

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**TAXA DE CONCEPÇÃO DE ÉGUAS COBERTAS
12 OU 24 HORAS APÓS A OVULAÇÃO**

FERNANDO ANDRADE SOUZA

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2007

Fernando Andrade Souza

**TAXA DE CONCEPÇÃO DE ÉGUAS COBERTAS
12 OU 24 HORAS APÓS A OVULAÇÃO**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. *Álan Maia Borges*.

Co-orientador: Prof. *José Monteiro da Silva Filho*.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2007

S729t Souza, Fernando Andrade, 1979-
Taxa de concepção de éguas cobertas 12 ou 24 horas após a ovulação / Fernando Andrade
Souza – 2007.
86 p. : il.

Orientador: Alan Maia Borges

Co-orientador: José Monteiro da Silva Filho

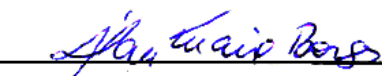
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Égua – Reprodução – Teses. 2. Ovulação – Teses. 3. Fertilidade – Teses. I. Borges, Alan
Maia. II Silva Filho, José Monteiro da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.108 926

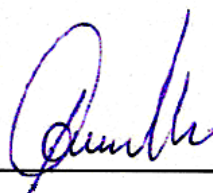
Dissertação defendida em 02 de fevereiro de 2007 e aprovada pela banca examinadora constituída por:



Prof. Dr. Alan Maia Borges
(Orientador)



Prof.^a Dr.^a Maristela Silveira Palhares



Prof. Dr. Giovanni Ribeiro de Carvalho



Dr. José Reinaldo Mendes Ruas

A história de todo homem se faz nas buscas... No ir e vir... Nas perspectivas do encontrar. Longínquos são os caminhos que devemos percorrer para construirmos nossa história. Em muitos momentos, não sabemos nem mesmo o quanto deveremos abdicar para subjugar o “aqui”. Quantos sorrisos, quantas lágrimas, quantos dias deixamos de estar. Ficando simplesmente a ausência. Sei que, apesar de o quão longe seja e do quanto tenha deixado, se sou o “hoje”... Digo que foi por vocês se fazerem presentes, onipresentes, na minha vida. A vocês, meus pais: Antonia Lima Andrade Souza e Newton Martins Souza, por todo amor, dedicação e apoio. De forma que somente um pai pode ser, incondicional.

Dedico.

Impregnado em meu corpo trago o cheiro doce do cedro. Nas minhas magras veias o que corre não é sangue azul nem vermelho é puro leite, é puro azeite de babaçu. Minha pele foi tecida pelos bilros de minha avó “Baita”. Meus olhos esbugalhados foi mãe da lua que alumiou, com o triste canto da rolinha fogo pagô! fogo pagô! fogo pagô! O pulsar da minha vida tem o ritmo traçado pela dança da mão de pilão. Meu riso frouxo nasceu das cantigas de cordel à luz das lamparinas, brincadeiras de roda, cair no poço e pulando corda. Forjada nas farinhadas nos engenhos de rapadura e nas debulhas de feijão, mesmo saindo do mato... Ele não! Permanece dentro de mim grudado que nem mucuim... Ah, meu lindo Maranhão.

Essência, Lília Diniz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fazer-me ter forças para transpor as barreiras que se levantam frente a minha caminhada.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Escola de Veterinária, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Alan Maia Borges, pela dedicação, ensinamentos e amizade durante esta nossa jornada.

Ao Prof. José Monteiro da Silva Filho, pelo empenho, dedicação, sugestões e amizade durante a execução deste trabalho.

À Professora Maristela Silveira Palhares pela execução e sugestões das análises estatísticas.

À banca examinadora: Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho e Dr. José Reinaldo Mendes Ruas, pelas valiosas sugestões.

A todas as pessoas que possibilitaram a realização deste trabalho experimental no Regimento de Cavalaria Alferes Tiradentes e no Núcleo Equino de Reprodução da Polícia Militar de Minas Gerais, em especial aos Médicos Veterinários Walmir, Cyril e Laura. Aos enfermeiros Manoel, Adilson, Gavião, Padilha, Fernando, Viana, Afonso, Dinei, Castro, Filho e Pinheiro.

A minha avó, Maria Cecília, por todo amor.

Aos meus pais, Antonia Lima Andrade Souza e Newton Martins Souza, por todo apoio e amor.

A minha irmã, Ana Cristina, meu amor maior.

Aos meus irmãos, Júnior e Ana Paula, por todo amor.

A Anali, meu céu sem nuvens. Pessoa ímpar, que me faz sempre ver que podemos ser melhores, que sempre podemos dar o que nos há de melhor. Por tudo que já passamos, por todas as pipocas que já comemos. A você meu amor, agradeço por me fazer um homem feliz.

Aos meus irmãos de república, Gasparzinho (Ferdinan), Corujito (Hélio) e Gudin (Talmir), pelos anos de amizade e companheirismo. Por tudo que esses anos nos têm ensinado, por tudo que passamos juntos longe de casa. A vocês meus irmãos, eu agradeço.

Aos amigos da pós-graduação: Guilherme Pugliesi, Amandinha, Marçanga, Gianga, Léo Viola, Jairanga, Ivanga, Bel, Dé, Cláudinha, Raissa, Adriana, Maria Raquel, Dane, João Evangelista, Carlos, Lucas e Aníbal.

À Haddad (Camila) e Kate (Caterine), pela bela amizade que conquistamos.

Ao grande amigo, Francisco Carneiro, por todos os ensinamentos e conselhos.

Aos amigos que o tempo não deixa esquecer: Modesto, Cássio, Pecebe, Sibá, Marcelo, Karla e Adriana. Apesar da distância e do tempo, a presença de vocês sempre é constante.

Aos professores Antônio de Pinho Marques Júnior, Marc Roger Jean Marie Henry, Monique de Albuquerque Lagares e Vicente Ribeiro do Vale Filho, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Às secretárias do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária: Eliane, Rosângela e Lourdes.

À equipe do Colegiado de Pós-Graduação.

A todos os colegas e amigos que durante o curso sempre se dispuseram a servir; os nomes e as lembranças estarão sempre presentes nas recordações do autor.

Expresso meus agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Alguns aspectos da reprodução eqüina.....	13
2.1.1 Sazonalidade.....	13
2.1.2 Ciclo estral, dinâmica folicular e ovulação na égua.....	16
2.1.3 Desenvolvimento e maturação do oócito.....	19
2.1.4 Ativação e fecundação do oócito.....	21
2.1.5 Envelhecimento do gameta feminino.....	28
2.1.6 Influência da idade materna sobre a disfunção cromossômica no oócito de mamíferos.....	30
2.1.7 Ação do ambiente uterino na perda embrionária precoce.....	33
2.2 Predição da eficiência reprodutiva do garanhão.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Localização, condições climáticas e o período experimental.....	40
3.2 Delineamento experimental.....	41
3.3 Animais e manejo experimental.....	41
3.3.1 Éguas.....	41
3.3.1.1 Manejo reprodutivo, diagnóstico de ovulação e cobertura das éguas.....	42
3.3.1.2 Manejo nutricional e instalações das éguas.....	43
3.3.2 Garanhão.....	43
3.3.2.1 Manejo nutricional e instalações dos garanhões.....	44
3.4 Análise estatística.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Caracterização das variáveis.....	45
4.2 Número de éguas e de ciclos estrais por grupo de intervalo de palpações retais.....	46
4.3 Número de ciclos estrais por égua, por égua vazia e égua gestante.....	47
4.4 Efeito da idade sobre a taxa de perda embrionária de éguas cobertas 24 ou 12 horas após a ovulação.....	49
4.5 Intervalo de palpação e palpação/cobertura.....	54
4.6 Taxa de concepção total e por ciclo estral de éguas mestiças submetidas a dois regimes de palpação diária.....	56
4.7 Eficiência de prenhez de éguas submetidas a dois intervalos distintos de palpação.....	61
5 CONCLUSÕES	62
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
7 ANEXOS	78
8 APÊNDICE	81

LISTA DE FIGURAS

Figura - 1	Organograma para o controle reprodutivo das éguas.....	43
Figura - 2	Ficha de controle individual.....	78
Figura - 3	Ficha de controle geral.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1	Dados meteorológicos médios do município de Belo Horizonte durante o período experimental (Outubro de 2005 a Março de 2006).....	40
Tabela - 2	Dados meteorológicos do município de Florestal – média de 30 anos (1961/1990)..	41
Tabela - 3	Parâmetros reprodutivos e de controle de éguas mestiças submetidas a duas frequências de palpação retal (24 e 12 horas) e cobertas por dois garanhões.....	46
Tabela - 4	Efeito da idade sobre a taxa de perda embrionária de éguas cobertas a intervalos de até 12 ou 24 horas após a ovulação.....	51
Tabela - 5	Intervalo de palpação e palpação/cobertura de éguas cobertas a intervalos de 24 ou 12 horas após a ovulação.....	54
Tabela - 6	Taxa de gestação por ciclo estral de éguas mestiças cobertas após a ovulação, por dois garanhões, seguindo o regime de duas ou uma palpação retal diária.....	57
Tabela - 7	Taxa de concepção por ciclo estral de éguas mestiças cobertas após a ovulação, segundo o regime de duas ou uma palpação retal.....	57
Tabela - 8	Taxa de concepção/ciclo, perda gestacional e eficiência de prenhez em éguas submetidas a dois intervalos de palpação retal.....	62
Tabela - 9	Comportamento sexual, características físicas e morfológicas do sêmen do garanhão G1, na estação de monta 2004/2005.....	80
Tabela -10	Características morfológicas do sêmen dos garanhões G1 e G2, na estação de monta 2005/2006.....	80

LISTA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análise 8.1	Resumo da análise de variância para o número de ciclos por égua.....	81
Análise 8.2	Resumo da análise de variância para número de ciclos por égua gestante.....	81
Análise 8.3	Resumo da análise de variância para número de ciclos por égua vazia.....	82
Análise 8.4	Resumo da análise de variância para idade dentro de todos os ciclos estrais.....	82
Análise 8.5	Resumo da análise de variância para intervalo das duas últimas palpações.....	83
Análise 8.6	Resumo da análise de variância para o intervalo da última palpação à cobertura.....	83
Análise 8.7	Resumo da análise de variância para a eficiência de prenhez.....	84
Análise 8.8	Resumo da análise de variância para o número de ciclos positivos considerando grupo de idade.....	84
Análise 8.9	Comparação entre as taxas de concepção por ciclo estral dos grupos, considerando-se o garanhão e o intervalo de palpação.....	84
Análise 8.10	Comparação entre a taxa de concepção considerando apenas intervalo de palpação.....	85
Análise 8.11	Comparação entre taxa de concepção no primeiro ciclo estral, considerando-se o garanhão e o intervalo de palpação.....	85
Análise 8.12	Comparação entre a taxa de concepção no primeiro ciclo estral, considerando apenas intervalo de palpação.....	85
Análise 8.13	Comparação entre taxa de concepção no segundo ciclo estral, considerando-se o garanhão e o intervalo de palpação.....	86
Análise 8.14	Comparação entre a taxa de concepção no primeiro ciclo estral, considerando-se apenas o intervalo de palpação.....	86

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a fertilidade de éguas cobertas após a ovulação, segundo um manejo de palpação retal a cada 24 (P1) ou 12 horas (P2), e cobertas por dois garanhões (G1 e G2). O estudo utilizou 84 ciclos estrais de 50 éguas mestiças do tipo militar, distribuídos ao acaso, por meio de sorteio, segundo um esquema fatorial 2 x 2, em seus respectivos tratamentos: T1 (P1G1) - 17 éguas e 25 ciclos estrais; T2 (P2G1) - 20 éguas e 33 ciclos estrais; T3 (P1G2) - 12 éguas e 16 ciclos estrais e T4 (P2G2) - 10 éguas e 10 ciclos estrais. A taxa de gestação para o primeiro, segundo e terceiro ciclos estrais foram de 29,41% (5/17) e 50,00% (4/8) para o grupo P1G1; 25,00% (5/20), 54,54% (6/11) e 100,00% (2/2) para o grupo P2G1; 41,66% (5/12) e 50,00% (2/4) para o grupo P1G2; e de 60,00% (6/10) para o grupo P2G2, respectivamente. A taxa de gestação total/ciclo, para cada um dos quatro tratamentos, foi de 36,0% (9/25), 39,40% (13/33), 43,75% (7/16) e 60,00% (6/10). A taxa de concepção por ciclo estral não diferiu ($p>0,05$), pelo teste Exato de Fisher ou pelo Qui-quadrado, entre os grupos de intervalos de palpação retal e entre os garanhões, tanto dentro como entre os tratamentos. Assim, os dados foram reagrupados levando-se apenas em consideração a frequência de palpação retal, e obteve-se 39,02% (16/41) e 44,19% (19/43) de taxa de concepção/ciclo e 55,20% (16/29) e 63,30% (19/30) de taxa de concepção total para os intervalos de palpação de 24 e 12 horas, respectivamente.

Palavras-chave: cobertura pós-ovulação, equinos, monta natural, taxa de concepção.

ABSTRACT

The objective of the experiment was to study the fertility of mares bred after ovulation, detected by rectal palpation every 24 (P1) or 12 hours (P2), using two stallions (G1 and G2). This study was done with 84 estrus cycles of 50 military crossbred mares, randomly assigned to four treatments: T1 (P1G1) - 17 mares and 25 estrus cycles; T2 (P2G1) - 20 mares and 33 estrus cycles; T3 (P1G2) - 12 mares and 16 estrus cycles; and T4 (P2G2) - 10 mares and 10 estrus cycles. The conception rate for first, second and third estrus cycles were 29.41% (5/17) and 50.00% (4/8) for group P1G1; 25.00% (5/20), 54.54% (6/11) and 100.00% (2/2) for group P2G1; 41.66% (5/12) and 50.00% (2/4) for group P1G2; and 60.00% (6/10) for group P2G2, respectively. The conception rate for each treatment were 36.00% (9/25), 39.40% (13/33), 43.75% (7/16) and 60.00% (6/10). The conception rate by estrus cycle did not differ ($p>0.05$) by Fisher Test or Chi-Square, neither between rectal palpation intervals nor stallions. The data obtained were regrouped considering only the rectal palpation frequency and it was obtained 39.02 (16/41) and 44.19% (19/43) for conception rate by estrus cycle and 55.2% (16/29) and 63.3% (19/30) for total conception rate for 24 and 12 to rectal palpation intervals, respectively.

Key-words: conception rate, equine, natural breeding, post ovulation breeding.

1. INTRODUÇÃO

A determinação do dia ou momento da ovulação poderá ter considerável impacto na coordenação do momento da cobertura, tanto por monta natural quanto por inseminação artificial. Isto permite maximizar o uso do garanhão, diminuindo o risco de contaminação uterina, por reduzir a quantidade de inseminações ou montas por ciclo estral, além de propiciar melhor manejo às éguas susceptíveis à endometrite (vanBuiten et al., 2003).

Na espécie equina, a fase folicular é altamente variável e inconsistente, o que torna difícil a determinação do final do estro, dificultando a predição do momento da ovulação (iRoig et al., 2005; Bowman, 2006). Contudo, o exame contínuo, com quatro ou seis horas de intervalo, durante o período do estro poderá predizer, com relativa confiabilidade, o momento da ovulação em éguas (Kloppe et al., 1988). O intervalo entre palpações freqüentes, gera grandes desgastes aos animais e aos médicos veterinários responsáveis pelo manejo reprodutivo. Porém, este tipo de manejo freqüente de palpação, possibilita a cobertura da égua o mais próximo da ovulação, de forma que tanto o gameta masculino quanto o feminino estejam viáveis no momento da fecundação (Jacob et al. 2000). Isto porque o oócito, após ser liberado, possui período muito curto de sobrevivência, quando comparado às células espermáticas (Hunter, 1990).

A taxa de concepção de éguas cobertas, após a ovulação, tem sido citada desde a década de 30 (Saltzman, 1940) relatando que inseminações realizadas após 12 horas da ovulação, tanto com sêmen a fresco quanto por monta natural, possuem baixa taxa de fertilidade (Koskinen et al., 1990). Isto se deve, segundo alguns autores, ao curto período de viabilidade do oócito no trato genital, considerado ser de 8 a 10 horas (Chang, 1951; Hunter, 1990).

Todavia, Silva (1995), que trabalhou com monta natural seis e 12 horas pós-ovulação, demonstrou que o oócito equino mostra-se viável por até 12 horas após ser ovulado, sendo sua viabilidade dependente do estágio de desenvolvimento em que este se encontra no momento da ovulação (Hunter, 1990). Assim, devido o tempo de viabilidade do oócito depender do seu estágio de desenvolvimento no momento da ovulação, os oócitos fecundados 12 e 24 horas após serem ovulados podem gerar taxa de concepções similares às encontradas para coberturas realizadas próximas ao momento da ovulação (Hunter, 1990).

Além disso, deve-se também considerar a fertilidade do garanhão que também participa como importante fonte de variação para a fertilidade do rebanho. Da mesma forma que para as éguas velhas e de baixa fertilidade, a utilização de garanhões velhos, e possuindo baixa qualidade seminal, implica em menores índices de concepção por ciclo estral, caso não sejam adequadamente manejados. A partir deste raciocínio, estratégias de manejo de palpação, a cada 12 ou 24 horas, poderiam ser utilizadas como alternativas viáveis e aplicáveis para determinar situações nas quais o garanhão, ou mesmo algumas éguas, exigem que sejam adotadas para se conseguir bons índices de fertilidade, a partir de animais limitados para esta função.

