (ou não gestantes), éguas com problemas de reprodução e éguas com história de perda gestacional e também como parte de um exame em acto de compra de uma potencial égua reprodutora. As amostras podem ser colhidas antes do início da época reprodutiva, durante a época reprodutiva ou no fim desta. É imprescindível que seja primeiro avaliado se a égua está ou não gestante, já que a colheita da biopsia a uma égua gestante irá quase certamente provocar o aborto. A biopsia pode ser colhida em qualquer fase do ciclo éstrico, embora alguns médicos veterinários preferam fazê-lo no início do estro e outros no diestro. As amostras de biopsias endometriais são examinadas quanto à presença de alterações inflamatórias e degenerativas. A inflamação é identificada pela acumulação de células inflamatórias no tecido endometrial. A inflamação aguda é identificada pela presença de neutrófilos polimorfonucleares (PMN). A inflamação crónica é caracterizada pela presença



de linfócitos e outras células mononucleares no endométrio. A inflamação pode ser de origem infecciosa ou não, mas é uma situação patológica potencialmente tratável. A degeneração do endométrio ocorre quando está presente a deposição de fibrose ou de tecido de cicatrização à volta das glândulas endometriais e também na camada sub-epitelial, que frequentemente formam os ninhos glandulares. Ao contrário da inflamação, a fibrose representa uma situação patológica permanente e não tratável. Os resultados de um exame de biopsia uterina representam um modo objectivo de prever as taxas de fertilidade. O endométrio é classificado histologicamente numa escala baseada nas características da biopsia e vai de grau I a III (Kenney, 1978). O endométrio de grau I é essencialmente normal com inflamação e fibrose mínimas e o endométrio de grau III inclui alterações inflamatórias e /ou fibróticas severas.

Posteriormente Kenney e Doig (1986) estabeleceram um sistema de classificação de biopsias em quatro categorias baseado nas características histopatológicas da biopsia (Tabela 2.).

Tabela 2. Classificação do grau de endometrite adaptada de Kenney e Doig (1986).

GRAU	ÚTERO
I	Endométrio normal ou com inflamação ligeira/focal ou fibrose
II A	Inflamação ligeira a moderada e /ou fibrose multifocal (1-3 camadas de fibroblastos à volta das glândulas ou < 2 nichos fibróticos/ 5mm de campo linear)
II B	Inflamação moderada e/ou fibrose multifocal-difusa (com 4 ou mais camadas de fibroblastos à volta das glândulas ou 2-4 nichos fibróticos por campo linear)
III	Inflamação severa e/ou fibrose difusa (com 5 ou mais nichos fibróticos)

A taxa de parição esperada para biopsias da categoria I é de 80-90%; categoria II a é de 50-80%; categoria II b é de 10-50% e categoria III de 10%. Ricketts e Alonso (1991), que também classificaram as biopsias em quatro categorias, descobriram maior fiabilidade a prever taxas de gestação quando se tinha em conta a capacidade da égua a responder a tratamentos uterinos específicos. Eles sugeriram que se fizessem duas biopsias uterinas, uma antes e outra depois do tratamento, a previsão da taxa de gestação era mais fiável do que quando se fazia apenas uma biopsia.

### 3.3.2. Fertilidade do sémen

A fertilidade do sémen é melhor avaliada e prevista através do exame das taxas de gestação por ciclo. Contudo, devido ao facto de estes dados nem sempre estarem disponíveis, muitos investigadores tem estudado outros meios de prever a fertilidade do ganhão (Metcalf, 2000). Assumindo que existe um maneio apropriado do sémen, os testes “*in vitro*” tais como a análise de mobilidade assistida por computador (sistema CASA) (Graham, 1996; Jasko, Little & Lein, 1992; Kenney, Everson, Garcia & Love, 1995, Meyers, 1996 e Wilhelm, Graham & Squires, 1996), avaliação da morfologia dos espermatozóides (Graham, 1996, Jasko *et al.*, 1992; Kenney *et al.*, 1995; Meyers, Liu & Overstreet, 1996 e Jasko, Lein & Foote, 1990) análise por citometria de fluxo (Graham *et al.*, 1996; Kenney *et al.*, 1995; Wilhelm *et al.*, 1996, Ley *et al.*, 1991 e Love & Kenney, 1994), teste de penetração de oócitos (Nie, Brenden & Momont, 1995), teste de anticorpos anti-espermatozoides (Nie *et al.*, 1995) e co-cultura de oviducto (Ellington, Samper & Metcalf, 1998) representam meios bem documentados de examinar certas características do sémen, fresco e congelado e descongelado e a sua relação com a fertilidade. Num determinado número de estudos recentes, a mobilidade do sémen foi muito menos correlacionada com as taxas de gestação do que com os outros parâmetros enunciados anteriormente (Wilhelm *et al.*, 1996; Samper, Hellander & Crabo, 1991 e Vidament *et al.*, 1997). Contudo, existem limitações destes testes visto que muitas vezes apenas medem um dos muitos critérios necessários para que o espermatozóide fertilize o óvulo. Por esta razão é improvável que apenas um teste consiga prever a fertilidade de um ganhão. Além do mais todos estes testes são dispendiosos e exigem perícia laboratorial e por isso não estão ao alcance do médico veterinário na sua clínica diária (Metcalf, 2000).

### 3.3.3. Perícia do inseminador e previsão da ovulação

A coordenação da ovulação é fundamental. Embora o acto da inseminação seja um procedimento relativamente simples, o momento preciso da inseminação e os eventos que se seguem a esta requerem um médico veterinário com experiência e prática.

A fragilidade dos espermatozóides não pode ser descurada mesmo quando o sémen é devidamente diluído com nutrientes e crioprotectores (Metcalf, 2000).

A familiaridade com a manipulação do ciclo éstrico é fundamental bem como a experiência do médico veterinário na indução apropriada da ovulação. Num estudo onde foram examinados os indicadores ecográficos fiáveis para detectar o momento da ovulação o aumento da ecogenicidade da parede folicular e o aparecimento de partículas ecogénicas dentro do fluido folicular foram os parâmetros mais indicativos de ovulação dentro das 24 h seguintes (Gastal, Gastal & Ginther, 1998). Samper (1997) reportou ainda que a redução no

grau de edema endometrial associado ao estro indica ovulação eminente. É frequentemente vantajoso administrar um agente indutor que encurte o intervalo até à ovulação e permita uma previsão mais precisa do momento da ovulação (McKinnon & Squires, 1998). É necessário a presença de três critérios para que os agentes indutores da ovulação, tais como a hCG ou a deslorelina serem eficazes: 1 - o folículo dominante da égua ter mais de 35 mm de diâmetro, 2 - a consistência do folículo estar a diminuir e 3 - as pregas endometriais estarem presentes e visíveis à ecografia transrectal (Samper, 1997). Quando estes três critérios estão presentes, a administração de 1500-5000 UI de hCG endovenosa ou intramuscular, provoca a ovulação dentro de 36 h em média (McKinnon, 1997). A deslorelina, um agonista sintético da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), concebido na forma de um implante, nas mesmas condições, induz a ovulação nas éguas em média após 41-48 h (McKinnon, Perriam, Lescus, Walker & Vasey, 1997 e Meyers, Wolfgang & Trigg, 1994).

Samper (1997) reportou que 98% das éguas com edema endometrial máximo a quem se administrou hCG ou deslorelina ovularam consistentemente dentro de 48 h após a administração de hCG.

Éguas que não ficam gestantes ou que funcionam como dadoras de vários embriões durante uma única época de reprodução podem responder de um modo mais fiável e favorável à deslorelina porque existe a suspeita que as éguas possam desenvolver anticorpos contra a hCG com o seu uso continuado (Roser, Kiefer, Evans, Neely & Pacheco, 1979 e Duchamp, Bour, Combornous & Palmer, 1987). A deslorelina não se torna menos eficaz com o uso repetido e pode também ser benéfico nas éguas em anestro de transição ao encurtar o intervalo até à ovulação (Mumford *et al.*, 1995). Contudo é mais dispendiosa do que a hCG e isso pode limitar o seu uso.

A importância de examinar uma égua após a inseminação não se prende só com o facto de servir para documentar a ovulação mas também para avaliar a retenção de fluido intraluminal. A endometrite induzida pela cobrição/inseminação é hoje considerada como uma reacção fisiológica (Kottilainen, Huhtinen & Katila, 1994 e Troedsson *et al.*, 1995) induzida primeiramente pelos próprios espermatozóides e não pelos componentes plasmáticos dos mesmos ou pelo seu diluidor (Nikolakopoulos & Watson, 1997). Uma égua resistente à endometrite tem a capacidade de reagir e eliminar a inflamação do lúmen do seu aparelho reprodutor. Uma égua susceptível não tem essa capacidade e pode necessitar de intervenção veterinária (Troedsson *et al.*, 1993 e LeBlanc *et al.*, 1994). A lavagem uterina com solução salina aquecida (37°C a 42°C) que é administrada até o liquido recuperado sair límpido tem-se provado muito benéfica, especialmente quando associada à administração de pequenas doses de ocitocina no fim da lavagem (LeBlanc *et al.*, 1994). A terapia com prostaglandinas sintéticas também pode ser igualmente benéfica na evacuação uterina e

numa drenagem linfática aumentada pois tem um efeito mais prolongado na actividade miométrica uterina do que a ocitocina (Combs, LeBlanc, Neuwirth & Tran, 1996).

### **3.4. Inseminação artificial com sémen fresco ou refrigerado**

O sémen fresco, quer seja diluído para uso imediato ou para transporte para outros locais e utilizado no dia seguinte, pode resultar em taxas de gestação aceitáveis (Householder, Pickett, Voss & Olar, 1981 e Jasko *et al.*, 1992). De facto, em alguns casos, a inseminação artificial aumenta não só a fertilidade potencial da égua mas também a do garanhão (Metcalf, 2000).

O modo como o sémen é processado depende do seu uso final. O sémen que é utilizado a fresco no local da colheita ou o sémen que vai ser transportado, refrigerado ou congelado, deve ser processado de modos diferentes de maneira a preservar a sua fertilidade potencial (Samper, 2000). O sémen fresco usado logo após a colheita deve ser diluído com um diluidor adequado. Se o sémen for utilizado num intervalo de seis horas após a colheita, a adição de um diluidor aquecido numa proporção de 1:1 ou 1:2 e a manutenção à temperatura ambiente (20°C), deverá ser suficiente para manter a motilidade a fertilidade do sémen. Por outro lado, o sémen que irá ser mantido na sua forma líquida e utilizado no local de colheita ou transportado e inseminado 12-48 h após a colheita, deve ser diluído em maiores proporções. Deve depois ser arrefecido lentamente (0.3 °C/minuto) até 5°-8°C de modo a reduzir a actividade metabólica do sémen (Samper, 2000).

As taxas de concepção no primeiro ciclo tendem a ser mais baixas com sémen refrigerado do que com a cobertura natural ou com sémen fresco utilizado imediatamente a seguir à sua colheita (LeBlanc, 2005). Também o maneio da inseminação com sémen refrigerado é mais intensivo e dispendioso. As éguas necessitam ser examinadas diariamente durante o período de cio e inseminadas no período de 24 h da ovulação. As taxas de gestação são mais elevadas quando as éguas são inseminadas nas 24 h que precedem a ovulação, utilizando sémen de elevada fertilidade (LeBlanc, 2005).

Antes do sémen ser encomendado, a égua deve ser monitorizada ecograficamente para confirmar que está a ciclar e a ovular normalmente. O responsável pelo garanhão deve ser notificado no primeiro dia de cio da égua. Depois, a égua deve ser examinada frequentemente durante o cio para se poder avisar o responsável pelo garanhão com pelo menos 24 h de antecedência, do momento da inseminação. As éguas devem ser inseminadas em função da ovulação eminente e não diariamente a partir do primeiro dia de cio. A maioria das éguas com actividade cíclica normal podem ser inseminadas apenas com uma ou duas doses de sémen por ciclo, se forem examinadas frequentemente. A recepção e a inseminação de sémen refrigerado é um procedimento simples e não requer equipamento dispendioso para manusear o sémen. Após a chegada do contentor com o

sémen refrigerado, e antes de o abrir, a égua deve ser preparada para ser inseminada. Deve-se então abrir o recipiente onde veio o sémen, que pode ser um frasco ou uma seringa já preparada, e agitar ligeiramente. Deve-se colocar uma gota num tubo de ensaio limpo e aquecer a 37°C em banho-maria (5-10 min.) para avaliar a mobilidade dos espermatozóides. A seringa é então conectada ao cateter de inseminação, que é introduzido na vagina e cérvix da égua de modo a chegar ao útero. O sémen é então empurrado para o lúmen uterino. Não é necessário aquecer o sémen antes da inseminação e o manuseamento do sémen pode ser realizado a temperatura ambiente (Barbacini & Loomis, 2007).

A qualidade do sémen é um factor fundamental: garanhões com baixa fertilidade geralmente têm taxas de concepção muito mais baixas do que aqueles com fertilidade inerente elevada. O manuseamento do sémen é também um factor crítico, pois a sua incorrecta preparação e maneo podem comprometer as taxas de gestação (LeBlanc, 2005).