O presente experimento objetivou determinar a taxa de fertilidade de éguas mestiças cobertas, por monta natural após a ovulação, seguindo-se o manejo de palpação retal a cada 12 ou 24 horas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alguns aspectos da reprodução equina

2.1.1 Sazonalidade

A espécie eqüina é poliéstrica sazonal, com o início da estação de monta ocorrendo na primavera, associada com o aumento da luminosidade diária, da temperatura e da disponibilidade de alimento. Assim como em outras espécies sazonais, possui ritmo reprodutivo circanual que sincroniza seu padrão endógeno entre o inverno e o verão (Nagy et al., 2000), assegurando que o produto nasça em condições climáticas favoráveis e no momento do ano apropriado (Aljarrah, 2004).

A mudança anual no fotoperíodo é o fator ambiental primário usado para regular o ciclo estral da égua, modulando a atividade reprodutiva, via glândula pineal, por meio da melatonina que regula a secreção do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH). Quando o comprimento do dia é curto (inverno), a melatonina liberada pela glândula pineal suprime a síntese e liberação de GnRH. Contudo, no verão, com os dias tendo maior comprimento da fase clara, a secreção de melatonina é menor e sua influência inibitória, sobre a reprodução, é removida (Aljarrah, 2004).

A melatonina influencia a liberação de GnRH em pontos diferentes do cérebro, segundo o modelo estudado, podendo ser encontrada próxima da área mediobasal do hipotálamo em carneiros, na área supraquiasmática em hamsters e eqüinos e na porção da *pars tuberalis* em cavalos e jumentos (Gerlach e Aurich, 2000). Apesar da divergência quanto ao local preciso de atuação da melatonina, considera-se que, em mamíferos, ela iniba a liberação de LH induzida pelo GnRH, por diminuir a concentração intracelular de adenosinamonofosfato cíclico (AMPC) e bloquear a mobilização e o influxo de Ca^{2+} , através dos canais voltagem-regulados, nos gonadotropos (Pang et al., 1998).

A inibição da secreção de GnRH não ocorre somente pela ação da melatonina. Há uma complexa cadeia de interneurônios que

envolvem diferentes neurotransmissores dentro do hipotálamo, talvez por caminhos independentes que mediam o efeito dos fatores internos e externos, tais como o ritmo endógeno, o fotoperíodo, a nutrição e a temperatura (Nagy et al., 2000).

Na espécie eqüina, os dados com relação aos neurotransmissores, ainda são escassos. Alguns estudos com peptídeos opióides endógenos (POEs) (Smith e Jennes, 2001) determinaram que sua ação ocorre, primariamente, no sistema nervoso central (SNC) por meio da sensibilização dos receptores μ -, δ - e κ -opióide, nas áreas pré-óptica e hipotalâmica. Tais peptídeos transmitem as informações do ambiente esteroideal aos neurônios de GnRH, através da inibição de interneurônios (Cosgrove et al., 1993; Smith e Jennes, 2001), modulando, assim, a liberação de LH em fêmeas cíclicas (Aurich et al., 1996a).

A ação inibitória dos POEs, sobre a liberação de gonadotropinas, é regulada por uma seqüência de mudanças entre os hormônios esteróides gonadais. Assim, é preciso que haja ação prolongada do estrógeno, pois a progesterona sozinha não é suficiente para ativar a regulação da secreção de LH, através do sistema opióide em éguas, durante a estação de monta (Aurich et al., 1996a).

Em ratos, o estrógeno induz a manifestação de receptores de progesterona nos neurônios produtores de opióides endógenos, inibindo a liberação de GnRH. Esses neurônios são expostos ao estrógeno antes de serem ativados pela progesterona. Este mecanismo é semelhante em eqüinos e pode tentar explicar o mecanismo pelo qual a progesterona, por si só, não influencia a regulação da liberação de LH através dos POEs. Mas, modula a atividade dos opióides em animais que foram primeiramente expostos ao estradiol (Aurich et al., 1996b).

Apesar de haver divergência sobre a atuação dos POEs, durante a estação não-reprodutiva de animais sazonais, pode-se afirmar que, em eqüinos, ocorre inibição da secreção de LH mediada pelos peptídeos opióides endógenos. Isto porque, fora da estação reprodutiva, as éguas respondem com aumento imediato da concentração plasmática de LH, após injeções de naloxone (antagonista de opióides). Este mecanismo pode contribuir para o decréscimo na concentração de gonadotropinas, durante o anestro sazonal (Aurich et al., 1996a). Neste período, a inibição do LH, por meio dos peptídeos opióides endógenos, é maior porque as éguas apresentam certo grau de atividade ovariana, com prolongada influência das baixas concentrações de estrógeno (Aurich et al., 1996ab; Nagy et al., 2000).

Além do sistema opióide, os neurônios produtores de catecolaminas também têm sido implicados na supressão sazonal da secreção de GnRH (Nagy et al., 2000). Segundo Fitzgerald e Mellbye (1988), a administração de um agonista α -2-adrenérgico, em éguas com anestro sazonal, aumenta a frequência dos pulsos de FSH e LH, sugerindo a existência do mecanismo inibitório adrenérgico sobre a pulsatilidade sazonal de LH.

A dopamina, em ovelhas, parece mediar a retroalimentação negativa do estradiol sobre o anestro sazonal, por agir, diretamente, sobre os neurônios GnRH. Já em éguas, os efeitos dos antagonistas de dopamina sobre o início da atividade reprodutiva são altamente variáveis, sendo questionável o papel da dopamina na regulação sazonal nesta espécie (Nagy et al., 2000).

Apesar de existirem receptores de dopamina do tipo D-2 no cérebro das éguas, trabalhos utilizando doperidone (antagonista dopaminérgico que não ultrapassa a barreira hematoencefálica) demonstraram que a dopamina pode atuar

diretamente no ovário, ligando-se aos receptores D-2 do córtex ovariano, presentes nas células da granulosa ou da teca. A descoberta da produção de uma neurotropina, gonadotropina dependente, pelos folículos antrais na ovelha, fornece evidência para o mecanismo pelo qual pode haver o controle dinâmico da proliferação neuronal da estrutura ovariana (King et al., 2005).

A administração de antagonista dopaminérgico resulta no aumento da secreção de prolactina que pode exercer efeito, a nível ovariano, por elevar o número de receptores de gonadotropinas e, desta forma, mediando o efeito das gonadotropinas circulantes. O tratamento prolongado com antagonista de receptores D2-dopamina induz à ciclicidade ovariana de éguas em anestro sazonal. Todavia, quando usado em éguas em anestro profundo, são necessários 50 a 60 dias para induzir a atividade ovariana (Kelley, 2004; King et al., 2005).

Os dados disponíveis na literatura indicam que os antagonistas de dopamina aceleram o início da atividade ovariana cíclica de éguas no período de transição reprodutiva. Mas, o tratamento pode ser inefetivo durante o anestro profundo. Esses achados sugerem, mas não confirmam completamente, a hipótese de que a dopamina, assim como outros neurotransmissores, exerce inibição tônica no controle hipotalâmico da ciclicidade sazonal da égua. É possível que o antagonista dopaminérgico exerça seu efeito sobre a atividade ovariana, incrementando a responsividade do ovário às gonadotropinas circulantes, por meio do aumento dos receptores de LH e FSH, induzidos pela prolactina (Aljarrah, 2004).

2.1.2 Ciclo estral, dinâmica folicular e ovulação na égua

O ciclo estral é definido como o período entre duas ovulações subseqüentes, acompanhadas por estro e concentrações plasmáticas de progesterona abaixo de 1ng/ml (Hughes et al., 1975), podendo ser dividido em fase folicular (processo ovulatório) e luteal ou diestro (Bain, 1957; Hughes et al., 1975; Blanchard et al., 1998).

A fase folicular, também conhecida como estro, varia em seu comprimento de quatro a sete dias, na égua. É acompanhada pelo crescimento folicular, seleção, maturação e, então, ovulação, que resulta em rápido decréscimo das concentrações plasmáticas de estrógeno. A fase luteal, considerada como o período restante do ciclo estral, possui cerca de 14 a 15 dias de comprimento e é variável de acordo com a duração do estro. Ela se inicia com a ovulação, através da formação do corpo lúteo e com a conseqüente secreção de progesterona (Ginther, 1979; Murrell, 2003).

A regularidade do ciclo estral é determinada pelo balanço dos hormônios produzidos pela glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários e endométrio. O hipotálamo, considerado ponto chave do comando reprodutivo, produz um hormônio decaeptídeo (GnRH), liberado no sistema porta hipotalâmico-hipofisário, afim de estimular a síntese e a liberação de gonadotropinas: hormônio foliculo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), responsáveis pela maturação folicular, produção de estrógeno, ovulação e luteinização do corpo lúteo (CL) (Aljarrah, 2004).

Na espécie eqüina (Ginther et al., 2004; 2005), assim como na mulher, o ciclo estral é caracterizado por ondas de crescimento folicular ovariano (Hughes et al., 1972;

Shirazi et al., 2002), com dois padrões típicos: onda folicular maior - possui folículos dominante e subordinado, podendo normalmente iniciar-se na metade final do ciclo estral e terminar com a subseqüente ovulação; e onda folicular menor - o maior folículo não atinge o diâmetro necessário para promover a divergência entre os futuros folículos subordinados, iniciando-se entre o final do ciclo estral e início do diestro (Dinger e Noiles, 1984). As ondas que emergem na metade final do ciclo estral e culminam na ovulação são classificadas como ondas foliculares primárias, sendo que as ondas que surgem entre o final do ciclo e início do diestro são denominadas secundárias (Gastal, 1999).

A emergência de uma onda folicular ovariana é estimulada pelo pico de FSH (Dinger e Noiles, 1984; Gastal, 1999) que, na espécie eqüina, é responsável pelo recrutamento de folículos com diâmetro de, aproximadamente, 13 mm. Quatro a cinco dias após a concentração plasmática de FSH ter atingido o seu valor máximo, os dois maiores folículos alcançam o diâmetro médio de 22 e 19 mm. Neste momento, os folículos iniciam a divergência do diâmetro, caracterizada pela seleção e crescimento contínuo do maior folículo, que será considerado como dominante, enquanto os folículos remanescentes, considerados como subordinados (Gastal, 1999), reduzem sua taxa de crescimento.

A diferença do diâmetro entre os dois maiores folículos, no início da divergência, é equivalente a um período de crescimento de, aproximadamente, 24 horas. Aparentemente, este é o momento para que o maior folículo estabeleça o processo de dominância, antes que o segundo maior folículo alcance diâmetro similar. Neste momento, o futuro folículo dominante (FD) exerce papel primário na supressão da concentração circulante de FSH (Ginther, 2000; Ginther et al., 2003).

O crescimento do FD, após o processo de seleção, é menos dependente de FSH, cuja concentração é mantida em níveis basais devido a produção de estrógeno (E_2) e inibina, que fazem retroalimentação negativa a nível hipofisário. Contudo, a manutenção de uma concentração plasmática mínima de FSH é essencial para sua sobrevivência; e a sua supressão, a baixo do nível basal, predispõe o folículo dominante à atresia (Mihm e Bleach, 2003).

Após o processo de seleção, o crescimento e a atividade estrogênica do folículo são controlados pelos pulsos de LH. O folículo selecionado pode, ao superar a dependência de FSH, tornar-se extremamente sensível à pulsatilidade do LH, ao adquirir receptores para esse hormônio nas células da granulosa, bem como pela síntese de enzimas esteroidogênicas (Macmillan et al., 2003; Rawlings et al., 2003), que são fundamentais à expressão gênica da enzima aromatase (conversora de androstenediona em estradiol) nas células da granulosa (Fair, 2003; Mihm e Bleach, 2003).

A dependência de menores concentrações de FSH para a manutenção do crescimento do FD coincide com a elevação do estradiol e de fatores de crescimento locais (Ginther, 2000), bem como as menores concentrações de proteínas ligadoras de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFBP-2, 4 e 5). As baixas concentrações de IGFBPs disponibilizam maiores concentrações intrafoliculares de fatores de crescimento semelhantes à insulina livres (IGF) (Granger et al., 1989), induzindo à expressão dos receptores de LH e regulando a atividade da aromatase (Fortune, 2003).

Os IGFs, tipo- 1 e 2, estimulam a atividade mitogênica e a esteroidogênica das células da teca e da granulosa, por meio de mecanismos endócrinos, autócrinos e parácrinos (Voge et al., 2004),

amplificando os efeitos endócrinos do FSH e permitindo, ao futuro FD, a rápida regulação da produção de estradiol. Desta maneira, a supressão do FSH circulante, por meio da elevação da concentração de estradiol, previne os folículos subordinados de adquirirem a dominância, sem que haja interferência do desenvolvimento do folículo selecionado para ovular (Fortune, 2003).

Associado ao IGF, os folículos dominantes apresentam aumento na concentração da proteína plasmática associada à prenhez (PAPP-A), uma enzima que promove rápida mudança nas concentrações intrafoliculares de IGFBP, ao degradar dois subtipos de proteínas ligadoras (IGFBP-4 e 5) e, conseqüentemente, levam ao aumento dos níveis intrafoliculares de IGF-1 (Fortune et al., 2004). As concentrações intrafoliculares de IGF-1 e de IGFBP-3 permanecem relativamente constantes durante o crescimento folicular. Todavia, os níveis de IGFBP-2, 4 e 5 variam bastante, indicando que a biodisponibilidade de IGF-1 no folículo é ditada por mudanças nos níveis das IGFBPs (Voge et al., 2004).

A avaliação das mudanças temporais nas concentrações do E_2 , IGF, IGFBP e PAPP-A do fluido folicular, sugere que o aumento desta última proteína é a diferença bioquímica mais precocemente detectável, no futuro folículo dominante; e que a seleção folicular é resultante de uma série de mudanças iniciando-se com a expressão da PAPP-A (Fortune et al., 2003). Em equinos, o estradiol, o IGF-1 livre, a ativina-A e a inibina-A começam a aumentar, diferencialmente, no futuro folículo dominante cerca de um dia antes da divergência folicular (Ginther et al., 2003; Deichsel et al., 2006).

Tem sido postulado que a seleção do FD, na espécie eqüina, é dependente da associação das mudanças na concentração

de FSH e do crescimento e desenvolvimento folicular. A elevação nas concentrações de LH circulantes foi determinada próximo à divergência, e pode exercer papel no crescimento contínuo do maior folículo (Ginther et al., 2003). No entanto, não é conhecido se o LH começa a ser utilizado pelo maior folículo antes, durante ou após o início da divergência folicular. Alguns estudos sugerem que o LH não influencia o crescimento do FD, em equinos, até que se inicie a divergência (Gastal, 1999; Ginther, 2000).

Após a divergência, quando o folículo atinge o estágio pré-ovulatório de ± 40 mm, na espécie equina, há aumento da concentração plasmática de LH desencadeando uma série de eventos que comprometem a integridade do tecido ovariano, levando à ovulação (Murdoch et al., 1986). O local da ruptura ovariana (estigma) desenvolve-se nas células epiteliais onde o folículo está em íntimo contato com a superfície ovariana (Murdoch, 1996).

O complexo estrutural e secretório, além das outras mudanças funcionais que ocorrem no ovário no momento da ovulação, estão intimamente associados com as mudanças locais do fluxo sanguíneo dentro da parede do folículo pré-ovulatório. Estes eventos estão associados às interações entre peptídeos vasoativos, prostaglandinas e esteróides que exercem papel chave na cascata da ovulação (Acosta e Miyamoto, 2004).

A liberação de prostaglandina folicular, que inicia o processo de lise da parede do folículo, está associada com o aumento da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) que aumenta o fluxo sanguíneo ovariano e, conseqüentemente, ativa os peptídeos vasoativos: angiotensina II (Ang II), endotelina-1 (ET-1) e o peptídeo atrial natriurético (ANP). Estes peptídeos promovem a modulação do tônus vascular

sistêmico e alteram o fluxo sanguíneo folicular, contribuindo para o processo de ovulação (Acosta et al., 1999).

O fato da ET-1 estimular a liberação do ANP, e este estimular a liberação de Ang II, indica que esses peptídeos atuam localmente, semelhante a uma reação em cadeia. Esta cascata pode mediar a ação do LH para acelerar a produção de prostaglandinas, durante o período pré-ovulatório (Acosta et al., 1999). Estudos *in vivo* com bovinos, a Ang II inibe, diretamente, a liberação de ANP da camada das células da teca de folículos maduros. Isto implica que a Ang II, no fluido extracelular das células da teca, modula a produção local de ANP e ET-1 nos folículos de bovinos. Desta forma, a ET-1 e o ANP podem exercer papel permissivo ou de modulação na produção local ovariana de Ang II (Acosta e Miyamoto, 2004).

Em resposta à elevação do LH, ocorre secreção dos peptídeos vasoativos, juntamente com a uroquinase e o plasminogênico ativador. Estas substâncias ativam as collagenases latentes e estimulam a liberação do fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- α). Este, induz, progressivamente, a expressão gênica das metaloproteinases, a apoptose e a resposta inflamatória (Murdoch e McDonnel, 2002).

A liberação de collagenases e a morte celular são eventos que precedem a formação do estigma e a ruptura ovariana (Murdoch, 1996). Para que ocorra a quebra do colágeno é necessário que as células da teca, que são dependentes da 9-ceto-PGE₂-redutase, convertam o PGE₂ em PGF_{2 α} (Weems et al., 2006). Este processo induz a liberação do TNF- α que pode promover a transdução de sinais apoptóticos, resultando na morte celular programada. Esta se caracteriza pela ativação de endonucleases, por fragmentação internucleossomal do DNA, além da condensação nuclear e citoplasmática

(Murdoch et al., 1997). Esta onda apoptótica inicial é sucedida por necrose (degeneração indiscriminada de DNA e lise celular), extravasamento de células sanguíneas e colapso vascular. No local da isquemia e, conseqüentemente, da iminente ruptura, os folículos são, essencialmente, destituídos da superfície ovariana. As collagenases, induzidas pelo TNF- α , desorganizam a rede de fibras da teca e da túnica albugínea (via matriz metaloproteinase 1 - MMP-1), promovendo a digestão da base da membrana que sustenta o epitélio ovariano e da granulosa (via MMP-2). A proteólise e a remoção celular causam o progressivo estreitamento da parede ovariana, com a conseqüente formação do estigma e a ruptura folicular (Murdoch e McDonnel, 2002).

Os estudos realizados para demonstrar o envolvimento dos diferentes sistemas na ruptura do folículo pré-ovulatório (Murdoch, 1996; Murdoch et al., 1997; Acosta et al., 1999; Murdoch e McDonnel, 2002; Acosta e Miyamoto, 2004) não envolveram a égua como modelo experimental. Apesar de haver inversão das camadas do estroma ovariano eqüino, a cadeia de eventos deve ser similar, já que o ponto principal de ação dos peptídeos vasoativos e das prostaglandinas, bem como do TNF- α , são as células epiteliais do folículo que estão em íntimo contato com a superfície ovariana que, na égua, é a fossa de ovulação.

2.1.3 Desenvolvimento e maturação do oócito

O número de oócitos com os quais a fêmea nasce depende do nível de FSH embrionário (Mayes, 2002). A oogênese está completa antes ou logo após o nascimento, em todos os mamíferos domésticos. As oogônias se multiplicam por mitose depois da diferenciação sexual, durante a fase embrionária-fetal, até a formação dos oócitos primários, que serão

destinados a sofrer divisão por meiose. Após o nascimento, os oócitos crescem ampliando seu citoplasma e desenvolvem uma membrana, a zona pelúcida, simultaneamente com a proliferação de células epiteliais adjacentes, as futuras células da granulosa (Franz, 2002; González, 2002).

O oócito necessita sofrer meiose para tornar-se uma célula haplóide ($1n$ de DNA), cujo processo se inicia, aproximadamente, entre os dias 75 e 80 após o nascimento. A partir daí, progride por vários estádios transitórios da prófase e permanece no estádio de diplóteno (Mayes, 2002), ao entrar no estádio dictiado (última fase da prófase I da meiose). Nesta fase possui cromossomos altamente difusos e envolvidos pela membrana nuclear (estádio de vesícula germinal) e permanecem, neste estádio, mesmo durante o contínuo crescimento folicular, não retomando a meiose até a puberdade, quando sofrerá influência das gonadotropinas (Franz, 2002).

Os oócitos de mamíferos sofrem crescimento significativo durante a oogênese, seguida por grandes modificações citoplasmáticas e nucleares, imediatamente antes da ovulação, no processo conhecido por maturação oocitária (Fissore et al., 2002). A habilidade para ser fecundado depende da ocorrência normal da maturação, tanto nuclear quanto citoplasmática. A maturação nuclear pode ser facilmente identificada pela configuração cromossômica. Já a citoplasmática, necessária ao desenvolvimento pós-fecundação, é pouco avaliada (Fernandes, 2004).

A maturação oocitária, ponto determinante para aquisição da capacidade para ser fecundado, ocorre em duas fases. A primeira é conhecida como fase de crescimento e confere ao oócito a

capacidade de reiniciar a meiose, regulando a síntese de proteínas e a formação de organelas, que o diferencia em um gameta funcional. A segunda fase, caracterizada pelo reinício da meiose, é normalmente denominada de maturação final do oócito e ocorre após a puberdade, em folículos pré-ovulatórios (Fernandes, 2004).

A maturação oocitária é regulada pela combinação de efeitos das células foliculares, dos hormônios esteroidais, das gonadotropinas hipofisárias e dos fatores de crescimento, que possibilitam a maximização do desenvolvimento embrionário após a fecundação. Assim, a penetração de um espermatozóide no oócito inicia uma prolongada oscilação na concentração intracelular de cálcio livre, responsável pelos eventos da ativação do oócito e início do desenvolvimento embrionário (Fissore et al., 2002).

A completa maturação nuclear, por si só, não garante o subsequente desenvolvimento embrionário. As transformações citoplasmáticas que preparam a célula para suportar a fecundação e o início do desenvolvimento embrionário, também auxiliam no processo de maturação (Mayes, 2002). O desenvolvimento citoplasmático inclui a ocorrência de processos estágio-específicos, tais como: síntese de proteínas, liberação de grânulos corticais e de cálcio dos estoques intracelulares, realocização das mitocôndrias e descondensação da cabeça do espermatozóide. Semelhante ao que ocorre no núcleo, a maturação do citoplasma é adquirida por etapas que requerem o completo desenvolvimento antral e a permanência funcional das junções comunicantes (ou tipo *gap*) entre as células somáticas (da granulosa) e a germinativa (Cecconi, 2002).

As junções comunicantes são canais compostos por proteínas da família das conexinas (Cx; proteínas integrais de

membrana), que mediam a maioria das informações entre as células da granulosa e o oócito. Através destas junções, de modo heterólogo, as células da granulosa auxiliam o crescimento das células germinativas e previnem a retomada prematura da meiose, por transferirem fatores inibidores às células, tais como as purinas e a adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (Cecconi, 2002).

O AMPc exerce papel central na regulação da maturação meiótica do oócito de mamíferos, atuando por meio da proteína G, que ativa (G_s) ou inibe (G_i) a adenilato ciclase, que é a enzima responsável por sua formação (Jamnongjit e Hammes, 2005). As elevadas concentrações de AMPc, no oócito, estão implicadas na parada meiótica; a queda na sua concentração é essencial para o reinício da meiose. No entanto, a estimulação do processo ovulatório pelo LH, incluindo o retorno do processo meiótico, está claramente associado com o aumento da concentração de AMPc nas células somáticas dos folículos (Laforest, 2005). Este paradoxo é o resultado, provavelmente, da regulação seletiva das fosfodiesterases (PEDs) específicas dos compartimentos das células somáticas e germinativas do folículo pré-ovulatório. Desta forma, a regulação diferencial das PEDs, pelas gonadotropinas nas células somáticas, que contém PDE4 e, nas células germinativas, que contém PED3, pode estar envolvida na regulação dos valores de AMPc. Estes eventos explicariam o declínio da concentração de AMPc no oócito permitindo a retomada da meiose, concomitante à sua elevação nos compartimentos das células somáticas, em resposta à estimulação pelo LH (Wiersma et al., 1998).

As PEDs atuam, essencialmente, metabolizando o AMPc e transformando-o no metabólito 5'-AMP, que é inefetivo para ativar a proteína quinase A (PKA) (Sirard et al., 1996). Os mecanismos que

controlam a sua atividade não são bem compreendidos, mas envolvem, a curto prazo, a ativação da PKA e, a longo prazo, a regulação na expressão do RNAm e de certas proteínas ovarianas. Além destas vias, especula-se que a purina, hipoxantina, iniba a ação das PEDs no metabolismo do AMPc (Jamnongjit e Hammes, 2005).

Sugere-se que os fatores inibitórios da retomada da meiose são produzidos nas células da teca e/ou da granulosa da parede folicular ovariana. Em bovinos, alguns experimentos demonstraram que a maturação do oócito é regulada pelo seu contato com as células da granulosa ou com o complexo *cumulus oophorus*, já que a perda desta comunicação induz à maturação oocitária (Sirard et al., 1996). Já Sirard e Coenen (1993) negam a necessidade desse contato para que ocorra a estagnação da maturação do oócito.

Apesar de haver divergência entre os trabalhos que tentam determinar a importância da coesão entre as células de contato do oócito com a parede folicular, frente à parada meiótica, é bem conhecido que a presença das junções comunicantes, entre células localizadas dentro da membrana basal do folículo, resulta na formação de um sincício eletrofisiológico. Este complexo permite a transferência, em duas vias, de moléculas entre as células somáticas e as germinativas. Isto favorece a transferência de fatores, tais como AMPc, que poderão manter a quiescência meiótica do oócito (Sirard et al., 1996).

Em ratos, a retomada da meiose tem sido correlacionada com a perda de células do *cumulus oophorus* nas junções comunicantes. Em bovinos, a mesma correlação tem sido feita, mas a junção permanece funcional até a metáfase-II, que leva à pressuposição de que o decréscimo nas junções comunicantes é, apenas, cronologicamente correlacionado. Todavia, outros fatores são necessários para

controlar a parada meiótica (Sirard et al., 1996).

Diferente dos mamíferos, as linhas de pesquisas sobre o controle da maturação do oócito em vertebrados, como teleósteos e anfíbios, têm focado a produção e ação de um hormônio indutor da maturação (MIH) que desencadeia, diretamente, a retomada da meiose. As informações atuais indicam que este processo ocorre em duas fases: durante o primeiro estágio de maturação, as células somáticas do folículo adquirem a habilidade em produzir MIH, responsável pela aquisição da competência de maturação oocitária (OMC). No segundo estágio, as células do folículo produzem MIH e liberam o oócito da estase meiótica. Nestes eventos estão implicados o IGF-I e a serotonina, dentre outros fatores que podem mediar ou modular a ação do LH em induzir a OMC que requer a ativação da proteína quinase A (Patiño et al. 2001).

É bem provável que o folículo ovariano necessite tanto de fatores inibitórios quanto de estimulatórios para que o oócito ovulado esteja no correto estado nuclear para fundir-se ao espermatozóide. Para isto, ele requer interações altamente dinâmicas e a atividade sintética constante no compartimento folicular. Desta forma, é improvável que um simples produto possa ser reconhecido como o regulador chave do controle meiótico do oócito (Sirard et al., 1996).

2.1.4 Ativação e fecundação do oócito

A interação do espermatozóide com o oócito ocorre sob três níveis distintos, durante a fecundação: (i) na camada do *cumulus oophorus*; (ii) na zona pelúcida (ZP) induzindo a excitose do conteúdo acrossômico espermático; (iii) na membrana plasmática do oócito, que se inicia com a adesão ao oolema e termina com a fusão da membrana espermática (Evans, 2002). Para que isto ocorra, o

espermatozóide fecundante precisa passar por um laborioso processo, pois é incapaz de fecundar o oócito, sem que antes sofra algumas modificações (Amann e Graham, 1993). Logo, ele deve permanecer no trato reprodutivo feminino, por algum tempo, para que possa sofrer tais alterações e tornar-se capaz de se unir e penetrar no oócito (Bedford, 1983).

Após a deposição do sêmen, no útero da égua, o espermatozóide precisa ser transportado até o local da fecundação, ser mantido no trato feminino até que ocorra a ovulação e ser preparado para fecundar o oócito liberado. A motilidade espermática, a contração miometrial e a inflamação uterina espontânea pós-cobertura são fatores importantes para o transporte e a sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo da fêmea. O útero inflamado se torna um local hostil, devido aos espermatozoides desencadearem o influxo de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) para o lúmen uterino, via ativação do sistema complemento (Troedsson et al., 1998).

A cascata do complemento media uma série de reações biológicas incluindo: aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização para fagocitose, ativação da lipase na membrana e lise de organismos-alvo. A ativação desta cascata resulta na clivagem do fator C5 em C5a e C5b, sendo o fator complemento C5a responsável pela quimiotaxia dos PMNs (Troedsson et al., 1995), que se ligam e fagocitam os espermatozoides. A base molecular desta ligação ainda não é conhecida. Após a ligação, os espermatozoides são fagocitados pelos PMNs ativados liberando, conseqüentemente, $PGF_{2\alpha}$ das membranas celulares, produto resultante do metabolismo do ácido aracdônico, via enzima cicloxigenase (Troedsson et al., 1998). Além de ser um mediador inflamatório, a $PGF_{2\alpha}$ causa contração da musculatura lisa do miométrio. Assim,

contribui para a remoção física dos fluidos e dos produtos inflamatórios nocivos liberados durante o processo inflamatório (Troedsson et al., 2005; Fiala et al., 2006).

Frente a esse processo, acredita-se que o plasma seminal seja importante no transporte espermático. Ele possui efeitos inibitórios sobre a quimiotaxia e fagocitose dos polimorfos nucleares, uma vez que contém ocitocina e prostaglandina que podem proteger os espermatozoides, quando no útero (Katila, 2001). Em eqüinos, o aumento no transporte espermático e no fluxo sangüíneo para o útero e tuba uterina, tem sido associado com a presença do plasma seminal. Embora seus componentes tenham sido implicados influenciando o transporte espermático, em várias espécies, esta informação, na espécie eqüina, ainda é limitada. Em trabalhos com suínos, acredita-se que a presença de estrógeno, no plasma seminal, tenha efeito positivo sobre o transporte espermático e a fecundação (Claus e Schams, 1990).

Os espermatozoides, quando no trato reprodutivo da fêmea, necessitam atingir a tuba uterina, dentro de poucas horas, para que possam evitar a fagocitose por parte dos PMNs. Estes estão presentes no lúmen uterino, cerca de 30 minutos após a cobertura, alcançando concentração máxima entre oito e 24 horas. Em eqüinos, vários estudos demonstram que um grande número de espermatozoides está presente na tuba uterina após quatro horas da cobertura (Fiala et al., 2006). A partir daí, eles podem ser armazenados, no estado funcional, por vários dias (Troedsson et al., 1998).

Nos eqüinos, o principal local de armazenamento (reservatório espermático) parece ser a tuba uterina, especificamente a região caudal do istmo, onde ocorre a capacitação espermática (Delpech e Thibault, 1993). Durante a passagem pelo

trato reprodutivo, com a subsequente chegada à tuba uterina, os espermatozoides sofrem alterações, principalmente nos componentes da membrana plasmática, que podem ser acrescentados ou removidos pelas secreções do trato genital feminino, provocando a desestabilização da bicamada fosfolipídica. Conseqüentemente, ocorrerá fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa, iniciando-se o processo de reação acrossômica (Amann e Graham, 1993; Bazer et al., 1995), além das alterações na motilidade que resultam em hiperativação do espermatozoide (Bedford, 1983; Delpech e Thibault, 1993).

Para manter a integridade da membrana, durante o transporte pelo trato genital feminino, as proteínas do plasma seminal se aderem à membrana espermática, formando uma camada de glicoproteínas. Os espermatozoides, ao passarem do plasma seminal para os fluidos do trato genital feminino, sofrem algumas alterações, tais como remoção ou modificação da camada glicoprotéica (Gadella et al., 2001); alteração do fluxo iônico transmembrana; exposição dos sítios de receptores da membrana espermática; remoção dos componentes que cobrem a cauda, evitando que haja restrição da motilidade hiperativa do flagelo. Outras mudanças também ocorrem nas porções caudal e rostral da cabeça do espermatozoide, precedendo a reação acrossômica; e nas peças intermediária e principal, antecedendo a hipermotilidade (Amann e Graham, 1993).

As mudanças nos componentes da membrana espermática seguem-se, progressivamente, com perda ou redução do peso molecular de suas proteínas, redução da proporção de colesterol/fosfolipídio, além do aumento da mobilidade lateral de lipídios e proteínas. A redução da proporção de colesterol/fosfolipídios, nas membranas plasmática e acrossomal, aumenta sua fluidez (Delpech e Thibault, 1993), ocorrendo efluxo de colesterol pela

sua transferência para as albuminas e as lipoproteínas de alta densidade da tuba uterina (Amann e Graham, 1993).

O colesterol tem uma importante função na estabilização das membranas. A sua remoção desestabiliza a membrana promovendo a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo a redistribuição de proteínas integrais (Amann e Graham, 1993). Existem evidências que o bicarbonato também facilita a desorganização da membrana (Gadella et al., 2001), principalmente na região apical da cabeça do espermatozoide. A desestabilização, por afetar a porção lipídica da membrana, altera sua permeabilidade iônica, particularmente para o cálcio, além de também modificar suas propriedades fusogênicas, que são importantes para a reação acrossômica (Amann e Graham, 1993).

O processo de capacitação espermática, *in vivo*, depende tanto do Ca^{2+} quanto do bicarbonato que, supostamente, está presente em maiores concentrações na tuba uterina (20 mM) do que no fluido espermático (<1 mM; Colenbrander et al., 2002). O bicarbonato estimula uma forma solúvel da adenilciclase (AC), abundante nos espermatozoides. Como resultado, tem-se aumento dos níveis de AMPc que ativa a proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, induz a fosforilação de tirosina de vários substratos (Gadella et al., 2001). Esta fosforilação media uma variedade de funções celulares, tais como: regulação do crescimento, controle de ciclos celulares, regulação de íons, formação do citoesqueleto, além de ativar as proteínas da membrana plasmática relacionadas com a ligação à zona pelúcida (Visconti e Kopf, 1998), importante no processo de capacitação.

Quando em baixas concentrações, os radicais livres, tais como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) e o óxido nítrico (NO₂), em sua maioria originados de atividade metabólica normal dos espermatozóides, têm um papel importante na função espermática, especificamente na fosforilação de tirosina (Lamirande et al., 1997). Eles podem induzir à hiperativação, capacitação e reação acrossômica. Todavia, quando em altas concentrações são prejudiciais à célula espermática (Ball et al., 2002).

Os processos de hiperativação e capacitação espermática envolvem mecanismos distintos (Bedford, 1983; Amann e Graham, 1993). A liberação de colesterol e a redistribuição de proteínas da membrana plasmática permitem a abertura dos canais de cálcio e, conseqüentemente, o aumento do cálcio intracelular. Há evidências de que a hiperativação esteja mais relacionada aos níveis celulares de AMPc, que é cálcio dependente. O progressivo aumento nos níveis de AMPc precede o início da motilidade hiperativada (Delpech e Thibault, 1993).