As taxas de gestação com sémen refrigerado são superiores quando comparadas com o sémen congelado (Barbacini & Loomis, 2007). Jasko *et al.* (1992) reportou uma taxa de gestação por ciclo de 65% e de 56% para sémen refrigerado e congelado, respectivamente. As éguas neste estudo tinham sido inseminadas com sémen dos mesmos garanhões e realizadas por técnicos especializados. Também Loomis (2001) reportou uma taxa de gestação por ciclo semelhante para éguas inseminadas com sémen refrigerado (59%) e congelado (51%) em condições de clínica privada.

Existem padrões a que o sémen deve obedecer para ser considerado de qualidade adequada. Uma dose de sémen deve conter um mínimo de  $500 \times 10^6$  espermatozóides com mobilidade progressiva e pelo menos 30% do sémen ser progressivamente móvel (LeBlanc, 2005).

É de um modo geral aceite que uma dose inseminante com um mínimo de  $500 \times 10^6$  espermatozóides com mobilidade progressiva, inseminada cada 48 h até ao fim do estro maximiza a taxa de gestação (Householder, Pickett, Voss & Olar, 1981). Contudo esta dose pode variar e por exemplo no “Haras Nationaux” em França uma dose convencional de sémen fresco contém  $200 \times 10^6$  espermatozóides totais (Daels, 2003).

Embora não se saiba a razão, alguns garanhões com aparente fertilidade superior podem ter taxas de gestação máximas com uma dose muito inferior. Em touros, denDaas (1992) demonstrou que a dose de espermatozóides para atingir taxas de gestação máximas é dependente do macho. Da mesma forma as exigências para uma dose inseminante mínima no cavalo podem ser dependentes do garanhão.

A concentração do sémen diluído, e não o volume de inseminação, parece ter efeito nas taxas de gestação. Jasko e colegas (1992) demonstraram que a diluição do sémen para uma concentração final de  $25-50 \times 10^6$  espermatozoides móveis/ ml de sémen diluído resulta em taxas de gestação máximas. Bedford e Hinrichs (1994) demonstraram que em éguas

póneis, grandes volumes de sémen não têm efeitos deletérios nas taxas de gestação quando a inseminação é feita numa concentração apropriada.

A frequência da inseminação e a sua relação com a taxa de gestação tem sido debatida por muitos anos. É prudente inseminar uma égua susceptível apenas uma vez para evitar a introdução repetida da dose inseminante no seu útero. Contudo, quando se inseminam éguas suspeitas de terem fertilidade reduzida ou quando se utilizam garanhões subfértéis, as inseminações repetidas podem garantir a disponibilidade de números adequados de espermatozoides nos locais de deposição no oviducto, para fertilização (Metcalf, 2000).

A proximidade da inseminação com a ovulação e as taxas de gestação resultantes têm sido muito investigadas. Em alguns estudos, a inseminação antes da ovulação com sémen fresco ou refrigerado resulta em melhores taxas de gestação ou de recuperação de embriões do que a inseminação após a ovulação, desde que a égua tenha sido inseminada no intervalo de 0 h-48 h que precede a ovulação (Metcalf, 2000). Huhtinen e colegas (1996) reportaram uma diferença significativa na recuperação de embriões em éguas inseminadas com sémen fresco antes ou depois da ovulação, e descobriram que estas taxas diminuíam à medida que o intervalo entre a ovulação e inseminação pós ovulatória ultrapassava 8 h a 32 h da ovulação. Mesmo quando a inseminação após ovulação resulta em gestação a vesícula embrionária tende a ser mais pequena do que as descritas para inseminação pré ovulatória (Woods *et al.*, 1990; Huhtinen, Koskinen, Skidmore & Allen, 1996 e Belling, 1984) e é mais provável que sofra morte embrionária precoce entre os 15-20 dias de gestação (Woods *et al.*, 1990). A perda embrionária precoce em éguas inseminadas após a ovulação pode ser devido a incapacidade dos embriões mais pequenos de produzirem prostaglandina-E<sub>2</sub>, que por sua vez facilita o movimento do embrião pelo oviducto (Huhtinen *et al.*, 1996 e Weber, Freeman, Vanderwall & Woods, 1991).

Presumivelmente o oócito ovulado é viável apenas por um período de 12 h ou menos (Ginther, 1992). Se o sémen capacitado tem que estar disponível durante este período crítico, o uso de heparina para induzir a capacitação dos espermatozoides pode melhorar as taxas de gestação nas inseminações pós ovulação. Baranska e Tischner (1995) reportaram que o útero da égua é capaz de capacitar os espermatozoides do garanhão. A heparina, um glicosaminoglicano, é também capaz de induzir a capacitação do sémen do garanhão (Varner, 1995) e pode ser benéfico em éguas inseminadas após a ovulação ou em garanhões subfértéis cujo sémen não consegue sobreviver ao tempo óptimo de incubação intrauterino necessário à capacitação. Fleet e colaboradores (1995) reportaram taxas de gestação significativamente maiores em éguas inseminadas após a ovulação (0-12 h ou 12-24h) se o sémen fosse tratado com heparina (75% sémen heparinizado vs 31% sémen não heparinizado). Contudo, este aumento significativo na taxa de gestação foi encontrado apenas no grupo de éguas inseminadas dentro de 0-12 h da ovulação (denHaas, 1992). Por isso, pode ser possível encurtar o intervalo entre a inseminação e a capacitação do sémen

com o uso de heparina e, com isso melhorar a taxa de gestação nas inseminações pós ovulatórias com o sémen de alguns garanhões (Combs *et al.*, 1996 e Householder *et al.*, 1981).

### **3.5. Inseminação artificial com sémen congelado**

O uso de sémen congelado na indústria equina cresceu rapidamente em popularidade nos últimos vinte anos. A primeira gestação obtida com o uso de sémen congelado na espécie equina ocorreu em 1957 (Barker & Gandier, 1957) e foi conseguida usando sémen do epidídimo. Contudo, durante muitos anos esta tecnologia reprodutiva atingiu um progresso limitado no cavalo quando comparado com outras espécies. Isto foi devido ao facto de que por um grande período de tempo apenas algumas raças equinas permitiam o uso de sémen congelado e por isso o interesse económico e os recursos nunca foram atribuídos para se melhorar esta técnica. Hoje quase todas as raças permitem o uso desta técnica reprodutiva e isso levou ao encorajamento dos investigadores para melhorarem a técnica de congelação e a elaborarem protocolos de inseminação mais simples. Isto resultou num aumento da fertilidade com sémen congelado o que por si levou a um maior uso da técnica pelos criadores. Mais ainda, alguns estudos publicados nos últimos anos (Loomis, 1999; Vidament, 2005; Loomis & Graham, 2008) demonstraram claramente que o desenvolvimento de técnicas melhoradas para a congelação de sémen equino permitiu uma maior percentagem (85-90%) de garanhões capazes de produzir sémen com qualidade comercial pós descongelação aceitável.

Os proprietários das éguas podem assim escolher um garanhão em qualquer país do mundo e também os proprietários dos garanhões podem beneficiar mais éguas sem que isso altere o calendário do seu garanhão (Samper, 2000).

Existem muitas vantagens na utilização de sémen congelado e incluem (a) menor custo de transporte de um contentor, (b) disponibilidade continua do sémen, (c) melhor “timing” da inseminação, (d) menor risco de transmissão de doenças venéreas quando os garanhões são testados adequadamente, e (e) aumento da diversidade genética. Contudo, existem também algumas desvantagens que incluem (a) taxas de gestação menores com alguns garanhões, (b) maior custo para o proprietário da égua, (c) trabalho mais laborioso, (d) risco de transmissão de doenças se os garanhões não forem testados, e (e) ausência de protocolos convencionais para a inseminação de éguas com sémen congelado (Samper, 2000).

Está bem documentado que são necessários  $500 \times 10^6$  espermatozóides com mobilidade progressiva para taxas óptimas de gestação quando se usa sémen fresco (Householder *et al.*, 1981) mas a dose inseminante mínima para otimizar as taxas de gestação com sémen congelado é desconhecida, e mais uma vez, pode ser dependente do garanhão.

Quando se utiliza sémen congelado uma dose convencional representa  $400 \times 10^6$  espermatozóides totais com uma mobilidade pós descongelação maior que 35%. Usando o sistema Francês, o sémen é acondicionado em palhinhas de 0.5 ml numa concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozóides /ml ( $50 \times 10^6$  espermatozóides / palhinha) e por isso uma dose inseminante representa 8 palhinhas contendo  $50 \times 10^6$  espermatozóides cada. Nos E.U.A. uma dose inseminante é constituída por  $800 \times 10^6$  espermatozóides quando se usa sémen congelado (Daels, 2003).

A inseminação com doses de  $150-350 \times 10^6$  espermatozóides com mobilidade progressiva (pós descongelação), efectuada perto da ovulação, resultou em taxas de gestação aceitáveis (Vidament *et al.*, 1997 e Leipold *et al.*, 1998). Maiores concentrações de espermatozóides congelados ( $800 \times 10^6$  espermatozoides totais / 0.5 ml) podem aumentar a fertilidade de alguns garanhões (Leipold *et al.*, 1998). Doses inferiores a esta podem comprometer a fertilidade, mas existem muitos factores para além do número de espermatozóides móveis envolvidos na fertilidade do sémen congelado. Como já discutido anteriormente, as alterações causadas pelo processo de congelação e descongelação, afectam os parâmetros de sémen, desde alterações ao nível molecular da membrana plasmática do espermatozóide até alterações na estrutura do seu DNA e podem influenciar a fertilidade de um garanhão (Graham, 1996, Samper *et al.*, 1991 e Wilhelm *et al.*, 1996).

Têm sido reportadas taxas de gestação no primeiro ciclo aceitáveis desde 31% a 73%, sendo as mais altas atingidas quando éguas de fertilidade comprovada são examinadas a cada 6 h com ecografia, administrada hCG e inseminadas imediatamente antes e 6 h após a ovulação (Vidament *et al.*, 1997; Samper, Hearn, Ganheim & Curtis, 1994 e Metcalf, 1995). Tal variação nas taxas de gestação é talvez devido à selecção do animal reprodutor bem como o momento, a frequência e o número total de espermatozóides móveis na inseminação.

Com a continuação da melhoria das técnicas de congelação e dos diluidores, bem como a familiarização do inseminador com os protocolos e procedimentos, é expectável que as taxas de gestação totais continuem a aumentar. Mais ainda, a selecção cuidadosa do efectivo reprodutor pode aumentar a fertilidade da futura descendência (Metcalf, 2000).

A fertilidade com sémen congelado é mais baixa quando comparada com o sémen refrigerado na maioria das éguas devido à reduzida viabilidade dos espermatozóides congelados no aparelho genital da égua. Com experiência e maneo adequado podem-se obter taxas de gestação por ciclo de 60% e por época de 80% com sémen congelado (Metcalf, 2000).

As taxas de concepção mais elevadas são atingidas quando se utiliza uma dose inteira (convencional) de sémen congelado de garanhões com fertilidade comprovada em éguas jovens com fertilidade comprovada (LeBlanc, 2005).



Dados publicados nos últimos quinze anos mostram claramente que se podem obter excelentes taxas de gestação usando sémen equino congelado num programa comercial (Metcalf 2007). A elevada fertilidade do sémen congelado que é empiricamente observado no campo pode ser atribuída aos métodos de congelação mais sofisticados e a protocolos de inseminação mais simples desenvolvidos nos últimos anos, mas também pode ser devido à maior familiaridade dos médicos veterinários com as técnicas de descongelação, avaliação e maneo do sémen congelado. Também as taxas de gestação melhoraram porque o sémen com informação de melhor fertilidade é o que é usado preferencialmente. Contudo a maioria da informação sobre a fertilidade do sémen congelado foi colhida sob condições de campo e não a partir de estudos controlados. Idealmente para se determinar uma fertilidade mais precisa do sémen congelado equino, a experiências deveriam incluir um grande número de éguas escolhidas aleatoriamente para serem inseminadas com sémen congelado de ganhões diferentes e com diferentes números de espermatozóides progressivamente móveis e morfologicamente normais (Barbacini, 2009). Dados publicados na literatura reportaram taxas de gestação por ciclo desde 38% até 73% (Metcalf, 1995; Barbacini, Necchi & Postinger, 1999; Loomis, 2001; Samper *et al.*, 2002; Sieme, Schafer, Stout, Klug & Wabenski, 2003; Barbacini, Loomis & Squires, 2005; Vidament, 2005; Squires *et al.*, 2006 e Miller, 2008) e taxas de gestação por época desde 76% a 82% (Barbacini *et al.*, 1999; Loomis, 2001). Convém não esquecer que estes resultados podem ter sido grandemente afectados não só pela qualidade do sémen após a descongelação e pela selecção do ganhão, mas também pelas técnicas de maneo da égua e pelo critério de selecção das éguas (Barbacini, 2009).

Os médicos veterinários necessitam ser competentes não só no maneo e inseminação das éguas mas também na manipulação e avaliação do sémen congelado. Técnicas tão simples como a descongelação do sémen podem afectar a viabilidade do mesmo (Metcalf, 2000). Borg e colegas (1997) reportaram que a descongelação do sémen que foi congelado em palhinhas de 0.5 ml, a 37°C durante 30 segundos vs 75°C durante 7 segundos resultam numa percentagem de células vivas significativamente maior.

Existe uma grande variabilidade entre ganhões quanto à capacidade do seu sémen suportar a congelação e a descongelação. O sémen equino parece muito menos tolerante a este processo do que o sémen bovino. Além disso, não existe uma técnica ou fórmula única que permita congelar com sucesso todo o sémen equino. A tolerância ao processo de congelação e descongelação pode mostrar alguma variação num mesmo ganhão para diferentes ejaculados e em diferentes alturas do ano (Mennick, 1991). Alguns investigadores acreditam que o sémen de alguns ganhões congela melhor do que outros com alguns diluidores de congelação (Mennick, 1991), enquanto que outros investigadores têm demonstrado que nos ganhões cujo sémen congela bem, a escolha do diluidor de

congelação tem pouco efeito na qualidade do sémen pós descongelação ou nas taxas de gestação (Samper *et al.*, 1994).

Suspeita-se que o sémen congelado não mantém a sua viabilidade dentro da égua por tanto tempo como o sémen fresco ou refrigerado. Este efeito tem sido demonstrado em culturas (Dobrinski, Thomas & Ball, 1995) e também pelo menor número de espermatozóides que se encontram no oviducto após a inseminação com sémen congelado (Bader, 1982). Ellington e colegas (1993) sugeriram que o sémen congelado demonstra alterações como a capacitação e pode apenas ser viável por um curto período de tempo. Mais ainda, encontram-se poucos espermatozóides ligados ao oviducto da égua após a inseminação com sémen congelado (Dobrinski *et al.*, 1995). Se de facto existe um mecanismo selectivo para a capacidade de ligação dos espermatozóides dentro do oviducto e que os espermatozóides têm que estar não-capacitados, então podem ocorrer lesões irreversíveis durante o processo de congelação e descongelação que façam os espermatozóides perder esta sua capacidade de ligação (Dobrinski *et al.*, 1995). Mais uma vez este fenómeno pode ser dependente do ganhão. Por isso pode ser necessário inseminar mais próximo do momento da ovulação e mais frequentemente, como foi sugerido por Vidament e colegas (1997) quando se insemina com sémen congelado.

O sémen de alguns ganhões pode parecer que congela optimamente, gerando taxas de mobilidade pós descongelação superiores a 60% e, no entanto gerar poucas ou nenhuma gestação. Para outros ganhões, o maneo cuidadoso do sémen congelado com mobilidade e características duvidosas tem resultado em taxas de gestação excelentes. Para alguns ganhões as taxas de gestação no primeiro ciclo são mais baixas com sémen congelado do que com sémen fresco ou refrigerado (Metcalf, 2000). Contudo, Kloppe e colegas (1988) reportaram o resultado do seu estudo no qual não encontraram diferença significativa nas taxas de gestação entre éguas inseminadas imediatamente após a colheita com sémen diluído, sémen diluído e refrigerado por 24 h ou sémen congelado.

Nos últimos 30-40 anos a indústria das vacas de leite tem seleccionado os touros com base na sua capacidade de produzir sémen que aguente o stress dos protocolos de congelação. Este processo levou a inseminação artificial em bovinos de leite a usar no mercado apenas o sémen congelado que é produzido por touros que respondem positiva e uniformemente às técnicas convencionais de congelação de sémen. Pelo contrário a indústria equina nunca aplicou tal selecção aos ganhões reprodutores e isto resultou numa grande variedade na congelabilidade do sémen entre indivíduos. De facto muitos relatórios publicados nos últimos vinte anos mostraram que, com base na sua mobilidade pós descongelação, 20-40% da população de ganhões produz espermatozóides que não aguentam o processo de congelação (Barbacini, 2009).

Hoje a maioria dos laboratórios que congelam sémen equino está a adoptar uma técnica de dividir o ejaculado (“test freeze split ejaculate”) para determinar se um ganhão consegue

produzir sémen com mobilidade pós descongelação aceitável. Durante este procedimento o sémen de um ou mais ejaculados é dividido e processado usando protocolos que diferem no que diz respeito às técnicas de centrifugação, composição do diluidor e taxas de arrefecimento. O uso comercial desta técnica de “test freeze split ejaculate” parece levar a muito melhores resultados em termos de capacidade em aumentar a percentagem de ganhões “congeláveis” (Loomis *et al.*, 2008).

### 3.5.1. Transporte e armazenamento de sémen congelado

Os espermatozóides congelados perdem a capacidade de fertilização quando são expostos a flutuações na temperatura de armazenamento. O armazenamento indevido ou a transferência de palhinhas de um contentor de armazenamento para um contentor de transporte e de novo para outro contentor de armazenamento pode causar graves lesões se não se tiver muito cuidado para minimizar a exposição a temperaturas elevadas (Squires, 2005). O sémen congelado é geralmente transportado em contentores de azoto líquido (Figura 6). Os contentores de fase gasosa funcionam absorvendo o azoto numa espessa camada de material absorvente que rodeia a cavidade interior do contentor onde o sémen é armazenado. Este tipo de contentores devem ser correctamente carregados enchendo com azoto liquido até ao ponto de saturação do material absorvente e depois deitando fora o excesso de azoto liquido de modo a que se consiga um tempo máximo de manutenção (Barbacini, 2009).

Figura 6 – Contentor de azoto líquido



Quando se transfere o sémen congelado deve-se ter cuidado para não expor as palhinhas à temperatura ambiente quando estas são levantadas até ao colo do contentor ou quando as

transferem para outro contentor que esteja a uma distância significativa. O canister deve ser levantado ligeiramente até ao colo do contentor e depois deve-se pegar nas palhinhas individualmente ou no goblet plástico usando umas pinças hemostáticas previamente arrefecidas e depois baixar o goblet para dentro do contentor. O canister ou as palhinhas nunca devem ser levantadas para além da linha de gelo (visível a cerca de 5 cm do topo do colo do contentor) a não ser quando se tem que transferir o sémen. Enquanto se segura o sémen dentro do contentor de transporte, deve-se levantar ligeiramente um canister do contentor de armazenamento até ao colo mas nunca acima da linha de gelo. Deve-se então transferir o mais rapidamente possível as palhinhas do contentor de transporte para o canister do contentor de armazenamento e baixar devagar para dentro do azoto líquido (Barbacini, 2009).

Recomendações para o armazenamento correcto de sémen congelado:

1. Manter os contentores de azoto numa sala limpa, seca e bem ventilada.
2. Não armazenar contentores de alumínio directamente sobre chão de cimento porque provoca a deteriorização do alumínio.
3. Manter os contentores numa área que permita a sua inspecção visual diária. Um contentor que perca o seu vácuo apresenta gelo à volta do colo por fora, perde azoto rapidamente e aquece à temperatura ambiente.
4. Verificar os níveis de azoto líquido semanalmente e registar para determinar as taxas de evaporação dos contentores individuais.
5. Atestar os contentores quando o nível de líquido atinja metade da capacidade.
6. Inspeccionar o colo regularmente quanto a danos e substituir se necessário para manter um tempo de manutenção máximo (Barbacini, 2009).

### **3.5.2.Descongelação e Inseminação**

Durante o arrefecimento e a congelação o sémen sofre uma série de alterações químicas e físicas que incluem a desidratação parcial, a penetração de crioprotector nas células, a reorganização da membrana lipídica e proteica, a exposição a altas concentrações de sais e a exposição a cristais de gelo intra e intercelular. Os protocolos de criopreservação são elaborados de modo a minimizar os efeitos negativos destes stresses. A descongelação do sémen expõe as células a estes mesmos tipos de stresses mas de modo inverso. As células reidratam à medida que a água entra de volta através da membrana plasmática para equilibrar o desequilíbrio osmótico criado quando o gelo extracelular derrete. As proteínas e os lípidos da membrana plasmática reorganizam-se e os crioprotectores difundem-se para fora das células. Quando o sémen é descongelado incorrectamente, ou seja, muito rapidamente ou muito lentamente, para o protocolo de congelamento utilizado ocorre uma

redução da viabilidade do sémen e diminuição da probabilidade de se obter uma gestação (Vidament *et al.*, 1997). Todo o sémen congelado deve ser enviado com instruções detalhadas sobre o procedimento recomendado para a descongelação. Presumivelmente o laboratório que processou o sémen congelado deve saber qual o melhor protocolo para a sua descongelação. Geralmente, o sémen congelado em palhinhas de 0.5 ml é descongelado a 37°C. A duração de tempo que a palhinha é mantida a esta temperatura não é crítica desde que permaneça na incubadora de água pelo menos durante trinta segundos para permitir que o sémen descongele totalmente. É essencial um termómetro de precisão e é sempre melhor errar por defeito, ou seja, mais vale que a temperatura fique abaixo dos 37°C do que acima. O sémen descongelado morre rapidamente se mantido a 39°C ou 40°C enquanto que a 34 ou 35°C sobrevive bastante bem. Alguns laboratórios recomendam que se descongele o sémen em palhinhas de 0.5 ml a 75°C durante sete segundos. Esta técnica funciona bem para recuperar a mobilidade do sémen quando é feita correctamente mas o risco de danificar o sémen por exposição à temperatura de 75°C por mais de exactamente sete segundos é maior, especialmente em condições de campo. O número de palhinhas que constituem uma dose de inseminação única varia dependendo do laboratório de congelação e do ganhão. Geralmente, uma dose inseminante consiste em quatro ou oito palhinhas de 0.5 ml (Barbacini, 2009).

Quando se usa uma temperatura de descongelação de 37°C as palhinhas podem ser colocadas no banho-maria uma depois da outra e deixadas lá até a última palhinha ter ficado a 37°C durante 30 segundos. Então podem remover-se todas as palhinhas, secá-las e prepará-las para a inseminação. Uma vez que o sémen é descongelado e as palhinhas estão secas, o seu conteúdo pode ser esvaziado para um recipiente estéril e previamente aquecido que pode ser um tubo de centrifugação ou um tubo de vidro como por exemplo os tubos utilizados para a colheita de sangue (Venoject® simples, Silicone Coated, Terumo Europe, N.U. 3001, Leuven, Belgium). O sémen pode então ser aspirado para uma pipeta de inseminação e inseminado na égua. Embora hoje em dia a maioria dos laboratórios congele o sémen em palhinhas de 0.5 ml, algum sémen ainda é congelado em macropalhinhas de 4 ou 5 ml. Estas palhinhas são geralmente descongeladas a 50°C por 45 segundos. Com estas palhinhas é crítico que não permaneçam no banho-maria a 50°C por mais de 45 segundos para evitar danos por exposição a temperaturas elevadas (Barbacini, 2009).

### **3.5.3. Selecção de éguas para inseminação**

A taxa de gestação média por ciclo para éguas inseminadas com sémen congelado varia entre 30-60%. Contudo, não é raro ocorrerem taxas de gestação na ordem dos 10% por ciclo e por vezes por época, até 70% por ciclo. Além da grande variação das taxas de fertilidade inerentes aos ganhões, a categoria da égua é o factor principal na determinação

das taxas de gestação com sémen congelado (Samper *et al.*, 1994). Neste estudo (Samper *et al.*, 1994), as éguas foram classificadas em quatro grupos: (a) éguas virgens jovens (menos de sete anos de idade), (b) éguas virgens mais velhas (mais de oito anos de idade), (c) éguas alfeiras, e (d) éguas paridas. A taxa de gestação média por ciclo foi de 67,3%, 34%, 50.7% e 50.9%, respectivamente.

As éguas virgens jovens parecem ser as melhores candidatas para a inseminação com sémen congelado e as éguas virgens velhas as piores, como se pode observar no estudo de Samper *et al.* (1994).

Existe muita informação na indústria equina da reprodução que indica que as éguas alfeiras sejam más candidatas para a inseminação artificial com sémen congelado. Dados recolhidos ao longo de catorze anos (1994-2007) no Norte da Itália foram analisados (Barbacini, 2008). A grande maioria das éguas alfeiras que entraram neste estudo foram submetidas a um exame reprodutivo de rotina e tratadas quando necessário. A taxa de gestação por ciclo foi de 32.7% (281 em 860 ciclos) e de a taxa de gestação total foi de 66.7% (281 em 421). Os dados analisados quando se dividiu as éguas por grupos de idades mostrou que as éguas com mais de dezasseis anos tinham uma taxa de gestação por ciclo e uma taxa de gestação total significativamente mais baixa do que éguas mais novas (taxa por ciclo = 24% nas com mais de 16 anos *versus* 40% nas éguas com menos de 16 anos; taxa total = 48% nas com mais de 16 anos *versus* 71.6% nas com menos de 16 anos). Em conclusão, este estudo mostrou que o uso de sémen congelado pode levar a resultados aceitáveis quando usado em éguas alfeiras. Contudo, como era esperado, as éguas com mais de dezasseis anos mostraram uma marcada redução na fertilidade quando comparadas com éguas mais novas.

Parece também que a presença de fluido uterino após inseminação não é prejudicial à fertilidade desde que as éguas sejam tratadas com ocitocina e/ou lavagem uterina. O tratamento com ocitocina e /ou lavagem uterina parece melhorar a fertilidade (Necchi, Barbacini & Postinger, 2008).

As éguas alfeiras podem ser afectadas por problemas reprodutivos que advêm de anomalias dos genitais externos, da alteração da funcionalidade do sistema neuro-endócrino, de doenças ováricas ou uterinas ou simplesmente por anomalias relacionadas com o envelhecimento. Também, um grande número de éguas susceptíveis à acumulação de fluido após inseminação está concentrado nesta categoria reprodutiva.