Bedford (1983) sugere que a hiperativação maximiza a chance de contato do oócito com os poucos espermatozóides presentes na ampola, além de ajudar no transporte espermático do istmo inferior para a ampola, facilitando a penetração no oócito.

Segundo Gadella e Colenbrander (2003), a hipermotilidade induzida pelo bicarbonato, causando a fosforilação da tirosina, pode agir na cauda espermática, levando ao aumento da amplitude do batimento flagelar. Isto se deve tanto à maior flexibilidade da peça intermediária quanto pela mudança do movimento progressivo para circular, devido a não rotação da cabeça do espermatozóide (Bedford, 1983; Delpech e Thibault, 1993).

Juntamente com a hiperativação, o espermatozóide passa pelo processo de capacitação. Durante este evento, ocorrem modificações necessárias no acrossoma

para que o espermatozóide possa penetrar no oócito. Para isto ocorre a reação acrossômica, caracterizada pela fusão das membranas plasmática e acrossomal externa (Amann e Graham, 1993; Bazer et al., 1995). Por esse motivo, as funções da capacitação previnem a ativação prematura do acrossoma, até que o espermatozóide atinja o local de fecundação do oócito, ou seja, a ampola da tuba uterina (Bazer et al., 1995), impedido que isto ocorra precocemente durante a passagem do espermatozóide no trato genital feminino. Embora a duração do processo de capacitação *in vitro* tenha sido determinada para várias espécies, o mesmo não é conhecido *in vivo* (Amann e Graham, 1993).

Próximo da ovulação, os espermatozóides capacitados são liberados do epitélio da tuba uterina e se deslocam até o local da fecundação. A tuba e o próprio oócito parecem coordenar a função espermática e a interação dos gametas (Topfer-Petersen et al., 2000). O oócito liberado na ovulação encontra-se circundado pela zona pelúcida, pelas células da *corona radiata* e, ao redor delas, algumas vezes, há células do *cumulus oophorus*. Estas últimas são impregnadas por progesterona, hormônio capaz de desencadear o estímulo fisiológico da reação acrossomal em uma pequena população de espermatozóides que possui receptor de membrana específico para este hormônio (Meizel e Turner, 1996).

Tanto o *cumulus oophorus* quanto as células foliculares da *corona radiata* devem ser atravessadas pelo espermatozóide para que ele possa atingir a zona pelúcida (ZP). Nesse ponto, ele interage especificamente com o oócito antes da sua penetração (Osman et al., 1989). A proteína espermática de superfície (PH-20), com hialuronidase ativa, é responsável pela passagem do espermatozóide através das camadas do *cumulus oophorus*. Isto foi

provado por um experimento, utilizando anticorpos contra PH-20 (elimina a hialuronidase ativa), que previnem a penetração através da ZP. Por outro lado, a hialuronidase ativa não é requerida para a ligação do espermatozóide à ZP. Tem sido especulado que o domínio do carbono terminal da PH-20 pode funcionar como um domínio de adesão, além de mediar a ligação do espermatozóide à ZP (Myles e Primakoff, 1997).

Após passar pelas células do *cumulus oophorus*, a ZP provê uma barreira para ligação do espermatozóide capacitado, induzindo a reação acrossômica e permitindo sua penetração e fusão ao oolema para que, então, possa bloquear a polispermia. Esse importante papel da ZP foi reconhecido há muitos anos mas, somente há pouco tempo, teve sua ação atribuída à glicoproteínas específicas (D’Cruz, 1996; Wassarman et al. 2004).

Em geral, a zona pelúcida dos oócitos de mamíferos, como os de camundongos, é composta por três glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3), que interagem entre si por ligações não-covalentes. A ZP2 e a ZP3 estão presentes em quantidades aproximadamente iguais e são muito mais abundantes do que a ZP1 (Wassarman et al. 2004). Cada uma das três glicoproteínas consiste de um polipeptídeo único, que é heterogeneamente glicosilado tanto com o oligossacarídeo ligado à asparagina-(N), quanto com o que se liga à serina/treonina-(O) (Gupta et al., 2004).

Dos três componentes, a ZP3 é a responsável tanto pela ligação espermática primária à ZP, quanto pela indução da reação acrossômica, e a ZP2 pode participar na ligação secundária à ZP (Lasserre et al., 2003). A ligação espécie-específica do espermatozóide ao oócito é mediada por oligossacarídeos ligados à ZP3. Os peptídeos da ZP, apesar de específicos, têm várias regiões identificadas que incluem:

uma seqüência de sinais de terminal-N, um grande domínio da ZP, um consenso do local da clivagem pela furina (CFCS) e uma região transmembrana hidrofóbica, próxima ao terminal-C (Wassarman et al. 2004).

Entre o terminal-C do domínio da ZP e o CFCS existe uma região do polipeptídeo da ZP3 que é referida como o local específico de adesão do espermatozóide. Esta região possui resíduos glicosilados de serina (Ser) para que o espermatozóide, com acrossoma intacto, possa se ligar durante a fecundação (Gupta et al., 2004). A ZP3 do camundongo possui cinco resíduos de Ser nesta região (-Ser-Asn-Ser-Ser-Ser-Ser-), mas somente duas dessas (Ser-332 e a Ser-334) têm oligossacarídeo O-ligado, reconhecido pelo espermatozóide. Embora a estrutura desses oligossacarídeos não tenha sido determinada, existem evidências que sugerem que vários açúcares incluindo galactose, fucose e glucosamina-acetil-N, podem estar envolvidos no reconhecimento pelo espermatozóide. É notável que, embora a Ser-332 e a Ser-334 sejam conservadas na ZP3 de camundongos e humanos, esta região sofreu consideráveis mudanças durante a evolução (Wassarman et al., 2004).

Em contraste às informações disponíveis acerca da composição da ZP e do seu papel durante a fecundação, a caracterização da identidade molecular e bioquímica das proteínas espermáticas envolvidas na ligação da ZP, ainda não foram completamente elucidadas. Em humanos, várias proteínas têm sido propostas como participantes da ligação primária e secundária da ZP. Dentre estas estão o antígeno FA-1, receptor zona quinase (ZRK), P34H, lectina-manose, -hexosaminidase (Hex, E.C.3.2.1.52), um antígeno reconhecido pelo anticorpo mitocondrial 4A8, selectinas, proteína YLP12, proteínas reativas anti-SLIP, SOB3, PH20, SP10 e proacrosina. A codificação da seqüência aminoacídica de

algumas dessas proteínas já foi realizada. Contudo, ainda não foi provado que elas são essenciais à interação oócito-espermática (Lasserre et al., 2003).

A penetração da zona pelúcida é um dos passos cruciais para a fecundação. Por isso, os espermatozoides que são incapazes de reconhecerem e de se ligarem às suas glicoproteínas, falham em fecundar o oócito. O reconhecimento do gameta e as próximas interações são realizados pelas associações proteína-carboidrato dos receptores da zona pelúcida que ativam o sinal da cascata, iniciando a exocitose acrossomal pelas reações de fosforilação/defosforilação (Topfer-Petersen et al., 2000).

A interação da ZP com o espermatozoide capacitado, levando à exteriorização das cadeias de oligossacarídeos dentro da estrutura tridimensional da ZP, pode iniciar a formação de um complexo receptor na membrana espermática, mediado pelo cálcio. Estes eventos levam à agregação de moléculas sinalizadoras do complexo que, então, ativam a cascata, com exocitose, penetração da zona pelúcida e a fusão do espermatozoide com o oócito (Topfer-Petersen et al., 2000; Ben-Yosef e Shalgi, 2001).

A fusão das membranas é o evento chave para diversos fenômenos celulares e, dentre eles, a fecundação (Evans, 2002). A fusão leva à adesão da membrana plasmática do espermatozoide ao oolema, e numerosos investigadores têm estudado a contribuição das várias moléculas de adesão celular na fusão do espermatozoide com o oócito (D’Cruz, 1996; Evans, 2002).

A ligação à integrina do oócito é um pré-requisito para a fusão da membrana espermática, durante o processo de fecundação dos mamíferos. Mais especificamente, a integrina $\beta 1$ tem sido implicada como a proteína requerida para a

fusão do espermatozoide (He et al., 2003). O conceito que uma integrina do oócito seja requerida para a fusão de membranas, originou-se da identificação de uma proteína espermática de superfície, a fertilina (originalmente descrita como PH-30; Myles, 1993), que foi implicada na fusão dos gametas (He et al., 2003).

Várias linhas de pesquisa apóiam a hipótese de que a integrina, na superfície do oócito, possa ser o receptor para as moléculas da superfície do espermatozoide que leva à fusão das membranas. As integrinas são determinadas como uma classe de moléculas de adesão que ligam as células à matriz extracelular ou a outras células. Elas são formadas por duas subunidades heterodímeras (α e β), com múltiplos tipos, tanto do α (120-180 kDa) quanto do β (90-110 kDa), e que podem estar associadas (Myles, 1993).

A fertilina é uma proteína da superfície espermática que se liga às integrinas do oócito. Assim como as integrinas, a fertilina é um heterodímero composto por subunidades α e β , pertencentes às desintegrinas e metaloproteinases (ADAM; Primakoff e Myles, 2002). Tem sido proposto que o domínio da desintegrina da fertilina espermática poderá se ligar à integrina do oócito (He et al., 2003).

As integrinas do oócito (Evans, 2002) agem sobre as fertilinas por meio da CD9 em várias células (He et al., 2003). A CD9 pertence à superfamília da tetraspanina (TM4SF), que são proteínas integrais da membrana plasmática. Essas proteínas possuem quatro domínios transmembrana, duas alças extracelulares e três segmentos citoplasmáticos curtos. Elas atuam como “moléculas facilitadoras” por trazerem e estabilizarem complexos moleculares. As tetraspaninas têm sido associadas fisicamente com os membros da família das integrinas, com a classe do complexo de histocompatibilidade maior (MHC), dentre

outras. Embora seu mecanismo preciso de ação permaneça incerto, a tetraspanina (CD9) interage com as integrinas $\alpha\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha4\beta1$ e $\alpha11\beta3$, sendo sugerido que sua ação na sinalização, migração e adesão à matriz extracelular dos substratos seja realizada por intermédio destas integrinas (Chen et al., 1999).

Após o espermatozóide chegar ao espaço perivitelinico (PVS), onde interage com as microvilosidades do oolema, ele é engolfado pelo citoplasma do oócito, onde o núcleo do espermatozóide é descondensado e, mais tarde, transformado no pró-núcleo masculino. A partir deste ponto, a reação dos grânulos corticais é iniciada, a segunda divisão meiótica é retomada e, então, há aumento da atividade metabólica como remodelagem do citoesqueleto (Meng e Wolf, 1997) e, subsequentemente, ocorre a formação do pró-núcleo feminino. Posteriormente, haverá síntese de DNA, tanto no pró-núcleo masculino quanto no feminino, seguido pela união genômica e a primeira divisão meiótica (Kaji e Kudo, 2004).

De todas as reações que se iniciam com a ativação do oócito, a ativação dos grânulos corticais (reação cortical – RC) é considerada como ponto fundamental para impedir a poliespermia. Estes grânulos são organelas especializadas, localizadas no citoplasma do oócito e em íntimo contato com a membrana. Eles aparecem, primeiramente, durante o crescimento do oócito como um produto do complexo de Golgi, e contém uma variedade de enzimas hidrolíticas. A RC envolve a fusão dos grânulos corticais com a membrana plasmática do oócito, liberando seu conteúdo (exocitose) dentro do espaço perivitelinico, em resposta à fecundação. A exocitose, provavelmente, procede por sinais de transdução, similar ao que é descrito para células somáticas (Wassarman, 1993). As enzimas dos grânulos corticais, após sua liberação,

entram na ZP altamente porosa e, por modificarem as glicoproteínas da ZP2 e da ZP3, estabelecem a reação de zona. Este processo é caracterizado pela diminuição da solubilidade da ZP e pela perda da receptividade aos espermatozoides livres, devido à proteólise parcial da ZP2 e pela ação das glicosidases dos grânulos que digerem os oligossacarídeos O-ligados da ZP3 (Liu et al., 1997).

Em algumas espécies, como o ouriço-do-mar e as rãs, a ligação do espermatozóide promove a despolarização imediata da membrana do oócito impedindo, assim, a entrada de mais espermatozoides. Na maioria dos animais estudados, a ligação do espermatozóide induz a uma grande e transitória elevação das concentrações do íon Ca^{2+} , dentro do oócito, que se inicia no local da fecundação e se move por todo o oócito em forma de uma onda (Ben-Yosef e Shalgi, 2001). Esta onda de Ca^{2+} induz a fusão das vesículas corticais com a membrana plasmática, resultando no espessamento do envelope de fecundação (ZP), formando uma barreira à penetração de outros espermatozoides (Hable e Kropf, 2000).

Essa onda transitória de Ca^{2+} é requerida não somente para ativar a reação cortical, mas também para a reativação da meiose, formação pró-nuclear, início da síntese de DNA e progressão normal da clivagem embrionária. Além do mais, pesquisas recentes sugerem que a frequência e a duração do Ca^{2+} podem ter impacto no desenvolvimento dos estádios embrionários pré e pós-implantação. O mecanismo exato pelo qual o espermatozóide inicia a oscilação na $[Ca^{2+}]_i$ no oócito não é completamente entendido, mas sabe-se que envolve a produção de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3). O IP3 se liga aos receptores no retículo endoplasmático, principal local de estoque de Ca^{2+} intracelular, permitindo o efluxo de Ca^{2+} para dentro do citosol

(Ben-Yosef e Shalgi, 2001; Bedford et al., 2004).

Tem sido postulado que a produção de IP3 pode ser iniciada pela proteína G ou por caminhos de sinalização da tirosina quinase ligada aos receptores presentes no oolema. Entretanto, outros estudos mostram que a fusão espermatozóide-oócito precede o aumento transitório do $[Ca^{2+}]_i$, antes de ser detectado o primeiro pico de $[Ca^{2+}]_i$, que é consistente com o tempo requerido para a difusão da molécula fornecida pelo espermatozóide (Bedford et al., 2004).

A primeira onda transitória de $[Ca^{2+}]_i$ é seguida por uma série de ondas mais curtas e de alta amplitude. A oscilação do Ca^{2+} é observada em todos os oócitos de mamíferos estudados, embora sua frequência seja espécie-específica. Em roedores e em humanos, as oscilações são de alta frequência, com intervalos regulares pico a pico, mudando entre dois e quatro minutos. Com o transcorrer da fecundação, a amplitude e a frequência do Ca^{2+} decrescem, enquanto sua duração aumenta até a cessação completa da oscilação do Ca^{2+} , durante a entrada da interfase e da formação do pró-núcleo, várias horas após a entrada do espermatozóide. A oscilação do Ca^{2+} requer influxo contínuo deste íon para preencher os estoques do retículo endoplasmático. Embora uma simples elevação do Ca^{2+} seja suficiente para produzir a ativação, a oscilação pode ser requerida para o desenvolvimento de eventos adicionais (Ben-Yosef e Shalgi, 2001).

Hoje, tem-se a compreensão clara do papel do Ca^{2+} na fecundação, tanto na concentração requerida quanto na sua competência para a ativação do oócito. Todavia, não foi estabelecido como os espermatozoides, durante a fecundação, são capazes de promoverem as mudanças do $[Ca^{2+}]_i$ em oócitos, nem como a mudança nos diferentes padrões de $[Ca^{2+}]_i$ afetam o

desenvolvimento embrionário. Ainda é incerto o desencadeamento da maturação do oócito mediado pelo $[Ca^{2+}]_i$, embora o impedimento de sua mudança intracelular possa inibir a maturação meiótica, em estádios específicos (Homas et al., 1993).

Em resumo, o oócito e os espermatozoides de mamíferos passam por importantes eventos durante o curso da fecundação, sendo que alguns mecanismos são comuns para ambos os gametas. Por exemplo, os eventos que acontecem na fusão das membranas (reação acrossômica, reação cortical e fusão espermatozóide-oócito) e os que envolvem a proteólise da ZP (penetração e reação da ZP). Os três primeiros processos utilizam transdução de sinais intracelulares (do oócito ou do espermatozóide) e, mais tarde, os dois processos subsequentes utilizam enzimas presentes em organelas especializadas, semelhantes à lisossomos (acrossoma e os grânulos corticais) para modificarem as glicoproteínas da ZP. Tanto o espermatozóide quanto o oócito necessitam da adesão de moléculas, espécie-específica, presentes na superfície de interação dos gametas e que precede a fusão. Desta forma, apesar da considerável diferença, o espermatozóide e o oócito usam mecanismos comuns para alcançarem o objetivo da geração de novo produto, por meio do processo de fecundação (Wassarman, 1993).

2.1.5 Envelhecimento do gameta feminino

Na maioria dos mamíferos placentários o oócito, após a ovulação, tem viabilidade bastante curta, com tempo médio de 8 a 10 horas (Hunter, 1990). Na espécie eqüina os dados são conflitantes. Alguns autores (Woods et al., 1990) relatam 12 horas como o tempo máximo de viabilidade do oócito e, para outros (Salzman, 1940), este tempo pode ser muito maior. No entanto, o ponto comum entre todos os estudos que envolvem a qualidade e a viabilidade do

oócito equino, pós-ovulado, é o valor que possui o tempo transcorrido da ovulação à fecundação.

O oócito equino, quanto a seu estágio de desenvolvimento nuclear à ovulação, pode variar entre animais e entre ciclos estrais, podendo ser liberado, ocasionalmente, no estágio primário, embora seja mais freqüente o secundário (Hunter, 1990). Uma vez que o estro é prolongado e o tempo da ovulação imprevisível, se ocorrer demora na fecundação, o desenvolvimento do oócito pode ser iniciado precocemente. Isto leva à incidência relativamente alta de mosaïcismo nos cromossomos sexuais, o que sugere envelhecimento celular (Blue, 1981). O mesmo caracteriza-se, principalmente, pela instabilidade das organelas citoplasmáticas e nucleares, com fragmentação, desenvolvimento anormal e morte celular (Fissore et al., 2002).