#### **3.5.4. Local de inseminação e efeito do número de espermatozóides**

O número de éguas que são cobertas/inseminadas por determinados garanhões tem aumentado nos últimos anos. Com o desenvolvimento do mercado internacional do sémen congelado e com a diminuição da disponibilidade de doses inseminantes dos garanhões de

elite, cada vez mais se procuram métodos para reduzir as doses inseminantes individuais. Teoricamente, o desenvolvimento de técnicas para a inseminação com baixas doses permite que se aumente o número de éguas a inseminar, se utilizem garanhões com sémen de fraca qualidade, se dissemine o uso do sémen congelado, se use sémen sexado e também se reduza a incidência de endometrite pós-inseminação (Daels, 2003). Um elevado número de espermatozóides por inseminação limita a capacidade de explorar técnicas como a sexagem do sémen onde apenas ficam disponíveis 20 milhões ou menos de espermatozóides por inseminação (Aurich, 2006).

Para a inseminação artificial convencional uma dose inseminante contém entre 300-500 milhões de espermatozóides com mobilidade progressiva para sémen fresco e o dobro para sémen que vai ser transportado (Samper, 2005). Embora não haja uma dose padrão para o sémen congelado a fertilidade diminui quando o número total de espermatozóides com mobilidade progressiva após a descongelação é inferior a  $250 \times 10^6$ /dose. (Samper, 1999). Outros estudos mostraram que quando se deposita uma dose inseminante na ponta do corno uterino ipsilateral à ovulação 80% dos espermatozóides permanece nesse oviducto comparado com 50% quando se deposita o sémen no corpo uterino (Rigby *et al.*, 2000). Quando se deposita o sémen na papila do oviducto através do uso do endoscópio conseguem-se obter gestações com doses tão baixas como  $1 \times 10^6$  /dose (Morris, Tiplady & Allen, 2003 e Morris, Hunter & Allen, 2000).

Em vários estudos experimentais inseminaram-se éguas profundamente, tanto no corno uterino como na papila tubária (Morris *et al.*, 2000, Lindsey, Schenk, Graham, Bruemmer & Squires, 2002 e Nie, Johnson & Wenzel, 2003). Enquanto que na primeira técnica se usam pipetas flexíveis que são avançadas sob controlo rectal manual ou ecográfico até à ponta do corno uterino, a inseminação na papila tubária necessita de controlo visual através de um endoscópio flexível (inseminação histeroscópica). Obtiveram-se taxas de gestação de 50% ou mais com doses de sémen entre 1-5 milhões de espermatozóides usando a inseminação histeroscópica. A inseminação na ponta do corno uterino com uma pipeta flexível requer 5-10 milhões de espermatozóides (Morris *et al.*, 2000, Lindsey *et al.*, 2002, Brinsko *et al.*, 2003, Nie *et al.*, 2003). A inseminação guiada transrectalmente até à ponta do corno uterino é um procedimento bastante mais rápido e menos dispendioso e pode ser considerado como uma alternativa prática à inseminação histeroscópica (Aurich, 2006). Correntemente existe uma controvérsia sobre a vertente prática e os resultados da inseminação histeroscópica quando comparada com a inseminação guiada por via transrectal (Samper, 2005).

A redução da dose de inseminação ou a deposição do sémen na ponta do corno uterino pode permitir que se diminua o número de espermatozóides usados para inseminar as éguas com sémen congelado (Squires *et al.*, 2003). A inseminação uterina profunda no corno uterino guiada rectalmente com  $200 \times 10^6$  espermatozóides não aumentou, neste

estudo (Squires *et al.*, 2003), as taxas de gestação quando comparada com a inseminação no corpo uterino, com o mesmo número de espermatozóides. Esta dose inseminante foi escolhida para permitir a inseminação de uma só palhinha e para determinar se a inseminação com um pequeno número de espermatozóides congelados na ponta do corno uterino poderia aumentar as taxas de gestação quando comparado com a inseminação no corpo uterino. A taxa de recuperação de embriões foi menor para as éguas inseminadas no corno uterino ipsilateral do que para as inseminadas no corpo uterino (4 em 20, 20% *versus* 10 em 20, 50% respectivamente).

Uma vez que o sémen é depositado no corpo do útero os espermatozóides movem-se rapidamente para a junção uterotubárica ou istmo distal do oviducto (Rigby, 2000). Dos milhões de espermatozóides colocados no útero, apenas alguns milhares de espermatozóides se encontram no oviducto. Existem vários estudos que demonstram que se podem obter gestações com um número baixo de espermatozóides se estes forem colocados na junção uterotubárica (Lindsey *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2000 e Rigby, Lindsey & Brinsko, 2001). Lindsey *et al.* (2002) reportou uma maior taxa de gestação com a inseminação com videoendoscópio de  $5 \times 10^6$  espermatozóides quando comparado com a inseminação do mesmo número de espermatozóides usando a inseminação uterina profunda. Rigby *et al.* (2001) reportou taxas de gestação semelhantes para inseminação videoendoscópica *versus* inseminação uterina profunda guiada por via transrectal.

Contudo, recentemente foi reportada uma taxa de gestação mais baixa com éguas problema inseminadas na junção uterotubárica quando comparada com as que foram inseminadas no corpo uterino (Squires, 2003).

A inseminação com doses baixas de sémen fresco está associada a taxas de gestação mais baixas do que a inseminação convencional (com doses normais) (Aurich, 2006). Embora também possam ser obtidas taxas de gestação aceitáveis com sémen refrigerado (Brinsko *et al.*, 2003) e com sémen congelado (Morris 2004), a fertilidade é reduzida quando comparada com a inseminação com dose baixa de sémen fresco. A taxa de gestação de garanhões subférteis ou de garanhões com sémen de baixa qualidade após congelação e descongelação não é aumentada pela inseminação intrauterina. Aumentando simplesmente o número de espermatozóides na junção uterotubárica pela colocação da dose inseminante perto da papila do oviducto, não melhorando a qualidade do sémen, não aumenta as taxas de gestação. A inseminação com doses baixas com sémen de garanhões extremamente férteis pode ser muito útil em programas de reprodução permitindo inseminar mais éguas de um só garanhão. Contudo, a inseminação de doses baixas na papila tubária não é um tratamento veterinário para resolver problemas de fertilidade dos garanhões (Aurich, 2006).



### 3.5.5. Momento e frequência da inseminação

Um dos desafios para os que tentam congelar sémen equino é lidar com a variabilidade individual na criosobrevivência do sémen e determinar qual o número mínimo de espermatozoides com mobilidade progressiva após descongelação que é necessário para gerar uma gestação e abaixo do qual a fertilidade de um determinado garanhão baixa drasticamente. Presentemente estão disponíveis poucos dados sobre o número mínimo de espermatozoides necessários para atingir uma fertilidade óptima com sémen congelado (Pace & Sullivan, 1975; Leipold *et al.*, 1998; Lindsey *et al.*, 2001; Morris & Allen, 2002; Guvenc, Reilas & Katila, 2005) e é por isso desejável que se façam estudos controlados que incluam grandes números de garanhões de modo a fornecerem linhas de orientação precisas para a indústria equina.

Um factor limitante principal para a disseminação da aplicação do sémen congelado equino é o custo associado com o maneo intensivo das éguas que são inseminadas. É geralmente recomendado que o sémen congelado seja introduzido no aparelho reprodutor da égua nas 12 h antes ou até 6 h após a ovulação (Barbacini, 2009). A inseminação de éguas com sémen congelado para além das 6 horas após a ovulação pode levar a uma redução da fertilidade. Embora não existam dados com o uso de sémen congelado, Woods *et al.* (1990) demonstraram que atrasar a inseminação com sémen fresco mais de 8 h após a ovulação resulta numa diminuição da fertilidade. O presumível tempo de vida mais curto do sémen congelado equino no aparelho reprodutor da égua combinado com o sistema “dose sem garantia” de vender o sémen levou à prática de examinar as éguas 3-4 vezes por dia ou mais frequentemente à medida que se aproxima da ovulação e antes da inseminação com sémen congelado (Barbacini, 2009). De facto, quando se usa sémen congelado examina-se o aparelho reprodutor da égua com tanta frequência quanto necessário de modo a permitir a inseminação com uma única dose de sémen durante o período periovulatório. Isto geralmente exige que as éguas sejam levadas para uma clínica ou outras instalações que facilitem a acção do médico veterinário. O custo com o médico veterinário para o dono da égua é considerável e muitas vezes desencoraja o uso do sémen congelado. Os proprietários dos garanhões que vendem o sémen à dose por centenas ou milhares de euros ou dólares forçam os donos das éguas a usar este tipo de protocolo porque o custo com o veterinário sempre é menor do que o custo de sémen adicional necessário para inseminar uma égua mais do que uma vez por ciclo. Muitos dos proprietários dos garanhões hoje já fornecem várias doses por ciclo e apenas se lhes paga quando as éguas ficam gestantes. Nestes casos, o uso de sémen congelado é apenas um outro mecanismo de obter uma gestação (Barbacini, 2009).

Uma inseminação após a ovulação, com um total de 3-4 examinações por ciclo, pode gerar bons resultados de fertilidade. Barbacini *et al.* (1999) recolheram dados de 559 éguas

Warmblood que foram inseminadas com sémen congelado dentro de um intervalo de tempo entre as 6 h antes e 6 h após a ovulação. Obtiveram uma taxa de gestação de 43% por ciclo e de 77% no total usando o seguinte protocolo:

1. As éguas foram monitorizadas ecograficamente durante o estro cada 24 h até se detectar pelo menos um folículo com 35 mm ou mais nos ovários.
2. Administrou-se 2.000 U.I. de hCG por via endovenosa.
3. As éguas foram examinadas 12 h após a administração de hCG e depois cada 4-8 h até ocorrer a ovulação.
4. As éguas foram inseminadas com uma única dose inseminante quando o folículo estava muito próximo da ovulação ou quando se detectava uma ovulação recente.

Contudo, o uso disseminado de sémen congelado está dependente de estratégias de reprodução simplificadas. Por esta razão foi recomendado o uso de um protocolo de inseminação em tempo fixo para controlar os custos de manejo reprodutivo com as éguas inseminadas com sémen congelado (Squires *et al.*, 2003; Barbacini *et al.*, 2005). Este protocolo envolve o exame ecográfico diário durante o estro, indução da ovulação usando hCG ou deslorelina após a detecção de um folículo com diâmetro superior a 35 mm e inseminação às 24 h e às 40 h após a injeção do agente ovulatório. Usando este esquema de inseminação as éguas que ovulam 18-52 h após a administração de hCG ou deslorelina têm espermatozoides depositados no seu aparelho reprodutor dentro das 12 h antes ou 6 h após a ovulação ou ambos. Num estudo clínico efectuado em Itália (Reger *et al.*, 2003), 26 de 34 éguas ficaram gestantes (76%) após a inseminação dupla em tempo fixo *versus* 15 em 21 (71%) após uma única inseminação dentro das 6h após a ovulação. No mesmo trabalho, os autores também relataram o resultado de um estudo controlado efectuado no Colorado onde não encontraram diferença na taxa de recuperação de embriões em éguas inseminadas uma vez dentro das 6 h após a ovulação com  $800 \times 10^6$  de espermatozoides totais congelados (60%) *versus* éguas inseminadas duas vezes às 24 e 40 h após deslorelina com  $400 \times 10^6$  espermatozoides totais por inseminação (55%). Mais ainda, num estudo de campo retrospectivo que envolveu 193 ciclos éstricos, Barbacini (2005) reportou uma taxa de gestação por ciclo semelhante quando as éguas altamente seleccionadas pelo seu potencial reprodutivo, foram inseminadas às 24 e 40 h após hCG com  $400 \times 10^6$  (61%) ou  $800 \times 10^6$  (69%) de espermatozoides totais por inseminação. Estes dados dão suporte à tese que duas inseminações fixas antes e após a ovulação geram taxas de gestação comparáveis às da inseminação única após a ovulação. Sieme *et al.* (2003) reportaram que éguas inseminadas duas vezes por ciclo com intervalo de 24 h tinham uma taxa de gestação por ciclo de 50% e éguas inseminadas uma vez tinham uma taxa de gestação por ciclo de 42%. As taxas de gestação para éguas inseminadas uma vez dentro das 12 h antes da ovulação ou uma vez dentro das 12 h após a ovulação foram de 41 e 50% respectivamente.

Vidament e colegas (1997) reportaram taxas de gestação mais elevadas em éguas inseminadas mais vezes com sémen congelado; em éguas inseminadas em vários intervalos, aquelas inseminadas duas ou mais vezes por ciclo tinham taxas de gestação significativamente maiores do que aquelas inseminadas apenas uma vez (34% n= 1576 vs 26%, n= 626).

Estes resultados também foram confirmados por Samper (2001) que reportou que as taxas de gestação com sémen congelado eram mais elevadas quando as éguas eram inseminadas mais do que uma vez por ciclo. Finalmente Loomis e Squires (2005) examinaram retrospectivamente dois conjuntos de dados colhidos durante as épocas reprodutivas de 2002 e 2003 e reportaram taxas de gestação semelhantes para éguas inseminadas uma ou várias vezes num dado ciclo (51.5% *versus* 51.7% em 2002 e 47.1% *versus* 46.1 % em 2003). As éguas inseminadas duas vezes num ciclo, antes e depois da ovulação, tiveram taxas de gestação muito semelhantes às éguas inseminadas uma vez dentro das 6 h após ovulação (48.1% *versus* 47.3%). Baseado em dados publicados sobre o uso de inseminações múltiplas para a reprodução de éguas com sémen congelado, é bastante claro que um protocolo de inseminação dupla em tempo fixo permite ao clínico examinar a égua uma vez por dia durante as horas de trabalho normal sem comprometer a fertilidade (Barbacini, 2009).

Também um estudo efectuado por Squires e Barbacini (2003) relatou que o manejo reprodutivo das éguas inseminadas com sémen congelado pode ser semelhante ao utilizado para éguas inseminadas com sémen refrigerado. Neste estudo um grupo de éguas foi inseminado utilizando o protocolo de inseminação dupla em tempo fixo (24 e 40 h após hGC) com  $400 \times 10^6$  espermatozóides e outro grupo uma vez só dentro de 6 h após ovulação com  $800 \times 10^6$  espermatozóides. As taxas de gestação foram semelhantes para os dois casos.

Existem duas críticas principais ao protocolo da inseminação dupla em tempo fixo:

1. Uso de maior quantidade de sémen
2. A égua pode desenvolver uma endometrite pós inseminação maior se for inseminada duas vezes num ciclo com espermatozóides congelados (Squires *et al.*, 2003).

Contudo, o uso de inseminações múltiplas por ciclo pode não ser apropriado em todas as situações, como por exemplo, éguas que são susceptíveis a endometrite pós inseminação tais como éguas velhas ou vazias (alfeiras) (Barbacini, 2009). Estas éguas podem necessitar um manejo mais intensivo de modo a minimizar a invasão do útero susceptível. Éguas mais velhas podem também responder pior aos agentes ovulatórios tais como a hCG (Barbacini 2000) e por isso o momento da sua ovulação ser imprevisível. Também em alguns casos o sémen de certos garanhões é limitado por já terem morrido, pouca oportunidade de congelar ou pelo valor da dose inseminante.

Investigadores em França demonstraram que a fertilidade melhorava quando as éguas eram inseminadas mais do que uma vez num ciclo com sémen congelado, o que também foi confirmado por Sieme et al (2003). Metcalf (2000) reportou que a inseminação de éguas duas vezes num ciclo com sémen congelado não interferia com a fertilidade e também não aumentava a incidência de endometrite pós inseminação.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Éguas

Oito éguas Warmblood entre os três e os onze anos de idade foram inseminadas com sémen congelado. Três destas éguas eram virgens (com idades de 3, 4 e 11 anos), três eram alfeiras (com idades de 6, 10 e 11) e duas paridas com poldro (com idades de 4 e 5 anos) (tabela 3).

As éguas foram mantidas num paddock ao ar livre durante o dia e recolhidas à noite para uma box. A alimentação consistiu em 2.5 Kg/animal de ração (de uma preparação comercial especialmente formulada para éguas reprodutoras), feno e água *ad libitum*.

A todas as éguas foram sistematicamente realizadas análises uterinas citológicas e microbiológicas no início do cio e apenas foram inseminadas se o resultado fosse negativo. Foi realizada uma biopsia uterina a uma das éguas devido à sua história passada de infertilidade (égua alfeira de onze anos de idade).

A sincronização do cio foi conseguida com a administração de 0.044 mg/Kg de altrenogest (Regumate<sup>®</sup>) por via oral durante doze dias, seguida da administração de 0.01 mg/kg de prostaglandina-F<sub>2</sub>α (Dinolytic<sup>®</sup>, Pfizer Manufacturing, Belgium) por via intramuscular. O aparelho genital interno das éguas foi avaliado diariamente por via ecográfica, com ecógrafo "Sonovet 600" e sonda rectal de 7.5 MHz a partir do último dia de Regumate<sup>®</sup>. Quando se detectou um folículo dominante com diâmetro superior a 35 mm e se visualizou um padrão óbvio de edema uterino, induziu-se a ovulação com um agente indutor da ovulação – hCG (Chorulon<sup>®</sup>, Intervet International B.V., Boxmeer, Holand) na dose de 1500 U.I. por via endovenosa. As éguas foram então monitorizadas por palpação transrectal e ecograficamente cada 6h e inseminadas assim que a ovulação era detectada.

#### 2. Preparação do sémen

O sémen foi descongelado em banho-maria a 37°C durante 30-45 segundos (s), depois colocado num tubo de vidro estéril (Venoject<sup>®</sup>) e aspirado para um cateter de inseminação flexível (Minitube Pipette Catheter, Minitub<sup>®</sup>, Tiefarbach, Germany) com uma seringa de 5 ml. O cateter foi então introduzido no corno uterino ou na ponta do corpo uterino.

#### 3. Inseminação artificial

As éguas foram devidamente contidas em troncos de contenção. Procedeu-se então à preparação das éguas para a inseminação. A cauda foi protegida e levantada e a zona perineal lavada e seca.

Todas as inseminações foram realizadas pelo mesmo médico veterinário: guiando rectalmente um cateter de inseminação flexível até à ponta do corno uterino ipsilateral ao folículo recentemente ovulado ou introduzindo directamente um cateter de inseminação flexível no corpo uterino. Quatro (4) das éguas foram inseminadas no corpo uterino e quatro (4) na ponta do corno uterino, escolhidas aleatoriamente.

Foi utilizado sémen de seis garanhões diferentes. Cada uma das doses inseminantes (n=15) tinha  $200 \times 10^6$  de espermatozóides totais (4 palhinhas) previamente congelado em palhinhas de 0.5 ml (a dose inseminante para cada um dos seis garanhões foi de oito palhinhas com um total de  $400 \times 10^6$  de espermatozóides totais). Todo o sémen utilizado foi proveniente de uma empresa europeia certificada e reconhecida internacionalmente, e que foi responsável por todo o processo de avaliação, colheita e congelação do sémen.

O aparelho genital interno das éguas foi examinado por palpação transrectal e ecograficamente 18 a 24 h após a inseminação e as éguas foram tratadas com 20 U.I. de ocitocina (Ganadil Pituit<sup>®</sup>, Invesa Industrial Veterinária, S.A., Barcelona, Spain) por via intramuscular, duas vezes por dia e durante dois dias.

A gestação foi confirmada por exame ecográfico transrectal quinze dias após a ovulação e também aos 19, 23, 35 e 45 dias. As éguas foram acompanhadas ecograficamente ao longo da gestação.

#### 4. Análise estatística

Os dados relativos à taxa de gestação e ao número de inseminações por égua, para se obter uma gestação foram analisados pelo teste não paramétrico  $\chi^2$  de Yates (Statistica for Windows, StatSoft, Inc., 1995, Tulsa, OK, USA).

## IV. RESULTADOS

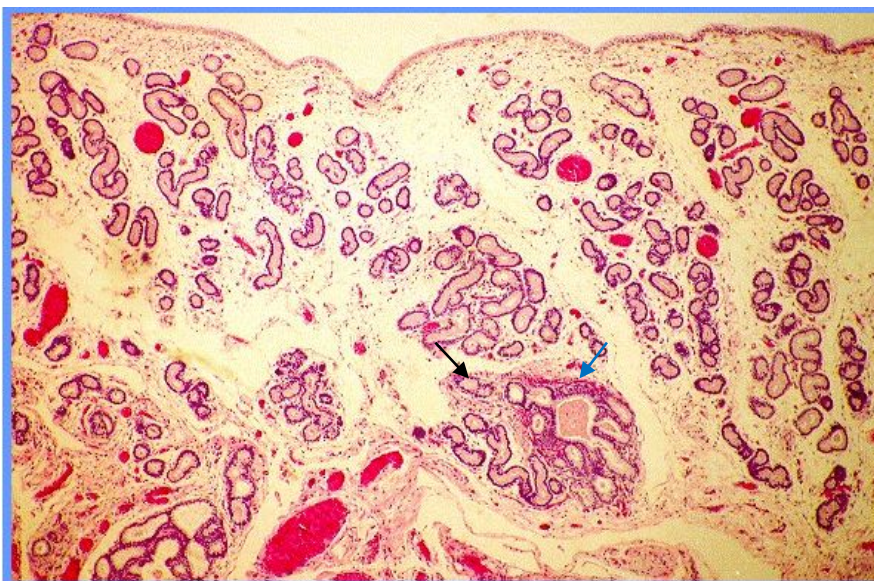
As taxas de gestação para as éguas inseminadas com  $200 \times 10^6$  espermatozóides totais no corpo uterino (3 de 4; 75%) foram semelhantes às inseminadas na ponta do corno uterino (3 de 4; 75%). A taxa de gestação total (para as oito éguas) no primeiro ciclo foi de 50% e a taxa de gestação total foi de 75% (6 de 8). O número de inseminações necessário para obter uma gestação no grupo das éguas inseminadas no corno uterino (2,66/égua) foi semelhante ao do grupo de éguas inseminadas no corpo uterino (1/égua) ( $p > 0,05$ ). Em média foram necessárias 1,83 inseminações para obter uma gestação.

Uma das éguas inseminadas no corpo uterino (égua alfeira de onze anos de idade) teve uma gestação gemelar detectada aos quinze dias; e foi submetida à redução de uma das vesículas embrionárias através do esmagamento manual por via transrectal. O número total de inseminações foi de quinze. Em média foram necessárias 1.83 inseminações para obter

uma gestação, sendo 1.0 para as éguas inseminadas no corpo uterino e 2.66 para as éguas inseminadas no corno uterino (Tabela 4). Todas as éguas pariram um poldro vivo no ano seguinte, incluindo a égua que ficou gestante de gémeos.

O resultado do exame citológico e microbiológico uterino foi negativo. A biopsia (Figura 7) realizada a uma das éguas (égua alfeira de onze anos de idade) devido ao passado de infertilidade foi classificada na categoria IIa (Kenney *et al.*, 1975).

**Figura 7** – Aspecto histopatológico de endométrio de égua tipo II, segundo classificação de Kenney (1978). Presença de “ninhos” de glândulas endometriais hipertrofiadas (seta preta), reodeadas por algumas fibras de colagénio. Observa-se ainda foco de infiltração de células inflamatórias (seta azul). Ampliação 40X.



## V. DISCUSSÃO

As taxas de gestação obtidas neste estudo foram semelhantes para éguas inseminadas com  $200 \times 10^6$  espermatozoides totais no corpo uterino e para as que foram inseminadas na ponta do corno uterino, como também já relatado por Squires *et al.* (2003). A inseminação profunda no corno uterino guiada por via transrectal não aumenta as taxas de gestação quando comparada com a inseminação no corpo uterino, com  $200 \times 10^6$  espermatozoides totais congelados (Squires *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as taxas de gestação obtidas são aceitáveis (75%) quando se usa metade da dose de inseminação convencional quando comparadas com éguas inseminadas com a dose convencional. Isto vem confirmar os estudos de Samper (2005) que diz que podem-se obter taxas de gestação aceitáveis com sêmen congelado quando se reduz o número de espermatozoides que é inseminado.

No presente estudo, as taxas de gestação e o número de inseminações necessário para obter uma gestação foram semelhantes para as éguas inseminadas no corpo uterino e na ponta do corno uterino. O número de éguas usadas neste estudo foi muito pequeno para tirar quaisquer conclusões. Apesar de não haver diferenças significativas no que diz respeito ao número de inseminações por égua, é importante explicar que no grupo das éguas inseminadas no corno uterino existia uma maior percentagem de éguas alfeiras e também uma maior média de idades (tabela 4).

As éguas não gestantes (2 de 8; 25%) foram inseminadas com sémen de garanhões diferentes entre elas (tabela 3). Os garanhões utilizados neste estudo tinham fertilidade comprovada por elevado número de gestações no passado. Uma das éguas que não ficou gestante era uma égua de quatro anos do grupo das virgens e a outra uma égua com cinco anos parida e com poldro. Esta última foi apenas inseminada uma vez devido a ser já tarde na época reprodutiva. Embora as melhores candidatas para a inseminação com sémen congelado sejam éguas novas entre os três e os oito anos virgens ou já paridas (Vidament *et al.*, 1997), neste estudo apenas as éguas destes grupos não ficaram gestantes. Todas as éguas alfeiras neste estudo ficaram gestantes, incluindo a égua de onze anos com história passada de infertilidade e que fez uma gestação gemelar.

Nos últimos anos, a inseminação com uma dose inseminante menor que a convencional tem recebido cada vez mais atenção.

As taxas de gestação com sémen congelado parecem ser significativamente mais elevadas quando as éguas são inseminadas com  $600 \times 10^6$  espermatozóides com mobilidade progressiva quando comparado com concentrações inferiores a  $600 \times 10^6$  e superiores a  $800 \times 10^6$  espermatozóides com mobilidade progressiva (Metcalf, 2005). Mais ainda, o local de inseminação (corpo uterino vs corno uterino vs papila do oviducto vs oviducto) desempenha um papel no número mínimo de espermatozóides necessários para obter taxas de gestação aceitáveis (Metcalf, 2005). O primeiro grande ensaio que comparou o efeito do número de espermatozóides e as taxas de gestação subsequentes em éguas após a inseminação histeroscópica na junção uterotubárica (Morris *et al.*, 2000) demonstrou que a inseminação de doses inseminantes com 1, 5 ou  $10 \times 10^6$  espermatozóides móveis depositadas na junção uterotubárica ipsilateral à ovulação resultou em taxas de gestação de 64%, 75% e 60% respectivamente, e que doses inseminantes tão pequenas como  $0,001 \times 10^6$  espermatozóides móveis conseguiram resultar em gestação (Morris *et al.*, 2003 e Morris *et al.*, 2000).