Estudos em camundongos confirmam esses achados ao demonstrarem que oócitos envelhecidos exibem características morfológicas anormais antes da fecundação, tais como o desaparecimento da área rica em microfilamentos acima do fuso meiótico (Hunter, 1990), rompimento e localização anormal do fuso e desorganização da cromatina (Fissore et al., 2002).

Estas características promovem deterioração progressiva, levando à fragmentação do oócito, mesmo na ausência de fecundação. Estes eventos advêm, supostamente, da morte celular programada, já que a deterioração citoplasmática é acompanhada pela fragmentação de DNA, determinada pela presença da enzima deoxinucleotidil transferase terminal (TdT; Fissore et al., 2002). Estes eventos são caracterizados pela diminuição do volume celular (núcleo e citoplasma), alterações de membrana, fragmentação e condensação de cromatina nuclear e segmentação da célula dentro de

corpos apoptóticos (Yuan et al., 2005). Essas mudanças morfológicas são resultado da ativação de um grupo de proteases, tais como as caspases-1, 2 e 3 existentes nas células, como pró-enzimas inativas, que após serem ativadas pela clivagem de resíduos específicos de aspartato destroem uma variedade de proteínas, tais como a polimerase poli-ADP-ribose (PARP), histona-H1 e proteínas quinases dependentes de DNA (Men et al., 2003).

O envelhecimento do oócito, após a ovulação, pode acarretar no rompimento de algumas das membranas mitocondriais, ou mesmo, em sua habilidade de gerar adenosina trifosfato (ATP), tendo conseqüências negativas sobre a proliferação e a sobrevivência da célula (Fissore et al., 2002). Os danos mitocondriais promovem o colapso do potencial transmembrana da organela, provocando a separação da cadeia respiratória com liberação prejudicial de radicais livres. Conseqüentemente, haverá superprodução de ânions superóxidos, interrupção da biogênese mitocondrial, efusão de glutatona e cálcio da matriz e, por fim, a liberação de proteínas transmembrana solúveis. Isto levará à ativação das caspases e, secundariamente, de endonucleases, tendo como conseqüência a fragmentação do DNA (Cummins, 2004).

A indução da fragmentação e da ativação das caspases, em oócitos envelhecidos, também pode ser realizada pela sinalização do influxo de cálcio [Ca^{2+}] devido à fecundação, implicando que este sinal pode atuar como indutor de apoptose. Contudo, persiste a dúvida de como o mesmo sinal possa responder por vias diferentes, ou seja, ativação e morte do oócito. A mudança da homeostase do Ca^{2+} , associada com necrose celular e apoptose, em oócitos envelhecidos, é alterada (Fissore et al., 2002).

A base molecular para esta regulação defeituosa de Ca^{2+} não tem sido elucidada. Ela pode envolver a redução na concentração de trifosfato de adenosina (ATP) concomitante à redução da expressão de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica), em oócitos envelhecidos. A baixa disponibilidade de ATP pode diminuir a função da bomba do sistema cálcio-ATPase no retículo sarcoplasmático (SERCA), que é responsável pelo enchimento do retículo endoplasmático (ER). A quantidade reduzida de Bcl-2 pode, negativamente, impedir a função do SERCA, embora o seu papel na homeostase do Ca^{2+} permaneça controverso. O mau funcionamento do sistema cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático pode ser o responsável pela homeostase anormal do Ca^{2+} , em oócitos envelhecidos (Fissore et al., 2002).

Os grânulos corticais durante a ativação do oócito, com o envelhecimento pós-ovulatório, começam a intumescer e se mantêm mais profundos no córtex do oócito. Com isto, não se fundem com a membrana plasmática e, conseqüentemente, não liberam seu conteúdo dentro do espaço perivitelinico. Nesta condição, a liberação do conteúdo dos grânulos corticais não se segue à ativação e o bloqueio à polispermia não é induzido (Hunter, 1990).

Os oócitos envelhecidos exibem redução de: quinases meióticas, fator promotor de maturação (MPF), proteína quinase mitogênica ativada (MAPK), proteínas anti-apoptose e conteúdos de Ca^{2+} nos estoques do retículo endoplasmático. Também, apresentam função mitocondrial suprimida e liberam produtos pró-apoptóticos após estimulação pelo Ca^{2+} (Gordo et al., 2002).

Desta forma, mesmo que o oócito possa, posteriormente, ser penetrado por um espermatozóide, a fecundação normal e a formação do zigoto com o número correto de cromossomos (diplóide), pode não

ocorrer. Assim, o resultado mais comum é a morte embrionária precoce (Hunter, 1990).

2.1.6 Influência da idade materna sobre a distribuição cromossômica em oócito de mamíferos

O aumento da idade materna, principalmente na espécie humana (Bukvic et al., 2001), está associado à deterioração na qualidade do oócito. Poucos estudos têm tratado deste assunto em eqüinos. A reduzida fertilidade em éguas, mais velhas, pode ser atribuída à perda embrionária precoce (pré-blastocisto), ocasionada por distúrbio do oócito, oriundo das alterações no crescimento folicular, com grande incidência de aneuploidias (Ball, 2000). Em humanos, esta alteração é o fator essencial de análise em gametas femininos de mulheres mais velhas, embora os mecanismos biológicos inerentes a este fenômeno sejam mal entendidos (Plachot, 2003).

Aneuploidia é definida como o número anormal de cromossomos que não possui um múltiplo exato do número haplóide. Os fatores e os mecanismos etiológicos responsáveis pelo aumento dos erros na distribuição dos cromossomos, durante a formação das células germinativas, ainda não são totalmente conhecidos, podendo ser distribuídos entre os estádios iniciais de formação das células germinativas e a meiose no embrião, durante o período da parada meiótica do oócito, antes da retomada da maturação, próximo ao fim do tempo médio de vida reprodutiva da fêmea, durante a maturação do oócito, antes da fecundação e na meiose II (Baird et al., 2005).

De todas essas possibilidades, a teoria mais aceita é aquela em que os erros meióticos maternos, que, preferencialmente, ocorrem durante a primeira divisão meiótica (MI; Pellestor et al., 2006), são os responsáveis

por quase todas aneuploidias. Existem vários padrões de segregação anormal da MI: (i) não-disjunção “verdadeira”, na qual os homólogos são transportados em conjunto para o mesmo pólo celular; (ii) não-disjunção “aquiasmática”, na qual homólogos que falham em parear e/ou reagrupar são transportados, independentemente, ao mesmo pólo; e (iii) separação prematura das cromátides irmãs (PSSC) que, no lugar dos homólogos, segregam uma da outra. A não-disjunção, na segunda divisão meiótica (MII), resulta da falha das cromátides irmãs em se separarem (Baird et al., 2005).

A não-disjunção dos cromossomos bivalentes e a separação prematura das cromátides irmãs, têm sido discutidas como sendo os principais mecanismos de ocorrência de aneuploidia. Alguns autores (Angell et al., 1993) têm identificado a pré-divisão das cromátides como a principal fonte de aneuploidia entre oócitos. Outros estudos têm sugerido que apesar dos dois erros da meiose I estarem envolvidos na incidência de aneuploidia, a separação prematura das cromátides são relatadas como artefato de cultura (Zhivkova et al., 2006).

Alguns estudos demonstraram que a frequência do cruzamento entre as cromátides (quiasma) reduz com o aumento da idade materna e, a frequência de bivalentes com terminais quiasmáticos é muito maior em oócitos mais velhos. O decréscimo na frequência de quiasmas é acompanhado pela produção de univalentes, que são responsáveis pela não-disjunção e podem estar relacionados com o distúrbio de fuso (Plachot, 2003). Assim, a formação do fuso pode ser afetada pelo desafio metabólico do oócito ou pelos seus precursores durante o longo período de descanso no estágio dictiado no ovário, antes da retomada da maturação que pode ser, diretamente, afetada pela redução do pH interno (Eichenlaub-Ritter, 1998). O envelhecimento pode comprometer a

habilidade do aparato meiótico em balancear, diretamente, a segregação cromossômica (Plachot, 2003).

O erro do balanceamento cromossômico pode levar à falha na fecundação e na implantação, além da perda embrionária, que pode incluir a reabsorção e aborto em vários estádios da gestação. Estudos comparativos entre oócitos de éguas velhas e potras demonstraram que a aneuploidia pode estar associada a diferenças morfológicas citoplasmáticas secundárias, sendo que os oócitos de éguas mais velhas apresentam atraso na maturação da metáfase II (Aguiar et al., 2002). Estes oócitos possuem menor área ocupada pelos grânulos corticais, maior área ocupada pelo retículo endoplasmático liso e maiores vesículas citoplasmáticas por oócito, indicando aumento da incidência de defeitos degenerativos (Armstrong, 2001).

A atuação da aneuploidia sobre o atraso na maturação do oócito pode estar relacionada, principalmente, com a atividade do fator promotor de maturação (MPF) e da proteína quinase mitogênica ativada (MAPK; Bertagnolli et al., 2004). A atividade dessas quinases é dirigida pela fosforilação/defosforilação, degradação e síntese de proteínas, além de ser, propriamente, dependente do estado do citoesqueleto do fuso no oócito. A análise dos padrões de fosforilação de proteínas em oócitos de camundongos, parados no estágio dictiado, provê algumas evidências preliminares para taxas alteradas de síntese ou fosforilação de proteínas no oócito de indivíduos envelhecidos. Isto sugere uma relação causal entre fosforilação alterada, atividade das quinases, regulação do ciclo celular e predisposição à aneuploidia (Eichenlaub-Ritter, 1998).

Um ensaio sobre a atividade da MAPK quinase e da MPF mostrou que a progressão precoce da anáfase I, em oócitos envelhecidos, é acompanhada pela queda

precoce na atividade da MPF, quando o primeiro corpúsculo polar é formado. Inicialmente, a atividade de ambas quinases são menores nos oócitos de camundongos velhos (Eichenlaub-Ritter, 1998). Parece provável que, em oócitos de éguas velhas, esta redução seja secundária ao aumento da incidência de aneuploidia, apesar de não comprovado (Ball, 2000).

Apesar da falta de comprovação, na espécie equina, do envolvimento da aneuploidia na perda precoce da gestação, alguns trabalhos demonstraram haver diferença na taxa de gestação entre oócitos de éguas jovens e velhas. Assim, a taxa de aneuploidias pode ser maior em éguas mais velhas e, até mesmo, maior do que em seres humanos. Independentemente dos efeitos da tuba e das patologias uterinas, a taxa de subfertilidade em éguas mais velhas poderá ser conseqüência da fecundação de oócitos que não tiveram maturação meiótica apropriada, bem como pela maior prevalência de anormalidade dos cromossomos nesses animais. Isto porque o oócito de éguas mais velhas requer maior período de tempo para maturar até a segunda metáfase, quando comparado com oócito de éguas mais jovens (Brinsko et al., 1995).

Além disso, por serem a formação do fuso meiótico, mitótico e a segregação cromossômica processos ativos, dependentes da energia gerada pelas mitocôndrias, especula-se que o impedimento da função mitocondrial é a principal causa do aumento da incidência de anormalidades cromossômicas em embriões de fêmeas mais velhas. Durante o crescimento e a maturação do oócito, o número de mitocôndrias aumenta de dezenas a centenas, no estágio de folículo primordial; e de centenas a milhares no momento da ovulação. Neste ponto a replicação mitocondrial do oócito pára e, pelo menos em camundongos, não reinicia até o início do estágio de gastrulação do

desenvolvimento do embrião. Como resultado, o início da divisão celular embrionária envolve um grupo finito de mitocôndrias derivadas do oócito (Rambags et al., 2006).

Especula-se que, em éguas velhas, uma espécie de oxigênio reativo, gerado durante a fosforilação oxidativa constitutiva, tem mais tempo para causar danos cumulativos sobre a membrana mitocondrial do oócito. No entanto, essa lesão só se torna aparente quando a demanda de energia pelo oócito é maior, por exemplo, durante a maturação *in vitro*. A redução do número de mitocôndrias e da qualidade de oócitos maturados de éguas velhas pode ter um conseqüente efeito sobre a competência do seu desenvolvimento. Em mulheres, o baixo número de cópias do DNA mitocondrial (mtDNA) do oócito tem sido associado com a baixa fertilidade, enquanto em camundongos, grandes danos à mitocôndria do oócito, restringe a habilidade que este tem em sofrer a quebra da vesícula germinal, a formação do fuso meiótico, a segregação dos cromossomos, a extrusão do corpúsculo polar e a formação do bastocisto (Rambags et al., 2005).

Dos dados atualmente disponíveis, aparentemente, os defeitos do oócito (seja por elevar a incidência de aneuploidia ou por erros da cópia do mtDNA) são as causas mais prováveis do aumento das perdas reprodutivas em éguas mais velhas (Ball, 2000; Armstrong, 2001). Isto representa somente a menor parte quando comparado à reduzida capacidade de desenvolvimento. Assim, o histórico do oócito, através do desenvolvimento e da vida reprodutiva determina a sua qualidade. A aneuploidia aumenta com o avançar da idade, mas, não é a causa exclusiva da reduzida fertilidade. É essencial caracterizar e identificar a causa da menor qualidade dos oócitos de animais velhos, uma vez que isto dará maiores informações sobre a

etiologia da aneuploidia, relacionada com a idade (Eichenlaub-Ritter, 1998).

2.1.7 Ação do ambiente uterino na perda embrionária precoce

A perda da prenhez é um dos principais fatores de subfertilidade na espécie equina e, tanto a fase da gestação em que ocorrem as perdas quanto sua incidência, relacionam-se diretamente com a saúde do trato reprodutivo (Ginther et al., 1985). Do momento da fecundação do oócito, logo após a ovulação, até o estabelecimento da placenta madura e funcional, uma série de mudanças morfológicas, imunológicas e endocrinológicas acontecem na tuba uterina e no útero, e que são importantes para o estabelecimento e a manutenção da gestação (Duc-Goiran et al., 1999).

Se o oócito não for fecundado, ele se desloca no interior da tuba uterina até a junção ístmo-ampola onde permanece alojado nas dobras altamente convolutas da mucosa tubárica, degenerando-se lentamente por vários meses. Por outro lado, se o oócito for fecundado, o embrião continua sua passagem e entra no útero entre 144 e 168 horas após a ovulação (Allen, 2000). Para que isto ocorra, o oócito após ser fecundado, quando atingir o estágio de mórula compacta, necessita secretar quantidade apreciável de prostaglandina E₂ (PGE₂; Skidmore, 2004). Este hormônio tem a propriedade de relaxar a musculatura lisa da parede da tuba uterina, permitindo ao embrião continuar a sua movimentação e, com a ajuda do batimento rítmico ciliar, consegue entrar no lúmen uterino (Allen, 2000; Skidmore, 2004; Allen, 2005).

O embrião necessita encontrar um ambiente uterino adequado para que possa estabelecer a gestação. Após a cobertura, a interação do espermatozóide com o tecido uterino promove um processo inflamatório fisiologicamente normal que pode, em

éguas susceptíveis à endometrite, persistir até o momento da chegada do embrião no útero e, desta maneira, prejudicar a qualidade do ambiente uterino levando à perda embrionária precoce (Silva et al., 1999). Normalmente, o processo inflamatório é acompanhado por acúmulo de fluido intrauterino que está associado à redução significativa na taxa de gestação. Parte do líquido encontrado no lúmen uterino pode ser oriundo da maior secreção pelas glândulas endometriais, estimuladas pelo estrógeno na fase pré-ovulatória, além da baixa capacidade de drenagem pelo cérvix e pelos vasos linfáticos, como consequência da baixa contratilidade do miométrio (Watson, 2000).

Considera-se que a endometrite persistente pós-cobertura, mais comum em éguas acima de 14 anos de idade, esteja associada ao atraso da limpeza física do útero resultante de disfunção da contratilidade uterina (von Reitzenstein et al., 2002; LeBlanc, 2003). Além disso, outras patologias, tais como lacunas linfáticas, angiopatias e fibroses periglandulares (endometrose) contribuam para a doença (LeBlanc, 2003). A razão da baixa atividade miometrial ainda permanece obscura. Os possíveis mecanismos incluem: 1) mudanças na liberação, sistêmica ou local, de uterotoninas, tais como prostaglandinas ou ocitocina; 2) produção alterada de substâncias, neuromusculares ou vasoativas, que afetam a atividade miometrial; e 3) mudanças intrínsecas à musculatura uterina que, em resposta, torna-se incapaz de promover força contrátil normal (Rigby et al., 2001). A menor contratilidade e limpeza uterina, em éguas susceptíveis à endometrite, são correlacionadas com a baixa concentração de ocitocina, ponto chave da contração miometrial, durante a rufiação e a cobertura, o que difere de éguas normais que apresentam elevada concentração deste hormônio nesses dois momentos (Nikolakopoulos et al., 2000).

A maioria dos estudos se limita a éguas normais e mostram que a baixa resposta do miométrio, à estimulação por um campo elétrico, não tem correlação nem com a baixa expressão de receptores responsáveis pela contratilidade miometrial, nem com a regulação da concentração de cálcio intracelular (Watson, 2000).

Segundo LeBlanc (2003), a explicação para a baixa correlação dos receptores para contratilidade miometrial com a atividade mioelétrica uterina, em éguas susceptíveis, pode ser advinda do acúmulo de óxido nítrico (NO) no lúmen uterino, após a inseminação. A liberação endometrial de substâncias, tais como prostaglandinas, citocinas inflamatórias e o próprio óxido nítrico, causam alterações dentro das células musculares. Estas substâncias podem promover mudanças, tais como: a supressão do número ou da função das junções comunicantes miometriais, alteração no estado de fosforilação de proteínas contráteis, e alteração na expressão de enzimas integrais nas células musculares com função contrátil. Estas mudanças podem contribuir para a reduzida resposta de contração do miométrio, sem interferir no número de receptores para ocitocina.