Embora os estudos iniciais que lidaram com técnicas de inseminação com baixa dose na égua tenham sido baseados em procedimentos guiados por endoscópio para depositar o sémen na junção uterotubárica, outros colegas usaram a técnica guiada via transrectal para dirigir um cateter de inseminação flexível até à ponta do corno uterino ipsilateral ao folículo préovulatório. Num estudo conduzido por Brinsko *et al.* (2003) as taxas de gestação após a



inseminação com  $5 \times 10^6$  espermatozóides móveis na ponta do corno uterino através do método guiado via rectal foram semelhantes às obtidas por via endoscópica. Squires e colaboradores (2002) também concluíram que o sémen de garanhões que não obtinha bons resultados com o método transrectal também tinham maus resultados com a inseminação endoscópica. No presente estudo as inseminações foram apenas realizadas com um catéter flexível, directamente no corpo uterino ou guiadas rectalmente até à ponta do corno uterino. Embora a maioria das experiências com a inseminação com baixa dose tenha consistido na deposição de sémen na ou perto da junção uterotubárica, pelo menos um estudo indica que a inseminação com doses baixas no corpo uterino também teve uma fertilidade aceitável (Morris *et al.*, 2003). Quando o sémen é depositado na ponta do corno uterino, junto da junção uterotubárica, uma maior percentagem de espermatozóides atravessa a junção uterotubárica ipsilateral ao ovário que contém o folículo dominante do que quando o sémen é depositado no corpo uterino (Rigby *et al.*, 2000). Contudo, números elevados de espermatozóides na ponta do corno uterino nem sempre resultam em maiores taxas de fertilidade, como demonstrada neste estudo (Rigby *et al.*, 2000). No presente estudo uma égua inseminada na ponta do corno uterino teve uma gestação gemelar de duas ovulações em ovários diferentes mostrando que é possível obter uma gestação inseminando no corno uterino contralateral à ovulação.

Morris *et al.* (2003) compararam as taxas de fertilidade após a inseminação com  $14 \times 10^6$  espermatozóides móveis congelados no corpo uterino através de um catéter ou na junção uterotubárica via endoscopia. As taxas de gestação obtidas com as duas técnicas foram semelhantes (Morris *et al.*, 2003). As taxas de gestação foram significativamente mais baixas quando se depositou  $3 \times 10^6$  espermatozóides móveis congelados via endoscopia no corpo uterino quando comparadas com a deposição na junção uterotubárica. O local da inseminação parece ser relevante quando se usa um número muito reduzido de espermatozóides (tal como  $5 \times 10^6$ ), o que não foi o caso do presente estudo.

Existem também efeitos do garanhão importantes no número mínimo de espermatozóides necessário para obter uma fertilidade aceitável com estas técnicas. Contudo, a capacidade de obter taxas de fertilidade aceitáveis após a deposição de  $14 \times 10^6$  espermatozóides móveis no corpo uterino oferece possibilidades interessantes para melhorar a eficácia do sémen congelado (Morris *et al.*, 2003).

## **VI. CONCLUSÃO**

Este estudo, embora com números muito reduzidos de éguas, confirma o que outros autores já publicaram; que é possível obter taxas de gestação aceitáveis com sémen congelado quando se reduz a dose inseminante convencional. Também se conclui que o local de deposição do sémen, corpo uterino ou ponta do corno uterino, usando a técnica guiada por

via transrectal, parece não fazer diferença nas taxas de gestação nem no número de inseminações para se obter uma gestação, quando se usa uma dose inseminante de  $200 \times 10^6$  espermatozoides totais, como confirmado por outros estudos.

Tabela 3. Relação da categoria das éguas, idade e local de inseminação com a taxa de gestação

Égua	Categoria	Idade	Garanhão	Nº IAS	Local de IA	Gestação
1	Virgem	3	A	1	Corpo	+
2	Virgem	4	B	3	Corno	-
3	Virgem	11	C	1	Corpo	+
4	Alfeira	6	D	1	Corpo	+
5	Alfeira	10	E	2	Corno	+
6	Alfeira	11	D	3	Corno	+
7	Parida	4	B	3	Corno	+
8	Parida	5	F	1	Corpo	-

Tabela 4. Inseminação no corpo uterino vs corno uterino

	Inseminação no Corpo Uterino	Inseminação no Corno Uterino	Total
<b>Taxa de Gestação Total</b>	3 /4	3 /4	6/8
<b>Nº de IA Totais</b>	4	11	15
<b>Nº de Ciclos por Gestação</b>	1	2.66	1.83
<b>Idade média das éguas</b>	6.2	7.2	6.75
<b>Categoria das éguas</b>	2 virgens, 1 alfeira e 1 parida	1 virgem, 2 alfeiras e 1 parida	3 virgens, 3 alfeiras e 2 paridas

## VII. BIBLIOGRAFIA

Alexander, S.L. & Irvine, C.H. (1991). Control of onset of breeding season in the mare and its artificial regulation by progesterone treatment. *Journal of Reproduction and Fertility*, 44 (Suppl.), 307-318.

Allen, W.R. & Pycocock, J.F. (1988). Cyclical accumulation of uterine fluid in mares with lowered resistance to endometritis. *Veterinary Record*, 122, 489.

Allen, W.R., Urwin, V. & Simpson, D.J. (1980). Preliminary studies on the use of an oral progestogen to induce oestrus and ovulation in seasonally anoestrous Thoroughbred mares. *Equine Veterinary Journal*, 12, 141-145.

Atayde, L.M. & Rocha, A. (2010). Selected ovarian ultrasonographic characteristics during vernal transition are useful to estimate time of first ovulation in the year. *Reproduction in Domestic Animals* [epub ahead of print].

Aurich, C. (2006). Advances in artificial insemination. In *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress of World Equine Veterinary Association (WEVA): Marrakech, Morocco, 2006*. pp. 230-234.

Bader, H. (1982). An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, 32 (Suppl), 59-64.

Ball, B.A. (2004). Hysteroscopic and low-dose insemination techniques in the horse. In *Recent Advances in Equine Reproduction*, Ball, B.A. (Ed.). Ithaca, NY: International Veterinary Information Service, Acedido em [www.ivis.org](http://www.ivis.org)

Baranska, K. & Tischner, M. (1995). Evaluating capacitation of stallion spermatozoa obtained from the mare's reproductive tract. *Biology of Reproduction*, VI (1), 707-712.

Barbacini, S. (2000). Management of mares for frozen semen. In *Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*, pp. 308.

Barbacini, S. & Loomis, P. (2007). Artificial insemination (AI) using cooled and frozen semen. In *Proceedings of the BEVA Equine Stud Medicine Course, UK, January 2007*, pp. 47-48.

Barbacini, S., Necchi, D., Postinger, G., Parmeggiani, F. & Suires, E.L. (2008). What to expect when barren mares are inseminated with frozen-thawed semen. In *Proceedings of the 54<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): San Diego, CA, USA, 6-10 December 2008*, pp. 213-215.

Barbacini, S. (2009). Frozen semen processing and quality control. In *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Congress of World Equine Veterinary Association (WEVA): Guarajá, SP, Brazil, 24-27 September 2009*, pp. 109-211.

Barbacini, S., Necchi, D. & Postinger, G. (2009). Management of mares with frozen-thawed semen. In *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Congress of World Equine Veterinary Association (WEVA): Guarajá, SP, Brazil, 24-27 September 2009*, pp. 85-88.

Barbacini, S., Zavaglia G., Gulden, P., Marchi, V. & Necchi, D. (2000) Retrospective study on the efficacy of hCG in an artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Veterinary Education*, 12 (6), 312-317.

Barbacini, S., Necchi, D. & Zavaglia, G. (2003). Retrospective study on the incidence of postinsemination uterine fluid in mares inseminated with frozen-thawed semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 23, 493-496.

- Barbacini, S., Marchi, V. & Zavaglia, G. (1999). Equine frozen semen: results obtained in Italy during the 1994-1997 period. *Equine Veterinary Education*, 11(2), 109-112.
- Barbacini, S. (2000). Management of mares for frozen semen. In *Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. pp. 308.
- Barbacini, S., Loomis, R.P. & Squires, E.L. (2005). The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89, 203-205.
- Barker, C.A.V. & Gandier, J.C.C. (1957). Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 21,47.
- Bedford, S.J. & Hinrichs, K. (1994). The effect of insemination volume on pregnancy rates of pony mares. *Theriogenology*, 42, 571-578.
- Belling, T.H. (1984). Postovulation breeding and related reproductive phenomena in the mare. *Equine Practice*, 6, 12-19.
- Bergfelt, D.R. & Ginther, O.J. (1992). Embryo loss following GnRH-induced ovulation in anovulatory mares. *Theriogenology*, 38, 33-43.
- Bergfelt, D.R. (2000). Anatomy and Physiology of the mare. In Samper, J.C (Ed.) *Equine breeding management and artificial insemination*. (pp.141-164). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Bergfelt, D.R. (2000). Estrous synchronization. In Samper, J.C (Ed.) *Equine breeding management and artificial insemination*. (pp.165-177). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Bergfelt, D.R., Pierson, R.A. & Adams, G.P. (1997). Form and function of the corpus luteum. In: Rantanen, N.W. & McKinnon, A.O. (Eds.) *Equine Diagnostic Ultrasonography*. (pp.221-232). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Bergfelt, D.R. & Adams, G.P. (2000). Ovulation synchrony following follicle ablation in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56, 257-269.
- Blanchard, T.L., Varner, D.D & Schumacher, J. (1998). *Manual of Equine Reproduction*. Missouri: Mosby.
- Blanchard, T.L., Thompson, J.A., Brinsko, S.P., Stich, K.L., Wendt, K.M., Varner D.D & Rigby, S.L. (2004). Mating mares on foal heat: a five year retrospective study. In *Proceedings of the 50<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Denver, Colorado*, pp. 1496.
- Borg, K., Colenbrander, B, Frazeli, A., Parlevliet, J. & Malmgren, L. (1997). Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 48(4), 531.
- Brinsko, S.P., Ball, B.A., Miller P.G., Thomas, P.G. & Ellington, J.E. (1994). In vitro development of day 2 embryos obtained from young fertile mares and aged subfertile mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102, 371-378.

- Brinsko, S., Rigby, S., Lindsey, A.C., Blanchard, T., Love, C.C. & Varner, D. (2003). Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally-guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. *Theriogenology*, 59 (3-4), 1001-1009.
- Brinsko, S.P., Varner, D.D., Blanchard, T.L. & Meyers, S.A. (1990). The effect of postbreeding uterine lavage on pregnancy rates in mares. *Theriogenology*, 33, 465.
- Broussard, J.R., Goodeaux, S.D., Goodeaux, L.L., Thibodeaux, J.K., Moreau, J.D., Godke, R.A. & Roussel, J.D. (1993). The effects of different types of syringes on equine spermatozoa. *Theriogenology*, 39 (2), 389-399.
- Carnevale, E.M. & Ginther, O.J. (1994). Reproductive function in old mares. In *Proceedings of the 40<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Vancouver, BC*, 15.
- Carnevale, E.M., Coutinho da Silva, M.A. & Panzani, D. (2005). Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*, 64, 480-491.
- Clay, C.M., Squires, E.L., Amann, R.P. & Nett, T.M. (1989). Influences of season and artificial photoperiod on stallions: Pituitary and testicular responses to exogenous GnRH. *Journal of Animal Science*, 67, 763-770.
- Carnevale, E.M. & Ginther, O.J. (1994). of season and artificial photoperiod on stallions: Pituitary and testicular responses to exogenous GnRH. *Journal of Animal Science*, 67, 763-770.
- Combs, G.B., LeBlanc, M.M., Neuwirth, L. & Tran, T. (1996). Effects of prostaglandin F<sub>2</sub>, cloprostenol and fenprostalene on uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Theriogenology*, 45 (4), 1449-1455.
- Crabo, B.G. (2001). Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. In *Proceedings of the 47<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): San Diego, CA, USA, 24-28 November*, 47, 291-294.
- Daels, P.F. & Hughes, J.P. (1993). The normal estrous cycle. In McKinnon, A.O. & Voss, J.L. (Eds). *Equine Reproduction*. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Daels, P.F. (2003). New techniques of artificial insemination in the mare. In *Proceedings of the Belgium Equine Practitioners Society (BEPS): Brussels, Belgium, 2003*, pp. 57-58.
- DenDaas, N. (1992). Laboratory assessment of semen characteristics. *Animal Reproduction Science*, 28, 87-94.
- Dobrinski, I., Thomas, P.G.A. & Ball, B.A. (1995). Cryopreservation reduces the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zonae pellucidae *in vitro*. *Journal of Andrology*, 16, 536-542.
- Dobrinski, I., Thomas, P. & Ball, B.A. (1996). The oviductal sperm reservoir in the horse: functional aspects. In *Proceedings of the Society for Theriogenology: Kansas City; MO, USA*, 265-270.
- Dobrinski, I., Thomas, P., Smith, T. & Ball, B.A. (1996). Sperm-oviduct interaction: role of sperm adhesion and effects of sperm cryopreservation. In *Proceedings of the 42<sup>nd</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Denver, Colorado, USA*, 144-145.

- Donadeux, F.X. & Ginther, O.J. (2002). Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. *Reproduction*, 124 (875-885).
- Duchamp, G. & Daels, P.F. (2002). Combined effect of sulpiride and light treatment on the onset of cyclicity in anestrus mares. *Theriogenology*, 58, 599-602
- Duchamp, G., Bour, B, Combarous, Y. & Palmer, E. (1987). Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl, 35, 221-228.
- Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.G. (1987). *Textbook of Veterinary Anatomy*. (pp. 503-541). Philadelphia: WB Saunders
- Ellington, J.E., Ball, B.A. & Blue, B.J. (1993). Capacitation-like membrane changes and prolonged viability in vitro of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. *American Journal of Veterinary Research*, 54, 1505-1510.
- Ellington, J.E., Samper, J.C. & Metcalf, E. (1998). Relationship between stallion field fertility and the ability of sperm to attach to oviduct (uterine tube) cells *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 47, 21-22.
- Evans, M.J., Hamer, J.M. & Gason, L.M. (1986). Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intrauterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment. *Theriogenology*, 26, 37.
- Ferreira-Dias, G., Claudino, F., Carvalho, H., Agrícola, R., Alpoim-Moreira, J. & Robalo Silva, J. (2005). Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status. *Domestic Animal Endocrinology*, 29, 203-213.
- Fitzgerald, B.P. & Schmidt, M.J. (1995). Absence of an association between melatonin and reproductive activity in mares during the nonbreeding season [abstract]. *Biology of Reproduction Monographs Series*, 1, 425.
- Fleet, T., Varner, D., Blanchard, T., Vogelsang, M. & Thompson, J. (1995). Use of heparin to accelerate capacitation of equine spermatozoa *in vivo*. *Biology of Reproduction*, VI (1), 713-718.
- Gastal, E.L., Gastal, M.O. & Ginther, O.J. (1998). Ultrasound follicular characteristics for predicting ovulation on the following day in mares. *Theriogenology*, 49(1), 257.
- Ginther, O.J. (1992). *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects* (Ed2), Cross Plains, WI: Equiservices Publishing.
- Ginther, O.J., Baucus, K.L. & Bergfelt, D.R. (1994). Follicular and FSH responses to parturition during the anovulatory season in mares. *Theriogenology*, 41, 613-621.
- Ginther, O.J. (1995). *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Fundamentals*. Book 1. (pp. 225). Cross Plains, WI: Equiservices Publishing.
- Ginther, O.J. (1995). *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses*. Book 2. (pp. 394). Cross Plains, WI: Equiservices Publishing.
- Graham, J.K. (1996). Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Clinic of North America Equine Practitioners*, 119-130.
- Gotze, R. (1949). Insemination and infertility in domestic animals. Schaper, Hannover, Germany

- Guillaume, D., Duchamp, G. & Nagy, P. (2000). Determination of minimum light treatment required for photostimulation of winter anoestrus mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56 (Suppl.), 205-216.
- Guvenk, K., Reilas, T. & Katila, T. (2005). Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Animal Reproduction Science*, 83, 2504-2512.
- Gygax, A.P., Ganjam, V.K. & Kenney, R.M. (1979). Clinical, microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, 27 (Suppl), 571-578.
- Harrison, L.A., Squires, E.L., Nett, T.M. & McKinnon, A.O. (1990). Use of gonadotropin-releasing hormone for hastening ovulation in transitional mares. *Journal of Animal Science*, 68, 690-699.
- Hodge, S.L., Kreider, J.L. & Potter, G.D. (1982). Influence of photoperiod on the pregnant and post partum mare. *American Journal of Veterinary Research*, 10, 1752-1755.
- Householder, D.D., Pickett, B.W., Voss, J.L. & Olar, T.T. (1981). Effect of extender, number of spermatozoa and hCG on equine fertility. *Equine Veterinary Science*, 1, 9-13.
- Huhtinen, M, Koskinen, E., Skidmore, J.A. & Allen, W.R. (1996). Recovery rate and quality of embryos from mares inseminated after ovulation. *Theriogenology*, 45 (4), 719-726.
- Hyland, J.H. (1993). Uses of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) and its analogues for advancing the breeding season in the mare. *Animal Reproduction Science*, 33, 195-207.
- Jasko, D.J., Moran, D.M., Farlin, M.E., Squires, E.L., Amann, R.P. & Pickett, B.W. (1992). Pregnancy rates utilising fresh, cooled and frozen-thawed semen. In *Proceedings of the 38<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP)*: 649-660.
- Jasko, D.J., Lein, D.H. & Foote, R.H. (1990). Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 197(3), 389-394.
- Jasko, D.J., Little, T.V. & Lein, D.H. (1992). Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987 – 1988). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 200 (7), 979-985.
- Katila, T., Koskinen, E., Kuntsi, H. & Lindberg, H. (1988). Fertility after post ovulatory insemination in mares. In *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, Ireland*, 96.
- Katila, T. (1995). Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen [abstract]. *Biology of Reproduction Monograph Series*, 1, 515.
- Katila, T. (1997). Interactions of the uterus and semen. *Pferdeheilkunde*, 13, 508
- Katila, T. (2001). Sperm – Uterine interactions: a review. *Animal Reproduction Science*, 68, 267.
- Katila, T. (2005). Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. *Animal Reproduction Science*, 89 (1-4), 3-18.
- Keller, A., Neves, A., Aupperle, H., Steiger, K., Schoon, H.A., Klug, E., Gregory, R. & Matos, R. (2004). Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais



- repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32 (3), 215-223.
- Kenney, R.M. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 172, 241.
- Kenney, R.M., Bergman, R.V. & Cooper, W.L. (1975). Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Lexington, KY, USA*, 327.
- Kenney, R.M. & Doig, P.A. (1986). Equine endometrial biopsy. In Morrow D.A. (Ed.) *Current Therapy in Theriogenology*. (pp. 723-729). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Kenney, R.M., Evenson, D.P., Garcia, M.C. & Love, C.C. (1995). Relationships between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm, and seasonal pregnancy rate. *Biology of Reproduction Monograph*, 647-653.
- Klein, S.L. & Nelson, R.J. (1999). Influence of social factors on immune function and reproduction. *Rev Reproduction*, 4, 168-78.
- Kloppe, L.H. et al. (1988). Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen-thawed equine spermatozoa. *Theriogenology*, 29, 429-439.
- Koskinen, E. & Katila, T. (1987). Uterine involution, ovarian activity and fertility in the post-partum mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35 (Suppl), 733-734.
- Kottilainen, T., Huhtinen, M. & Katila, M. (1994). Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, 41, 629-636.
- LeBlanc, M.M. (2003). Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. In: Ball, B.A. (Ed). *Recent Advances in Equine Reproduction*. (pp. 1-8). Ithaca, NY: International Veterinary Information Service.
- LeBlanc, M.M. (2005). The ins and outs of breeding mares with cooled and frozen semen. In *Proceedings of the North American Veterinary Conference (NAVC): Orlando, Florida, USA, 8-12 January, 2005*, pp. 222-223.
- LeBlanc, M.M. (2006). Reproduction Deduction – Part 2. In *Proceedings of the North American Veterinary Conference, 2006*, pp. 115-118.
- LeBlanc, M.M, Johnson, R.D. & Calderwood Mays, M.B. (1995). Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Biology of Reproduction Monograph*, 1, 501.
- LeBlanc, M.M., Neuwirth, L., Mauragis, D., Klapstein, E. & Tran, T. (1994). Oxytocin enhances clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*, 26, 279-282.
- LeBlanc, M.M., Neuwirth, L. & Jones, L. (1998). Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology*, 50, 49.
- Leipold, S.D., Graham, J.K., Squires, E.L., McCue, P.M., Brinsko, S.P. & Vanderwall, D.K. (1998). Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology*, 49, 1537-1543.

- Lenz, T.R. (1986). One practitioner's approach to foal heat breeding. In *Proceedings of the Society of Theriogenology Meeting*, 111-119.
- Ley, W.B. (1991). Sperm chromatin structure: analysis of semen using flow cytometry. In *Proceedings of the Society for Theriogenology*, 133-145.
- Lieux, P. (1980). Comparative results of breeding on first and second post-foaling heat periods. In *Proceedings of the 26<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 129-132.
- Lindsey, A.C., Bruemmer, J.E. & Squires, E.L. (2001). Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. *Animal Reproduction Science*, 68, 279-289.
- Lindsey, A.C., Schenk, J.L., Graham, J.K., Bruemmer, J.L. & Squires, E.L. (2002). Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, 34, 121-127.
- Liu, I.M., Rakestraw, P. & Coit, C. (1997). An *in vitro* investigation of the mechanism of neuromuscular regulation in myometrial contractility. *Pferdeheilkunde*, 13, 557.
- Lofstedt, R.M. (1988). Control of the estrous cycle in mares. *Veterinary Clinic of North America Equine Practitioners*, 4, 177-196.
- Loomis, P.R. (1999). Artificial insemination of horses: where is it going? In *Proceedings of Annual Conference of the Society for Theriogenology*, 325-336.
- Loomis, P.R. (2001). The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science*, 68, 191-200.
- Loomis, P.R. & Squires, E.L. (2005). Frozen semen management in equine breeding program. *Theriogenology*, 64, 480-491.
- Loomis, P.R. & Graham, J.K. (2008). Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105, 119-128.
- Love, C.C. & Kenney, R.M. (1994). Relationship of sperm chromatin to fertility in the stallion. In *Proceedings of the 39<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Vancouver, BC*, 21-22.
- Loy, R.G. (1980). Characteristics of postpartum reproduction in mares. *Veterinary Clinic of North America Large Animal Practice*, 2, 345-359.
- Mari, G., Morganti, M., Merlo, B., Castagnetti, C., Parmeggiani, F., Govoni, N., Galeati, G. & Tamanini, C. (2009). Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrous mares. *Theriogenology*, 71 (6), 959-965.
- McCue, P. (2006). Clinical cases in equine reproduction. In *Proceedings of the 52<sup>nd</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): San Antonio, Texas, USA, 2-6 December 2006*, pp 465-467.
- McCue, P.M., Hudson, J.J. & Bruemmer J.E. (2004). Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. In *Proceedings of the 50<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Denver, Colorado, USA, 4-8 December 2004*, pp. 510-513.

- McCue, P.M. & Squires, E.L. (2002). Persistent anovulatory follicles in the mare. *Theriogenology*, 58, 541-543.
- McKinnon, A.O. (2009). Hormonal control of equine reproduction. In *Proceedings of the AAEP Annual Resort Symposium: Vail, Colorado, USA, 25-28 January 2009*, pp. 138-174.
- McKinnon, A.O. & Voss, J.L. (1993). *Equine Reproduction*. Philadelphia, Lea & Febiger.
- McKinnon, A.O. (1997). Ovarian abnormalities. In: Rantanen, N.W. & McKinnon, A.O. (Eds). *Equine diagnostic ultrasonography*. (pp. 233-251). Baltimore: Williams & Wilkins.
- McKinnon, A.O., Perriam, W.J., Lescun, T.B., Walker, J. & Vasey, J.R. (1997). Effect of a GnRH analogue (Ovuplant), hCG and dexamethasone on time to ovulation in cycling mare. *World Equine Veterinary Rev*, 2 (3), 16-18.
- Mennick, P. (1991). Freezing and utilization of stallion and jack semen. In *Proceedings of the Society for Theriogenology, San Diego, CA, USA*, 198-201.
- Metcalf, L. (1995). Maximising reproductive efficiency in private practice: the management of mares and the use of cryopreserved semen. In *Proceedings of the Society for Theriogenology, San Antonio, Texas, USA*, 155-159.
- Metcalf, E.S. (2000). Insemination and breeding management. In Samper, J.C (Ed.) *Equine breeding management and artificial insemination*. (pp.179-194). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Metcalf, E.S. (2000). The effect of postinsemination endometritis on fertility of frozen stallion semen. In *Proceedings of the 40<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): San Antonio, Texas, USA, 26-29 November 2000*, 46, 330-331.
- Metcalf, E.S. (2005). Optimizing pregnancy rates using frozen-thawed equine semen. In *Proceedings of the 51<sup>st</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Seattle, Washington, USA, 3-7 December 2005*, 51, pp. 209-212.
- Metcalf, E.S. (2007). The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology*, 68, 423-428.
- Meyers, S.A. (1996). Diagnosis of subfertility in stallions: evaluation of sperm function. In *Proceedings of the Society for Theriogenology, San Diego, CA, USA*, 271-277.
- Meyers, S.A., Liu, I.K.M. & Overstreet, J.W. (1996). Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: comparisons between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, 46, 1277-1288.
- Meyers, P., Wolfgang, J. & Trigg, T. (1994). Acceleration of ovulation in the mare with the use of the GnRH analog, deslorelin acetate. In *Proceedings of the 40<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Vancouver, BC*, 13-14.
- Miller; C.D. (2008). Optimising the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology*, 70, 463-468.
- Morris, L.H. (2004). Low dose insemination in the mare: an update. *Animal Reproduction Science*, 82, 625-632.
- Morris, L.H. & Allen W.R. (2002). An overview of low dose insemination in the mare. *Reproduction of Domestic Animals*, 37, 206-210.