A atividade contrátil do útero é resultante da despolarização e repolarização da membrana plasmática das células musculares lisas, sendo sugerido que um feixe dessas células atue como células especializadas, tipo marca-passo, que desencadeia a atividade contrátil da musculatura uterina. Todavia, diferente do coração, essas células, no útero, não são representadas por uma localização anatômica discreta. Qualquer célula miometrial pode ser capaz de assumir a função de marca-passo podendo, com isto, ocorrerem mudanças nas regiões que comandam o desencadeamento da atividade mioelétrica. Alguns dados sugerem existir regiões de marca-passo no

miométrio de éguas normais, que causam a contração inicial e, a partir de então, propaga-se na direção do cérvix. As regiões de marca-passo, em éguas susceptíveis à endometrite, aparecem mais freqüentemente no corpo uterino, podendo sua localização ser intrínseca à éguas problema (von Reitzenstein et al., 2002).

Outro fator importante para a limpeza uterina é a posição do útero dentro da cavidade abdominal da égua. Com o aumento da idade e do número de partos, o útero adquire posição mais cranioventral no abdômen. Isto é incrementado pela perda do suporte estrutural caudal do trato reprodutivo e, com o estiramento do ligamento largo, ocorre falha na eliminação do conteúdo intrauterino. O menor padrão de propagação e da intensidade da contração miometrial leva ao insuficiente esvaziamento uterino (LeBlanc et al., 1998; LeBlanc, 2003).

A degeneração vascular endometrial também parece contribuir para o atraso na limpeza uterina. Esclerose das veias, arteríolas e artérias, tais como elastose, fibrose, fibroelastose, fibrose perivascular e os processos de calcificação têm sido notadas em biopsias endometriais provenientes de éguas com acúmulo anormal de líquido intrauterino. A angiose parece reduzir, indiretamente, a fertilidade por meio da menor perfusão endometrial e por distúrbios na drenagem uterina, causadas pela reduzida função das veias e dos vasos linfáticos (linfangiectasia endometrial). Conseqüentemente, levam à persistência do edema endometrial, formando as lacunas linfáticas. A severidade das lesões aumenta com a idade e com o número de partos (LeBlanc, 2003).

Em éguas normais, com útero hígido, o embrião encontra um ambiente apropriado para o seu desenvolvimento. Entretanto, após a entrada no útero o embrião passará

por um novo desafio, o de sinalizar ao tecido uterino a sua existência evitando, desta maneira, a luteólise. Isto irá assegurar a manutenção de um ambiente adequado para suportar sua implantação e desenvolvimento (Bowen e Burghardt, 2000).

A natureza bioquímica do sinal que o embrião eqüino “informa” à égua a sua presença ainda permanece desconhecida. Diferente dos ruminantes, o concepto eqüino não produz nenhuma proteína similar ao interferon (molécula com propriedades luteostáticas) mas, semelhante ao embrião suíno, inicia secreção de grandes quantidades de estrógeno, tão cedo quanto 10 dias após a ovulação (Allen, 2000). Assim, hipotetizou-se que o estrógeno embrionário promove a estase do corpo lúteo por redirecionar o fluxo endometrial de $PGF_{2\alpha}$ para longe dos vasos venosos de drenagem uterina e, por isso, poderia constituir o sinal do reconhecimento materno da gestação em eqüinos (Allen, 2005).

Apesar da incerteza sobre a natureza desses sinais, recentes experimentos têm estabelecido que, como em ruminantes, há supressão da auto-regulação cíclica dos receptores de ocitocina no endométrio, entre os dias 10 e 16 após a ovulação. Assim, este mecanismo poderia ser parte integral do mecanismo da manutenção do corpo lúteo na gestação eqüina, juntamente a liberação de estrógeno pelo concepto (Allen, 2000). No entanto, existem trabalhos (Boerboom et al., 2004) que contestam a participação do concepto na supressão da expressão dos receptores de ocitocina no final do diestro, já que, aparentemente, não ocorre a inibição do aumento do número de receptores de ocitocina em éguas gestantes, e sim, a inibição da luteólise por alteração da expressão das enzimas envolvidas na síntese das prostaglandinas (Aurich e Budik, 2004). Boerboom et al. (2004)

consideram que a prevenção da luteólise, em éguas gestantes, parece depender mais da capacidade do concepto em inibir a regulação da cicloxigenase 2 (COX-2), do que a própria regulação dos receptores de ocitocina. Isto se deve à demonstração da expressão dos genes da prostaglandina sintase, no endométrio eqüino, durante o final do diestro e início da gestação. Como não há indução do gene da COX-2 no dia 15 do ciclo estral, em éguas gestantes, acredita-se não haver síntese de prostaglandina por estes animais.

O efeito inibitório do concepto sobre a produção de prostaglandinas endometriais é transitório, o que exige sua interação repetida ou contínua com todo o endométrio para suprimir a sua produção. A PGF uterina alcançar o corpo lúteo da égua, por rota sistêmica (Ginther, 1979). O concepto precisa interagir com a superfície de ambos os cornos e o corpo uterino para garantir a manutenção do corpo lúteo. Desta forma, a sua mobilidade é funcionalmente análoga à elongação do blastocisto suíno, no momento do reconhecimento materno da gestação (McDowell et al., 1988).

Apesar do concepto eqüino impedir a luteólise por evitar que a prostaglandina endometrial alcance o corpo lúteo, pela via sistêmica, ele possui a capacidade de secretar quantidades apreciáveis tanto de $PGF_{2\alpha}$ quanto da PGE_2 . Assim, a capacidade sintética de prostanóides, pela membrana coriovitelínica, é necessária para estimular, localmente, a contração peristáltica e o relaxamento do miométrio, requerida para impulsionar o concepto através do lúmen uterino, durante o período de reconhecimento materno da gestação (Allen, 2000).

O padrão de mobilidade da vesícula embrionária varia de acordo com os diferentes dias da gestação, sendo limitada entre os dias nove e 10 pós-ovulação. Durante esse período, a vesícula

embrionária passa a maior parte do tempo alojada no corpo uterino, atingindo mobilidade máxima a partir do 11^o e 12^o dia pós-ovulação, e continuando até o 16^o (Ginther, 1984; Leith e Ginther, 1984), quando cessa o movimento. Esta parada na movimentação embrionária advém da combinação do seu crescimento contínuo, bem como pelo aumento do tônus uterino, que causam a fixação da vesícula na base de um dos cornos uterinos (Ginther, 1984).

A mobilidade até o 16^o dia pós-ovulação permite a interação necessária entre concepto e o endométrio, para a manutenção da função luteal (McDowell et al., 1988). Pode ocorrer assincronia natural entre o embrião e o ambiente uterino, oriundos de diversas causas, tais como a retomada tardia da primeira divisão meiótica ou o atraso da fecundação. Como consequência pode ocorrer desenvolvimento embrionário retardado, levando à falha na sinalização à mãe, por falta do momento ou da forma adequada que inicie a resposta do reconhecimento materno, necessárias para a manutenção da gestação (Roberts et al., 1996). O menor tamanho das vesículas embrionárias oriundas, principalmente, de coberturas pós-ovulação, tem sido relacionado com a perda embrionária precoce em éguas. Estas pequenas vesículas, provavelmente, possuem menor mobilidade e propiciam menor bloqueio ao mecanismo luteolítico uterino. Embora morfologicamente normais, os embriões de menor tamanho podem ser perdidos devido à sua incapacidade de bloquearem a luteólise (Huhtinen et al., 1996).

Após a fixação da vesícula embrionária, o concepto passa pelo processo de implantação, por volta do 40^o dia pós-ovulação (Bowen e Burghardt, 2000). No equino este processo é, parcialmente, regulado pelo fator de crescimento epidermal (EGF) e por fatores de crescimento semelhantes à insulina do tipo

I e II (IGF-I e II), produzidos localmente (Lennard et al., 1998). A presença de RNAm para o fator de crescimento epidermal (EGF), na porção apical das glândulas endometriais de éguas gestantes, tem sido implicado participando no desenvolvimento placentário e trofoblástico durante o período de fixação e implantação embrionária, tanto por estímulo mitogênico quanto como promotor de secreção das glândulas endometriais, conhecida como “leite uterino” (Schäfer-Somi, 2003).

Outros fatores de crescimento mitogênicos, tais como IGF-I e II, são secretados pelo trofoblasto e por muitos outros tecidos embrionários e fetais, a partir dos 20 dias após a ovulação, em éguas gestantes. O IGF-I acumula-se nas células epiteliais e glandulares do endométrio equino regulando o crescimento endometrial e/ou trofoblástico (Lennard et al., 1998). Ele estimula a captação de glicose, a síntese de proteínas e a proliferação celular, além de atuar como um fator de sobrevivência, por diminuir a apoptose celular (Herrler et al., 2000). Atualmente, pouco se conhece sobre a síntese de IGF-I ou a expressão de seus receptores pelo embrião equino. No entanto, acredita-se que o embrião possa elevar a secreção endometrial de IGF-I, sendo que este processo representa um importante sinal, parácrino ou autócrino, que auxilia o início da gestação (Lennard et al., 1998).

A síntese de IGF-I pelo concepto, antes da implantação, tem levado a resultados conflitantes devido a alguns investigadores descreverem a presença de RNAm para este hormônio, apenas durante o estágio de blastocisto. Por outro lado, o IGF-I materno está sempre presente na tuba e nas secreções uterinas que envolvem o concepto. A constatação do RNAm para proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs), na cobertura externa do concepto de alguns mamíferos na pré-implantação, leva à

especulação de que o conceito possa regular a biodisponibilidade do IGF, por meio dessas proteínas, aumentando o seu desenvolvimento (Herrler et al., 2000).

É provável que esses fatores de crescimento, o EGF das glândulas endometriais maternas e o IGF-II dos tecidos fetais, exerçam papel no início e na manutenção da hiperplasia e na remodelagem da arquitetura do endométrio e do alantocóion, durante o desenvolvimento da placenta equina. Assim, alguns fatores externos, tal como a privação alimentar, podem interferir no estágio de desenvolvimento, acarretando na perda embrionária, ao impedir a diferenciação e fixação do conceito. Com isto, diminui a capacidade da placenta epiteliochorial de continuar seu crescimento ao longo da gestação, visando suprir as demandas nutricionais para o rápido crescimento fetal (Allen, 2000).

Os índices de mortalidade embrionária, no início da gestação são mais elevados quando comparados com estádios mais avançados (Ginther et al., 1985). Isto se deve, provavelmente, ao inadequado ambiente uterino quando da chegada do embrião ao útero, por volta do 6^o dia; e pela falta de mobilidade do mesmo entre o 11^o e 15^o dia, que leva à ausência do reconhecimento materno da gestação (Blue, 1981). As perdas embrionárias precoces aumentam com a idade da égua (Chevalier-Clément, 1989), provavelmente, por defeitos no oócito, embora alterações no ambiente da tuba e do útero colaborem para isto, em animais mais velhos (Ball, 2000).

2.2 Predição da eficiência reprodutiva do garanhão

Como um único garanhão poder ser exigido para a cobertura de um grande número de éguas, a sua fertilidade exerce

papel crítico na eficiência reprodutiva do plantel (van Buiten et al., 2003). Ele é considerado como uma importante fonte de variação na fertilidade, independentemente da forma de utilização do sêmen (monta natural, inseminação com sêmen a fresco, resfriado ou congelado) (Palhares, 1997).

Alguns autores consideram que a espécie equina possui os índices mais baixos de fertilidade quando comparada com as demais espécies domésticas. Isto pode ser consequência da tendência de se atribuir à fêmea os problemas de infertilidade, comprometendo uma avaliação mais criteriosa que envolva o macho (Fernandes e Pimentel, 2002). Dentre estas avaliações, a predição da habilidade fecundante do espermatozóide tem grande importância econômica, principalmente em rebanhos comerciais que utilizam a inseminação artificial. Os métodos clássicos de avaliação do sêmen, geralmente, mensuram a concentração espermática, a motilidade progressiva, a percentagem de células viáveis e a morfologia do acrossoma. Entretanto, essas análises são falhas em detectar e prever a fertilidade espermática, naquelas amostras que não forem avaliadas como de muito baixa qualidade seminal (Gadea, 2005).

A literatura sobre a relação entre a qualidade espermática e a fertilidade é contraditória, embora muitos autores tenham reportado que a percentagem de espermatozoides, morfológicamente normais ou anormais, esteja relacionada com a taxa de concepção (Parkinson, 2004). Mesmo que as diferenças de manejo sejam consideradas importantes no estudo da relação entre fertilidade e qualidade seminal, na espécie equina, pode-se esperar índices de concepção mais elevados e melhor eficiência reprodutiva à medida que existam maiores percentuais de espermatozoides normais no ejaculado (Fernandes e Pimentel, 2002). Apesar disto, muitos trabalhos relatam que nenhum

dos parâmetros de qualidade do sêmen, comumente analisados, sejam confiáveis ou, consistentemente, relacionados com a fertilidade (Parkinson, 2004).

Dentre as variáveis relacionadas ao macho e que podem contribuir para a taxa de fertilidade do rebanho, a qualidade espermática se sobressai. Isto porque o espermatozóide pode sofrer diferentes processos que determinam a fecundação do oócito viável e, dentre eles, o seu transporte até o local da fecundação, sua manutenção no trato reprodutivo da fêmea até a chegada do oócito e, conseqüentemente, a penetração do mesmo (Troedsson et al., 1998).

Em geral, garanhões com menos de três ou mais de 14 anos de idade possuem baixa qualidade seminal. O tamanho dos testículos do garanhão continua a crescer até, aproximadamente, seis anos de idade e, com isso, a produção espermática de garanhões mais jovens tende a ser menor do que a de garanhões mais velhos. Garanhões mais velhos são mais susceptíveis a produzirem espermatozóides com anomalias morfológicas, e a taxa de gestação por ciclo é, aproximadamente, 8% menor do que a de animais com idades entre três e quatorze anos (van Buiten et al., 2003).

A reduzida qualidade do sêmen de garanhões mais velhos pode indicar a existência de uma idade crítica na qual alguns garanhões produzem elevado número de espermatozóides anormais, devido aos defeitos na espermatogênese e na função epididimária. Espera-se, normalmente, o declínio na fertilidade de garanhões com idade acima de 10 anos, sendo que animais com 14 anos de idade ou mais podem estar próximos do fim da sua vida útil reprodutiva e, por isto, devem ser usados somente com o cuidadoso monitoramento da qualidade seminal e da carga de trabalho. Entretanto, deve-se

ressaltar que existem garantias, desta faixa etária, que continuam a produzir espermatozóides normalmente (Dowsett e Knott, 1996).

O envelhecimento do gameta masculino, semelhante ao que ocorre com o oócito, pode acarretar em maior número de aberrações cromossômicas e desordens genéticas nas células espermáticas. Este aumento na frequência de anomalias cromossômicas estruturais, relacionada à idade, pode ser secundário à contínua divisão celular, já que a espermatogênese é um processo ininterrupto que se inicia na puberdade e sofre, então, alto número de replicações e duplicações de DNA, durante o seu tempo de vida. Em humanos adultos, 23 divisões celulares ocorrem durante a espermatogênese, ao longo do ano. Desta forma, a espermatogônia de um homem com 28 anos de idade terá sofrido, aproximadamente, 380 mitoses e replicações de DNA. Devido a esses altos números, o risco de erros transcripcionais de DNA aumenta com o envelhecimento (Plas et al., 2000).

Os efeitos da idade sobre a fertilidade de garanhões mais velhos ainda são pouco documentados, mas incluem a redução na produção espermática, associada à progressiva degeneração testicular, podendo comprometer a libido e a capacidade de monta (McDonnell, 2005).

Recentes evidências sugerem que a causa da falha reprodutiva de animais mais velhos se inicia, precocemente, em nível testicular e, então, se difunde para as duas áreas do cérebro envolvidas na regulação da reprodução, o hipotálamo (região produtora de GnRH) e a hipófise (estrutura que produz as gonadotropinas, LH e FSH; Roser, 2000). Há muitos anos foi demonstrado que a espermatogênese é dependente da normalidade funcional do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular, e que envolve mecanismos endócrinos

clássicos, além da modulação parácrina e autócrina. Recentemente, foi postulado que o testículo, do gananhão, é modulado pelo sistema parácrino/autócrino. No entanto, mais trabalhos são necessários para determinar o envolvimento dos fatores locais na interação célula a célula, e que corroborem essa idéia (Roser, 2001).

Estudos em outras espécies, que não a equina, indicam que a função reprodutiva normal pode depender dos fatores locais, como o IGF-I, além das gonadotropinas e dos esteróides. Considera-se que os valores de IGF-I variam com a fertilidade em algumas espécies, inclusive a humana, sendo possível usá-lo como marcador do declínio da fertilidade. Todavia, não há evidência no gananhão e, sendo nesta espécie, mais correlacionado com o início da puberdade (Hess e Rose, 2001). Apesar disto, alguns autores demonstraram existir produção de IGF-I no testículo de gananhões, tanto pelas células de Leydig quanto pelas de Sertoli (Roser, 2001).

A predição da fertilidade, em gananhões, é um dos grandes problemas, principalmente nos casos de subfertilidade em que, normalmente, os machos apresentam número suficiente de células com motilidade progressiva e espermatozóides morfológicamente normais, não sendo capazes de estabelecerem taxas de gestação aceitáveis (Almahbobi et al., 1988).