- Morris, L.H., Hunter, R.H. & Allen, W.R. (2000). Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118, 95-100.
- Morris, L.H., Tiplady, C. & Allen, W.R. (2003). Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Veterinary Journal*, 35, 197-201.
- Mumford, E.L., Squires, E.L., Jochle, E., Harrison, L.A., Nett, T.M. & Trigg, T.E. (1995). Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. *Animal Reproduction Science*, 39, 129-140.
- Necchi, D., Barbacini, S. & Postinger, G. (2008). Artificial insemination with equine frozen-thawed semen and the barren mare: problems, results and expectations. In *Proceedings of the European Equine Meeting of the Year 2008 (XIV SIVE/FEEVA Congress): Venice, Italy, 25-27 January, 2008*, pp. 367-368.
- Nelson, R.J. & Demas, G.E. (1996). Seasonal changes in immune function. *Quart Rev Biology*, 71, 511-48.
- Nequin, L.G., King, S.S., Matt K.S. & Jurak, R.C. (1990). The influence of photoperiod on gonadotropin-releasing hormone stimulated luteinizing hormone release in the anestrus mare. *Equine Veterinary Journal*, 22, 356-358.
- Newcomce, J.R. (1994). Conception in a mare to a single mating 7 days before ovulation. *Equine Veterinary Education*, 6 (1), 27-28
- Nie, G.J., Brenden, K. & Momont, H.W. (1995). Stallion semen fertility after *in vitro* exposure to equine antisperm antibody. *Biology of Reproduction*, VI (1), 745-752.
- Nie, G.J., Johnson, K.E. & Wenzel, J.G.W. (2003). Pregnancy outcomes in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/sephadex filtration, percoll separation or absolute number. *Animal Reproduction Science*, 79, 103-109.
- Nie, G.J., Johnson, K.E. & Wenzel, J.G.W. (2003). Effect of administering oxytocin or cloprostenol in the periovulatory period on pregnancy outcome and luteal function in mares. *Theriogenology*, 60, 1111-1118.
- Nikolopoulos, E. & Watson, E.D. (1997). Does artificial insemination with chilled, extend semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service?. *Theriogenology*, 47(2), 583-590.
- Nishikawa, Y. & Shinomiya. (1976). Results of conception tests of frozen horse semen during the past ten years [abstract]. In *Proceedings of International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 4, 1034.
- Pace, M.M. & Sullivan, J.J. (1975). Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 23 (Suppl.), 115-121.
- Palmer, E. (1984). Factors affecting stallion semen survival and fertility. In *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Vol. 2, Urbana IL, 377-379
- Palmer, E. & Driancourt, M.A. (1983). Some interactions of season of foaling, photoperiod and ovarian activity in the equine. *Livestock Production Science*, 110, 197-210.

Palmer, E., Driancourt, M.A. & Ortavant, R. (1982). Photoperiodic stimulation at the mare during winter anestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 32, 275.

Pycock, J.F. (2008). Artificial insemination. In *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress of World Equine Veterinary Association (WEVA):Moscow, Russia, 28 January-1 February*, pp. 213-15.

Pycock, J.F. & Allen, W.E. (1990). Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. *Equine Veterinary Journal*, 22, 422.

Pycock, J.F., Paccamonti, D. & Jonker, H. (1997). Can mares be classified as resistant or susceptible to recurrent endometritis? *Pferdeheilkunde*, 13,431.

Reger, H.P., Bruemmer, J.E., Squires, E.L., Maclellan, L.J., Barbacini, S., Necchi, D. & Zavaglia, G. (2003). Effect of timing and placement of cryopreserved semen on fertility of mares. *Equine Veterinary Education*, 15 (2), 101-106.

Ricketts, S.W. & Alonso, S. (1991). Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine Veterinary Journal*, 23, 185-188.

Ridale; W.T., LeBlanc, M.M, Pierce, S.W. & Stromberg, A.J. (2005). Relationships between pregnancy rates, uterine culture results in a thoroughbred practice in central Kentucky. In *Proceedings of the 51<sup>st</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Seattle, Washington, USA, 3-7 December 2005*, 51, pp. 198-201.

Rigby, S.L., Derczo, S., Brinsko, S., Blanchard, T., Taylor, T., Forrest, D.W. & Varner, D. (2000). Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. In *Proceedings of the 46<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): San Antonio, Texas, USA: 26-29 November 2000*, 46, 332-334.

Rigby, S.L., Lindsey, A.C. & Brinsko, S.P. (2001). Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or rectally-guided uterotubal insemination with low sperm numbers. In *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium of Stallion Reproduction*, 49.

Roberto da Costa, R.P., Carvalho, H., Agrícola, R., Alpoim-Moreira, J., Martins, C. & Ferreira-Dias, G. (2003). Peripheral blood neutrophil function and lymphocyte subpopulations in cycling mares. *Reproduction in Domestic Animals.*, 38, 464-469.

Roser, J.F., Kiefer, B.L., Evans, J.W., Neely, D.P. & Pacheco, D.A. (1979). The development of antibodies to human chorionic gonadotrophin following its repeated injection in the cyclic mare. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl*, 2(3), 27, 173-179.

Samper, J.C. (1997). Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. In *Proceedings of the 43<sup>rd</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Phoenix, AZ, USA*, 189-191.

Samper, J.C. (1999). Increasing pregnancy rates with frozen semen: can it be done?. In *Proceedings of Annual Meeting for the Society for Theriogenology*, 109-116.

Samper, J.C. (2000). *Equine breeding management and artificial insemination*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Samper, J.C. (2000), Artificial Insemination. In Samper, J.C (Ed.) *Equine breeding management and artificial insemination*. (pp.109-131). Philadelphia: W.B. Saunders Company.

- Samper, J.C. (2001). Breeding mares with frozen semen in private practice. In *Proceedings of the 47<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): San Diego, CA, USA, 24-28 November, 47*, 314-318.
- Samper, J.C. (2001). Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science*, 68, 219-228.
- Samper, J.C., Hearn, P., Ganheim, A. & Curtis, E. (1994). Pregnancy rates and effect of extender and motility and acrosome status of frozen-thawed stallion spermatozoa. In *Proceedings of the 40<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Vancouver, BC*, 41-43.
- Samper, J.C., Hellander, J.C. & Crabo, B.G. (1991). Relation between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality measured as sperm motility and with glass wool/sephadex filters. *Journal of Reproduction and Fertility*, 44, 107-114.
- Samper, J.C., Sanchez, R. & Gomez, I. (2005). Artificial insemination with frozen semen: pregnancy rates after rectally guided or endoscopic deposition. In *Proceedings of the 51<sup>st</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Seattle, Washington, USA, 3-7 December 2005*, 51.
- Samper, J.C., Vidament, M., Katila, T., Newcombe, J., Estrada, A. & Sargeant, J. (2002). Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi-center study. *Theriogenology*, 58, 647-650.
- Scott, M.A. & Overstreet, J.W. (1995). Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications. In *Proceedings of the 41<sup>st</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Lexington, KY, USA*, 1-2.
- Scraba, S.T. & Ginther, O.J. (1985). Effects of lighting on onset of the ovulatory season in mares. *Theriogenology*, 24, 667-680. A
- Sharp, D.C. (1988). Transition into the breeding season: clues to the mechanisms of seasonality. *Equine Veterinary Journal*, 20, 159-161.
- Sharp, D.C. & Davis, S.D. (1993) Vernal transition. In: McKinnon, A.O. & Voss, J.L. (Eds). *Equine Reproduction*. (pp. 133-143). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Sharp, D.C., Kooistra, L. & Ginther, O.J. (1975). Effects of artificial light on the oestrous cycle of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 23, 241-246.
- Sieme, H., Bonk, A. & Hamann, H. (2004). Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, 62, 915-928.
- Sieme, H., Schafer, T., Stout, T.A., Klug, E. & Waberski, D. (2003). The effects of different insemination regimens on fertility in mares. *Theriogenology*, 60, 1153-1164.
- Silvia, P.J., Squires, E.L. & Nett, T.M. (1986) Changes in the hypothalamic-hypophyseal axis of mares associated with seasonal reproductive recrudescence. *Biology of Reproduction*, 35, 897-905.
- Squires, E.L. (2005). Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, 64, 480-491.

- Squires, E.L., Barbacini, S., Mathews, P., Byers, W., Schwenzer, K., Steiner, J. & Loomis, P.R. (2006). Retrospective study of factors affecting fertility of fresh, cooled and frozen semen, *Equine Veterinary Education*, 18 (2), 96-99.
- Squires, E.L., Barbacini, S., Necchi, D., Reger, H.P. & Bruemmer, J.E. (2003). Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. In *Proceedings of the 49<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): New Orleans, Louisiana, USA, November 2003*, 49, 353-356.
- Squires, E.L. & Cook, N.L. (1998). Ultrasound-guided follicular aspiration, In: Rantanen, N.W. & McKinnon, A.O. (Eds.) *Equine Diagnostic Ultrasonography*. (pp. 213-220). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Squires, E.L., Heesemann, C.P., Webel, S.K., Shideler, R.K. & Voss, J.L. (1983). Relationship of altrenogest to ovarian activity, hormone concentrations and fertility of mares. *Animal Reproduction Science*, 56, 901-910.
- Squires, E.L., Lindsey, A.C. & Buchanan, M.S. (2000). A method to obtain pregnancies in mares using minimal sperm numbers. In *Proceedings of the 46<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): San Antonio, Texas, USA, 26-29 November 2000*, 46, 335-337.
- Squires, E.L., Moran, D.M., Farlin, M.E., Jasko, D.J., Keefe, T.J., Meyers, S.A., Figueiredo, E., McCue, P.M. & Jochle, W. (1994). Effect of dose of GnRH analog on ovulation in mares. *Theriogenology*, 41, 757-769.
- Squires, E.L., Pickett, B.W. & Graham, J.K. (1999). Cooled and frozen stallion semen. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bull. N° 09*. Fort Collins: Colorado State University, 71.
- Squires, E.L., Reger, H.P. & Maclellan, L.J. (2002). Effect of time of insemination and site of insemination on pregnancy rates with frozen semen. *Theriogenology*, 58, 655-658.
- Taylor, T.B., Pemstein, R. & Loy, R.G. (1982). Control of ovulation in mares in the early breeding season with ovarian steroids and prostaglandin. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 32, 219-224.
- Thomas, P.G.A., Ball, B.A. & Brinsko, S.P. (1994). Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. *Biology of Reproduction*, 51, 222-228.
- Thomas, P.G.A., Ball, B.A., Miller, P.G., Brinsko, S.P. & Southwood, L. (1994). A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviduct epithelial cells in vitro. *Biology of Reproduction*, 51, 303-309.
- Troedsson, M. T. (1995). Uterine response to semen deposition in the mare. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology: 1995*, pp. 130-135.
- Troedsson, M.H.T. (1995). Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare [abstract]. *Biology of Reproduction*, 52 (Suppl 1), 307.
- Troedsson, M.T. & Liu, I.M. (1991). Uterine clearance of non-antigenic markers (51-Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections [abstract]. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 44, 283.
- Troedsson, M.T., Liu, I.M. & Crabo, B.G. (1995). Sperm transport and survival in the mare [abstract]. *Theriogenology*, 49, 905.

- Troedsson, M.T., Liu, I.M. & Ing, M. (1993). Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection [abstract]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99, 307.
- Varner, D.D., Blanchard, T.L. & Brinsko, S.P. (1988). Estrogen, oxytocin and ergot alkaloids – uses in reproductive management of mares. In *Proceedings of the 38<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, pp. 87-88.
- Varner, D. (1995). Glycosaminoglycans: influence on function of stallion spermatozoa. In *Proceedings of the 41<sup>st</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Lexington, KY, USA*, 8-10.
- Vidament, M. (2005). French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 89, 115-136.
- Vidament, M., Dupere, A.M., Julienne, P. & Palmer, E. (1997). Equine frozen semen freezability and fertility results. *Theriogenology*, 48, 907-917.
- Voss, J.L., Sullivan, J.J., Pickett, B.W., Warker, W.G., Burwash, L.D. & Larson, L.L. (1975). The effect of hCG on duration of oestrus, ovulation time and fertility in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 23, 297-301.
- Watson, E.D. (2000). The causes of reduced fertility with frozen semen. In *Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction*, pp. 481-492.
- Watson, E.D., Thomassen, R. & Nikolakopoulos, E. (2003). Association of uterine edema with follicle waves around the onset of the breeding season in pony mares. *Theriogenology*, 59, 1181-1187.
- Webel, S.K. & Squires, E.L. (1982). Control of the oestrous cycle in mares with altrenogest. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 32, 193-198.
- Weber, J.A., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K. & Woods, G.L. (1991). Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biology of Reproduction*, 45, 544-546.
- Wilhelm, K.M., Graham, J.K. & Squires, E.L. (1996). Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration *Proceedings of the Society for Theriogenology, San Diego, CA, USA*, 271-277.
- Woods, J.A., Bergfelt, D.R. & Ginther, O.J. (1990). Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. *Equine Veterinary Journal*, 22, 410-415.