Atualmente, as pesquisas tentam encontrar fatores que possam servir como marcadores diagnósticos. Dentre as várias proposições, cogita-se que a alteração da razão entre colesterol e fosfolipídios, na membrana plasmática, possa impedir a fecundação do oócito por interferir no processo de capacitação espermática e na reação acrossômica. Aparentemente, a elevação da razão colesterol-fosfolipídio, tanto na membrana espermática quanto no plasma seminal, promovem falhas na reação acrossômica dos gananhões. Isto

acarreta mudanças bioquímicas envolvendo os lipídios de membrana, que têm grande influência sobre a permeabilidade e fluidez da membrana espermática (Brinsko et al., 2006).

Além da mudança na composição lipídica, os espermatozóides de gananhões subférteis também podem diferir em suas propriedades de superfície, relacionadas às moléculas receptoras da zona pelúcida, ou podem diferir quanto à transdução da cascata de eventos relacionadas aos receptores. Estas anomalias podem ser intrínsecas a uma subpopulação de células espermáticas, e têm origem durante a espermatogênese, maturação espermática epididimária ou resultarem da composição do fluido seminal (Meyers et al., 1996). Todavia, a função dos vários componentes protéicos do plasma seminal ainda é pouco entendida.

Devido à fertilidade variar dentro e entre gananhões, postula-se que as proteínas associadas à fertilidade podem ser localizadas no plasma seminal, e suas respectivas concentrações podem estar correlacionadas com a fertilidade. Alguns estudos sugerem que há uma possível relação entre essas proteínas plasmáticas seminais e a fertilidade em gananhões (Brandon et al., 1999).

A reprodução bem sucedida requer a finalização de uma complexa cascata de eventos. Por parte do gananhão, os passos chave para a eficiência reprodutiva são a espermatogênese, a espermiogênese e a maturação espermática. Durante a ejaculação, diferentes secreções das glândulas acessórias provocam importantes alterações na composição da membrana espermática e nas proteínas de superfície que, ao passarem através do trato genital feminino, interagem com a membrana da tuba uterina, sofrendo capacitação. Quando as células espermáticas encontram o oócito, necessitam se ligar à zona pelúcida, que

desencadeia a reação acrossômica, permitindo ao espermatozóide penetrar a zona para que, então, a célula espermática possa se ligar à membrana do oócito e se fundir, completando a fecundação. Todos esses passos são mediados por vários fatores, que possuem diferentes pontos de controle e, assim, dificultando a determinação dos pontos limitantes à concepção, por parte da análise reprodutiva do macho (Leeb et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização, condições climáticas e período experimental

O trabalho foi realizado em dois períodos: 1) De outubro a dezembro de 2005 nas instalações da Sede do Regimento de Cavalaria Alferes Tiradentes (RCAT), da Polícia Militar do Estado de Minas Gerais, no município de Belo Horizonte, localizado na região da Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais, situado a 19° 55' 15'' de latitude S e 43° 56' 16'' de longitude W Gr., a uma altitude média de 832 m e clima do tipo Cwa, de acordo com a classificação

de Köeppen, ou seja, inverno seco e verão chuvoso; e 2) De janeiro a março de 2006 nas dependências do Núcleo Equino de Reprodução (NER), também pertencente ao RCAT, no município de Florestal, no Estado de Minas Gerais, localizado a 19° 56' 15'' de latitude S e 44° 26' 15'' de longitude W Gr., a uma altitude aproximada de 500 m acima do nível do mar e clima tipo Cwa.

Os dados climáticos correspondentes ao período experimental estão contidos nas Tab. 1 e 2 (valores médios), e foram obtidos no 5º Distrito de Meteorologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Por falha nos equipamentos de mensuração climática durante o período de janeiro a março do ano de 2006, na estação de Florestal, o MAPA não pôde realizar a leitura dos dados meteorológicos do referido município. Assim, a Tab. 2 representa a média dos dados meteorológicos mensurados durante o período de 30 anos (1961/1990), sendo aqui expostos com o intuito de demonstrar as tendências climáticas do município durante o período experimental.

Tabela 1: Dados meteorológicos médios do município de Belo Horizonte durante o período experimental (Outubro de 2005 a Março de 2006).

Período (mês/ano)	Temperatura (°C)			Precipitação Pluviométrica (mm/mês)	Quantidade de dias chuvosos/mês	U.R.do ar (%)	Insolação	
	Média Min.	Méd. Comp.	Média Max.				Diária* (horas)	Mensal* (horas)
Outubro/05	20,7	24,5	30,3	50	6	56,7	7,09	219,8
Novembro/05	18,5	21,3	25,3	300	23	74,0	6,05	181,6
Dezembro/05	18,5	22,5	26,5	390	20	71,3	4,40	136,5
Janeiro/06	20,6	24,2	28,4	140	10	62,3	6,35	196,9
Fevereiro/06	21,5	24,5	29,8	130	9	70,2	6,61	185,2
Março/06	21,2	**	28,1	270	18	74,1	4,67	144,8

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), 5º Distrito de meteorologia (DISME). *Horas de sol direto, sem a obstrução de nuvens.

Tabela 2: Dados meteorológicos do município de Florestal – média de 30 anos (1961/1990).

Período (mês/ano)	Temperatura (°C)			Precipitação Pluviométrica (mm/mês)	Quantidade de dias chuvosos/mês	U.R.do ar (%)	Insolação	
	Média Min.	Méd. Comp.	Média Max.				Diária* (horas)	Mensal* (horas)
Outubro/05	15,7	21,4	27,8	128,8	10	70	5,69	170,9
Novembro/05	17,0	21,7	28,5	240,0	15	74	5,36	160,8
Dezembro/05	17,6	22,0	28,2	304,6	18	77	4,67	140,2
Janeiro/06	17,8	22,6	28,9	299,4	16	77	5,49	170,4
Fevereiro/06	17,4	22,8	29,6	186,7	11	76	6,17	173,0
Março/06	16,9	22,3	29,7	135,0	11	76	6,51	202,0

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), 5º Distrito de meteorologia (DISME). *Horas de sol direto, sem a obstrução de nuvens.

3.2 Delineamento Experimental

Foram utilizados 84 ciclos estrais de 50 éguas mestiças do tipo militar, totalizando 1398 palpações transretais para o diagnóstico da ovulação. Os animais foram agrupados e uniformizados segundo a idade, categoria (potras, éguas solteiras ou éguas com potro ao pé) e data do parto. As éguas foram distribuídas ao acaso, por meio de sorteio, em dois grupos (P1 e P2) de intervalos de palpação (a cada 24 ou 12 horas) para cada garanhão, com número desigual de repetições, seguindo um esquema fatorial 2 x 2, considerando-se o efeito dos dois sistemas de palpação transretal e dos dois garanhões (G1 e G2), como descritos a seguir:

- T1 - éguas palpadas uma vez por dia (P1) e cobertas, após a detecção da ovulação, pelo garanhão G1 – P1G1 (17 éguas);
- T2 - éguas palpadas duas vezes por dia (P2) e cobertas, após a detecção da ovulação, pelo garanhão G1– P2G1 (20 éguas);
- T3 - éguas palpadas uma vez por dia (P1) e cobertas, após a detecção da ovulação, pelo garanhão G2 – P1G2 (12 éguas);

- T4 - éguas palpadas duas vezes ao dia (P2) e cobertas, após a detecção da ovulação, pelo garanhão G2 – P2G2 (10 éguas).

Após as análises estatísticas, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos (T1, T2 T3 e T4) e, por isso, mensurou-se o efeito dos intervalos de palpação (P1 e P2), independente do garanhão, como descrito a seguir:

- T1 - éguas palpadas uma única vez ao dia e cobertas após a detecção da ovulação (29 éguas);
- T2 - éguas palpadas duas vezes ao dia e cobertas após a detecção da ovulação (30 éguas).

Por não ter sido encontrada diferença estatística entre os tratamentos para as duas localidades experimentais agrupou-se os dados, sendo então, analisados conforme citado acima.

3.3 Animais e manejo experimental

3.3.1 Éguas

Utilizou-se um total de 50 éguas mestiças, com idade variando de quatro a vinte e quatro anos, pertencentes a três categorias reprodutivas (éguas com potro ao pé, éguas solteiras e potras), com escore da condição corporal médio igual a três (escala 1 a 5),

avaliado pela palpação da cobertura de gordura nas regiões do costado, dorso-lombar, garupa e inserção da cauda, onde o escore um refere-se aos animais extremamente magros e o cinco aos obesos (Silva, 1995).

3.3.1.1 Manejo reprodutivo, diagnóstico de ovulação e cobertura das éguas

Antes do início da estação de monta, as éguas foram submetidas a exame ginecológico por meio de ultra-sonografia e palpação transretal, avaliando-se as características da genitália externa e interna. A partir destes exames, foram diagnosticados problemas reprodutivos (cistos endometriais e acúmulo anormal de líquido intrauterino) em 13 éguas que, então, foram agrupadas e alocadas, por meio de sorteio, entre os quatro grupos experimentais, descritos anteriormente. Nenhuma égua que tenha apresentado problema quanto à higidez uterina foi descartada, e todos os ciclos foram contabilizados e utilizados nas análises estatísticas.

Durante a estação de monta, o controle folicular diário foi registrado em fichas individuais, obedecendo-se ao sistema proposto por Greenhof e Kenney (1975), onde o manejo reprodutivo foi baseado no esquema descrito por Palhares (1987), sofrendo algumas adaptações para atenderem aos objetivos do trabalho (Fig. 1).

As éguas foram palpadas e rufiadas individualmente, a cada três dias, até o início do cio e/ou da presença de um folículo de 2,0-2,5cm de diâmetro, presente em um dos ovários. A partir daí, as palpações retais e as rufiações tornaram-se diárias até o momento da ovulação, sendo os animais pertencentes aos tratamentos 1 (P1) e 2 (P2) palpados a intervalos de 24 (07:00h) ou 12 horas (às 07:00h e 18:00h), respectivamente. Após a detecção da

ovulação os animais foram cobertos por monta natural após a higienização do períneo das éguas, com água e sabão de coco, seguida de secagem com papel toalha, bandagem da cauda e contenção das mesmas para que não houvesse o risco de lesão ao garanhão e ao médico veterinário.

Na cobertura, logo após a penetração vaginal, verificaram-se os pulsos uretrais para confirmação da ejaculação. Os garanhões que não demonstravam pulso ejaculatório uretral permaneciam por, aproximadamente, 10 minutos em descanso para retornar à cobertura. O mesmo procedimento foi realizado com o garanhão que necessitava cobrir, seguidamente, mais de uma égua.

Após a cobertura, as éguas foram mantidas afastadas do controle folicular diário, até o momento da rufiação de retorno, realizado entre o 15^o e o 21^o dia após a ovulação. O diagnóstico de gestação foi feito por palpações transretais nos dias 17, 25, 30, 35, 40, 45, 60 e 90 após a ovulação. Para a rufiação utilizou-se um macho inteiro, sem raça definida, submetido à amputação da glândula. As éguas com diagnóstico negativo de gestação voltavam para o mesmo tratamento, de acordo com os intervalos de palpação previamente estabelecidos. Durante a rufiação anotavam-se, em fichas e quadros apropriados, para o controle reprodutivo, as características comportamentais das éguas.

No início da estação de monta (outubro de 2005), três éguas receberam doses diárias de prostaglandina F_{2α} (Dinoprost trometamina¹ - 5mg), por três dias consecutivos, por apresentarem falhas na dinâmica de crescimento folicular ovariano. Das éguas diagnosticadas com algum problema relacionado à reprodução, uma, após a segunda cobertura, foi verificado acúmulo anormal de líquido intra-uterino. Isto, no momento da rufiação de retorno. Em outra égua, constatou-se pneumovagina

¹ Lutalyse® - Laboratório Rhodia - Mérieux Veterinária Ltda

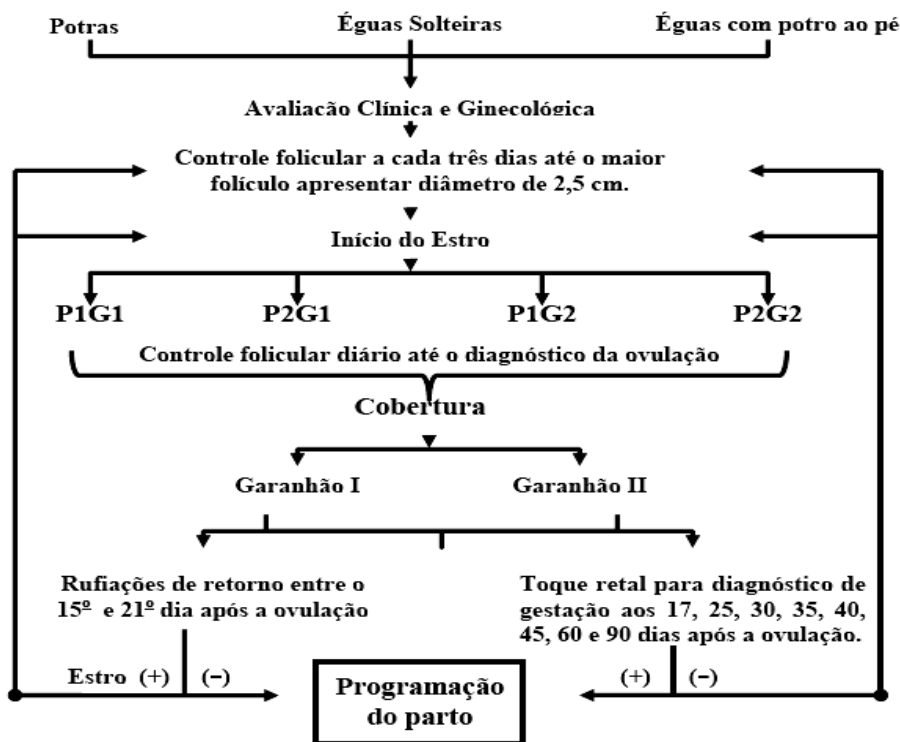


Figura 01 - Organograma para o controle reprodutivo das éguas. P1 e P2 = intervalo de palpções; G1 e G2 = garanhão utilizado na cobertura. Adaptado de Palhares (1987).

e pneumoutero, apresentando distensão anormal do útero. Estes dois animais tiveram o útero lavado com solução de Ringer com Lactato de Sódio aquecido à 37°C e receberam tratamento com prostaglandina F_{2α} (5mg), duas vezes ao dia, por dois dias consecutivos, e uma única dose de ocitocina¹ (10 U.I.), no primeiro dia do tratamento.

3.3.1.2 Manejo nutricional e instalações das éguas

O manejo nutricional consistiu no fornecimento diário de cerca de 10 kg de capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.) picado, 2 kg de feno de alfafa (*Medicago sativa*, L.), 3 kg de ração comercial peletizada², sal mineralizado³ e água *ad libitum*.

Os animais alojados no RCAT foram mantidos em baias de alvenaria medindo cerca de 4,5 m², com piso cimentado e cama de serragem, durante a maior parte do dia e à noite. Na estação de Florestal (NER), as éguas recebiam o mesmo manejo nutricional. No entanto, ficavam alojadas em piquetes de capim *Brachiaria brizantha*.

3.3.2 Garanhões

Foram utilizados dois garanhões (G1 e G2) da raça Brasileira de Hipismo, com idade de 21 e 18 anos, respectivamente, e que cobriam as éguas ovuladas após o sistema de palpação retal diária a intervalos de 24 e 12 horas.

Antes do início da estação de monta, os garanhões foram submetidos a exame andrológico com inspeção e palpação da genitália externa, avaliação do

¹ Ocitocina VitalFarma® - Laboratório Vital Farma - Indústria Farmacêutica Vital Farma Ltda

² Nutriage® - Guabi

³ Centauro® - Guabi

comportamento sexual, bem como pela avaliação física e morfológica do sêmen. Os animais apresentaram alguns sinais de disfunção orgânica ou reprodutiva. O garanhão G1, antes do início da estação de monta, apresentava miosite no membro posterior direito que foi restabelecido antes do início da mesma, e o garanhão G2 encontrava-se em repouso sexual há seis anos.

Ao exame físico do sêmen, no início da estação de monta, o garanhão G1 apresentou 5% de defeito de cauda, 3% de defeito de cabeça, 5% de defeito de peça intermediária, 3% de gota citoplasmática proximal, 4% de gota citoplasmática distal e 80% de células normais. Já, o garanhão G2, apresentou 19% de defeito de cauda, 1% de defeito de cabeça, 3% de gota citoplasmática proximal, 5% de gota citoplasmática distal e 72% de células normais.

Os defeitos espermáticos do garanhão G2, no início da estação de monta, foram condizentes com o quadro de repouso sexual, melhorando-se o perfil após o esgotamento das reservas espermáticas extragonadais, realizadas por meio de coletas diárias, durante sete dias consecutivos. Todavia, a avaliação do garanhão G1 apenas ratificou exames realizados na estação de monta anterior (2004/2005) (Xavier, 2006), quando o animal foi considerado de baixa viabilidade espermática por não suportar o manuseio, como resfriamento ou congelamento (Anexo 7.3), porém, não demonstrando nenhuma restrição quanto ao uso à fresco por meio de monta natural. Desta forma, foi demandada sua utilização e, então, considerados aptos à experimentação, segundo as recomendações de Pickett et al. (1987).

Durante toda a estação de monta foram contabilizados 84 saltos, 58 do garanhão G1 e 26 do garanhão G2, sendo 15 coberturas

realizadas a tarde e 69 pela manhã. Apenas cinco saltos foram repetidos, por não se constatar a pulsão uretral no momento da primeira tentativa de cobertura. Destes, quatro foram oriundos do garanhão G1 e um do garanhão G2.

3.3.2.1 Manejo nutricional e instalações dos garanhões.

Quanto ao manejo nutricional, os garanhões alojados na estação de monta de Belo Horizonte (RCAT) recebiam, diariamente, cerca de 10 kg de capim elefante picado (*Pennisetum purpureum*, Schum.), cerca de 3 kg de feno de alfafa (*Medicago sativa*, L.), 3 kg de ração comercial peletizada¹, sal mineral² e água *ad libitum*.

Os animais permaneciam totalmente confinados em baias de alvenaria de 9 m² com piso cimentado, recoberto por cama de serragem, sendo retirados apenas nos momentos de cobertura das éguas. Na estação de monta de Florestal (NER), o manejo nutricional foi idêntico. No entanto, os garanhões eram mantidos em baias de 25 m², sendo soltos em piquete de 600m², em dias alternados.

3.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa S.A.S.³, por meio da aplicação de um modelo que inclui os efeitos fixos do intervalo de palpções, do garanhão e a interação dessas variáveis sobre as variáveis quantitativas (idade, número de éguas, número de ciclos estrais, número de ciclos estrais/égua, intervalo entre palpções, intervalo palpção/cobrição, número de ciclos estrais/éguas vazias, número de ciclos estrais/éguas gestantes).

Os dados proporcionais (taxa de concepção/ciclo estral e taxa de concepção total) foram submetidos ao Teste de Exato de Fisher. Para as variáveis quantitativas

¹ Nutriage® - Guabi

² Centauro® - Guabi

³ Statistical Analysis System – versão 5.0 (Microsoft®)

(número de ciclos/égua, número de ciclos estrais/égua gestante, número de ciclos estrais/égua vazia, intervalo de palpções, intervalo ovulação/cobertura, idade da égua/tratamento e a eficiência de prenhez) aplicou-se a análise GLM (general linear model - S.A.S.) para que pudesse ser retirado o efeito das parcelas perdidas. Sendo que para a comparação de mais de duas médias utilizou-se o Teste de Student-Newman-Keuls (SNK) e o Teste t de Student na comparação de duas médias.

A eficiência de prenhez, por se tratar de uma variável qualitativa, foi convertida em dados quantitativos, segundo proposta de Voss et al. (1975), atribuindo-se pontos para cada ciclo estral coberto, da seguinte forma: o valor dez foi dado para éguas que conceberam no primeiro ciclo estral; oito para concepção no segundo ciclo; seis para o terceiro ciclo e zero para os ciclos em que não houve concepção. Dessa forma, obteve-se um valor numérico médio, para cada grupo experimental, quando se processou a análise de variância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das variáveis

Levando-se em consideração o que foi sugerido por Valle (1997), as seguintes características foram avaliadas, referindo-se ao efeito do intervalo da palpação à cobertura sobre a fertilidade de éguas: idade da égua/tratamento, número de ciclos estrais/égua, intervalo de palpções, intervalo ovulação/cobertura, número de ciclos estrais/égua vazia, número de ciclos estrais/égua gestante, taxa de concepção/ciclo, taxa de concepção total e eficiência de prenhez.

Estas características reprodutivas podem ser classificadas em dois tipos de parâmetros: os de controle e os de resultado. Os parâmetros de controle referem-se aos que

forneem informações sobre a homogeneidade dos tratamentos não sendo, como os de resultados, respostas a determinado tratamento. Dentre estes, classifica-se: 1) número de ciclos - número de repetições ("n") utilizado em cada tratamento; 2) idade - idade média (meses) das éguas utilizadas em cada tratamento; 3) número de ciclos/égua - número de ciclos utilizados por cada égua, dentro de cada tratamento; e 4) número de coberturas/ciclo estral - número médio de coberturas realizadas por ciclo, considerando-se todos os ciclos de cada tratamento (positivos e negativos).

Já os parâmetros de resultados, fornecem informações sobre as respostas reprodutivas dos animais obtidos em cada grupo experimental, tais como: a) número de cobertura/ciclo positivo - número médio de coberturas realizadas por ciclo estral, considerando-se apenas os ciclos que resultaram em gestação; b) número de cobertura/ciclo estral negativo - número médio de coberturas realizadas por ciclo estral, considerando-se apenas os ciclos que não resultaram em gestação; c) número de ciclos/concepção - número de ciclos necessários para a obtenção de cada gestação (número de ciclos/gestação obtida); d) número de ciclos/égua gestante - número de ciclos necessários para que cada égua ficasse gestante; e) taxa de concepção/ciclo estral - número de éguas gestantes em relação ao número de éguas trabalhadas em cada ciclo, multiplicado por 100 (número de gestações obtidas/número de ciclos trabalhados x 100); f) taxa de concepção total - refere-se ao número de éguas gestantes em relação ao número de éguas trabalhadas em cada tratamento, multiplicado por 100; e g) eficiência de prenhez - corresponde a transformação dos valores qualitativos da gestação por ciclo estral, por meio de diferentes pontuações da taxa de concepção/ciclo estral.

Os dados dos parâmetros de resultado e de controle, de acordo com os grupos

definidos pelos intervalos palpação e cobertura, estão relacionados na Tab. 3.

Tabela 3: Parâmetros reprodutivos e de controle de éguas mestiças submetidas a duas freqüências de palpação retal (24 e 12 horas) e cobertas por dois garanhões.

Intervalo de Palpações	Garanhão 1		Garanhão 2	
	24 horas (P1G1)	12 horas (P2G1)	24 horas (P1G2)	12 horas (P2G2)
Parâmetros avaliados				
Nº de Éguas	17	20	12	10
Nº de Ciclos	25	33	16	10
Nº de Ciclo/Égua	1,32 ± 0,48 ^{a,b}	1,45 ± 0,62 ^a	1,25 ± 0,45 ^{a,b}	1,00 ± 0,00 ^b
Nº de Ciclo/Égua vazia	1,25 ± 0,45	1,25 ± 0,44	1,22 ± 0,44	1,00 ± 0,00
Nº de Ciclo/Égua Gestante	1,44 ± 0,53 ^{a,b}	1,77 ± 0,73 ^a	1,29 ± 0,49 ^{a,b}	1,00 ± 0,00 ^b
Idade das Éguas	104,56 ± 47,46 ^a	116,73 ± 65,80 ^{a,b}	156,38 ± 82,98 ^b	159,70 ± 85,54 ^b
Intervalo de Palpação (h)	23,45 ± 2,23 ^a	12,66 ± 2,40 ^b	24,12 ± 0,50 ^a	12,64 ± 1,68 ^b
Intervalo de Palpação/Cobertura (h)	1,04 ± 0,79	1,09 ± 0,66	1,43 ± 0,55	1,09 ± 0,62
Taxa Concepção/Ciclo (%)	36,00 (9/25)	39,40 (13/33)	43,75 (7/16)	60,0 (6/10)
Taxa de Concepção Total (%)	52,9 (9/17)	65 (13/20)	58,3 (7/12)	60 (6/10)
Eficiência de Prenhez	3,28 ± 4,50	3,33 ± 4,29	4,13 ± 4,87	6,00 ± 5,16
Perda Gestacional (%)	11,10 (1/9)	7,69 (1/13)	14,29 (1/7)	33,33 (2/6)

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

4.2 Número de éguas e de ciclos estrais por grupo de intervalo de palpações retais

O número de éguas e de ciclos estrais por intervalo de palpações retais (tratamentos) foi analisado como parâmetro de controle, sendo que os tratamentos P1G1, P2G1, P2G2 e P2G2 apresentaram 17 e 25 ciclos, 20 e 33, 12 e 16, e 10 e 10 éguas e ciclos estrais, respectivamente.

A desigualdade quanto ao número de éguas alocadas entre os quatro tratamentos, ocorreu por fatores não controlados durante a experimentação. No princípio, o desenho experimental contemplava a utilização de apenas um garanhão (G1), no entanto, devido sua qualidade seminal, refletido pela alta taxa de repetição de cio no início do experimento, optou-se pela utilização de um segundo garanhão (G2) que foi introduzido no experimento durante o terço médio da estação de monta. Assim, os tratamentos que utilizaram o garanhão G2 tiveram menor número de éguas, pois, algumas

delas já tinham sido cobertas pelo garanhão G1 e diagnosticadas como gestantes. Logo o número restante de éguas vazias foram uniformizadas e distribuídas aleatoriamente entre os quatro tratamentos. Além disto, éguas e potros acometidos por alguma enfermidade foram retirados da experimentação para que os mesmos pudessem ser tratados. Isto implicou em posterior realocação das unidades experimentais para que se mantivesse a uniformidade dos grupos, sendo realizado nova distribuição aleatória dos animais por meio de sorteio. Estas situações implicaram na diferença observada entre o número total de éguas (50 x 59) citado no item material e métodos e o apresentado na Tab. 3, respectivamente, visto que um mesmo animal pôde ter participado de diferentes grupos experimentais após sua realocação advinda dos fatores acima citados, o que levou a considerá-lo como nova unidade experimental. A partir de então, a diferença entre o número de ciclos estrais por garanhão ocorreu em resposta ao número de

éguas direcionadas para cada garanhão, nos diferentes tratamentos.

O baixo número de éguas e ciclos estrais por tratamento pode estar implicado na ausência de diferenças estatísticas entre os vários parâmetros avaliados. Segundo Amann e Pickett (1987), ao se analisar determinado parâmetro, por meio da análise binominal, caso o número de éguas ou de ciclos seja de 10, e esperando-se taxa de fertilidade de 65%, os valores reais poderão se situar dentro de uma amplitude de 35 a 95%, sem que isso caracterize diferença entre os grupos experimentais. Isto ocorre pela sobreposição dos intervalos de confiança, em nível de 95%. Mesmo considerando um número de 20 ciclos por grupo, ainda assim, para as condições apresentadas anteriormente, os valores reais poderão se situar dentro de uma amplitude de 44 a 86%, sem que o mesmo caracterize diferenças estatísticas entre os grupos.

Desta forma, a possível ausência de diferença, para algumas características avaliadas no presente trabalho, pode ter ocorrido pelo baixo número de ciclos estrais dentro de cada grupo experimental, devido à sobreposição dos intervalos de confiança.

4.3 Número de ciclos estrais por égua, por égua vazia e égua gestante

O presente estudo obteve, seguindo a prerrogativa da utilização de apenas uma cobertura por ciclo estral após o diagnóstico da ovulação, os valores de $1,32 \pm 0,48$, $1,45 \pm 0,62$, $1,25 \pm 0,45$ e $1,00 \pm 0,00$ ciclos estrais/égua para os tratamentos P1G1, P2G1, P2G1 e P2G2, respectivamente (Tab. 3), encontrando-se diferenças ($p < 0,05$) apenas entre os tratamentos P2G1 e P2G2.

O número de ciclos estrais/égua gestante para os tratamentos P1G1, P2G1, P1G2 e P2G2 foram de $1,44 \pm 0,53$, $1,77 \pm 0,73$, $1,29 \pm 0,49$ e $1,00 \pm 0,00$, respectivamente,

encontrando-se diferença ($p < 0,05$) apenas entre os tratamentos P2G1 e P2G2. Não se encontrou diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, no que se refere ao parâmetro número de ciclos estrais/égua vazia (tabela 3), com valores de $1,25 \pm 0,45$, $1,25 \pm 0,44$, $1,22 \pm 0,44$ e $1,00 \pm 0,00$ para os mesmos grupos, respectivamente.

A diferença ($p < 0,05$) encontrada entre os tratamentos P2G1 e P2G2 para o número de ciclos estrais/égua e número de ciclos estrais/égua gestante, pode ser considerada aleatória. A diferença entre estes dois tratamentos ocorreu devido ao tratamento P2G1 ter gerado maior número de ciclos estrais dentre todos os tratamentos. Em contra partida, o tratamento P2G2 gerou o menor número de ciclos. Como a distribuição das unidades experimentais dentro de garanhões foi aleatória e uniforme, e esta diferença só foi determinada entre estes dois tratamentos, podemos considerá-la como ao acaso.

Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos dados encontrados por Belling (1984) que, compilando os resultados de sete anos de trabalho a campo em 12 fazendas localizadas nos estados do Novo México, Texas e Flórida, obteve por meio da cobertura de 355 éguas, dentro de um período de até 24 horas pós-ovulação, uma taxa de 1,45 serviços/concepção, variando entre 1,0 a 1,56, que gerou taxa de concepção por serviço de 68% (293/425).

Resultados similares foram obtidos por Jacob et al. (2000) que, trabalhando com 15 éguas da raça Mangalarga Marchador inseminadas com sêmen fresco diluído em leite desnatado-glicose entre zero e 24 horas após a ovulação, obtiveram 73,3% de taxa de gestação (11/15), sendo necessários 1,3 ciclos/concepção para que todas as éguas ficassem gestantes. Também, Allen (1981) utilizou 17 éguas cobertas após a ovulação, por apenas um garanhão, e obteve taxa de

concepção de 76%, com 1,2 ciclos/concepção.

Em um trabalho semelhante ao que é apresentado aqui, Silva (1995) trabalhou com dois garanhões realizando coberturas até 6 horas após a ovulação em 33 éguas mestiças, obteve 2,33 e 1,80 ciclos/égua e 2,07, 1,33 ciclos/égua gestante, para os garanhões 1 e 2, respectivamente. Na mesma ordem anterior, Silva (1995), no mesmo trabalho, cobrindo 34 éguas até 12 horas após a ovulação, obteve 1,58 e 2,41 ciclos/égua e 1,37 e 1,92 ciclos estrais/égua gestante. Demonstrando não haver diferença entre os tratamentos.

Os dados da literatura científica que avaliam estas variáveis são escassos, o que, desta forma, limitaram a comparação com os resultados aqui expostos. Entretanto, dentro dos trabalhos que expõem a exequibilidade das coberturas após a ovulação, todos são unânimes em ressaltar que a menor taxa de coberturas por ciclo, neste tipo de tratamento, permite melhor condição uterina da égua e, com isto, favorecem a menor taxa de ciclos, tanto por égua gestante quanto por égua vazia.

Todavia, existem pesquisadores que propõem que quanto maior o número de inseminações ou coberturas/ciclo, melhores são as taxas de concepção obtidas (Voss et al., 1979; Pickett et al., 1987). Contudo, os resultados observados por outra linha de pesquisadores não suportam essa afirmativa. Eles consideram que o aumento no número de inseminações ou coberturas/ciclo estral não é acompanhado pelo aumento da fertilidade (Silva Filho et al., 1991; Silva Filho, 1994; Valle, 1997; Palhares, 1997; Brandão, 2001).

Para Palhares (1997), a fertilidade das éguas é muito mais dependente do adequado intervalo IA/ovulação, do que do número de inseminações artificiais, desde que na presença de uma concentração

espermática adequada. Assim, limitando-se o número de inseminações ou coberturas, melhora-se a eficiência dos programas reprodutivos, além de se reduzir o risco de contaminação iatrogênica do trato reprodutivo das fêmeas. Desta forma, necessitando, conseqüentemente, de menor número de ciclos estrais por concepção (Brinsko e Varner, 1992).

Vários autores (Silva Filho, 1994; Palhares, 1997; Valle, 1997; Brandão, 2001) ponderam sobre o número de coberturas ou inseminações que possam vir a influenciar a qualidade do ambiente uterino e, com isto, influenciar a taxa de concepção e o número de ciclos estrais necessários para se obter uma gestação. Segundo Silva Filho (1994), deve-se ressaltar que a frequência de inseminações ou coberturas ideal depende de uma série de fatores, que envolvem aspectos relacionados tanto com o garanhão quanto com a égua. Do ponto de vista do garanhão, os aspectos relacionam-se, inicialmente, com a grande variação individual entre reprodutores quanto a diferentes características. Estas referem-se à motilidade progressiva e total, à morfologia espermática, à concentração, à viabilidade espermática *in vitro*, ao tempo para a capacitação espermática e à duração da viabilidade do sêmen no sistema genital da égua. Do ponto de vista da fêmea, há que se considerar a qualidade do ambiente uterino, a presença e o funcionamento do reservatório espermático, o momento da ovulação e a duração da viabilidade do oócito no sistema genital.

Dentro destas prerrogativas, tanto o garanhão quanto a égua podem interferir no número de ciclos produzidos ao final de uma estação de monta. Por este motivo, deve-se então ponderar quanto à metodologia utilizada, monta ou inseminação artificial e o momento da cobertura, antes ou após a ovulação. Assim, considerando tais medidas, os dados aqui encontrados para o número de ciclos por

éguas gestantes ($1,44 \pm 0,53$ para P1G1, $1,77 \pm 0,73$ para P2G1, $1,29 \pm 0,49$ para P1G2 e $1,00 \pm 0,00$ para P2G2), foram semelhantes aos resultados encontrados por outros pesquisadores, que utilizaram metodologias diferentes.

Xavier (2006) inseminou éguas em 48 e 24 horas antes da ovulação, com intervalos entre as duas últimas inseminações de 48 e 72 horas e, ao depositar o sêmen no corpo ou ápice do corno uterino, obteve 1,67 e 1,71 ciclos estrais por gestação, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Brandão (2001) que utilizou sêmen a fresco diluído com duas concentrações distintas (200 e 400×10^6 sptz) e inseminou éguas a intervalos, das duas últimas inseminações, de 48 ou 72 horas. O autor obteve 2,00 e 1,82 e 1,75 1,70 ciclos por égua gestante nos intervalos de 48 e 72 horas, para as respectivas concentrações.

Devido ao fato desses autores terem utilizado metodologias diferentes da utilizada no presente trabalho, não se pôde realizar tais comparações. No entanto, o objetivo maior desta colocação é ressaltar o número médio de inseminações artificiais por ciclo estral, que foram utilizadas por estes trabalhos ($2,23$ - variando entre $2,0$ e $2,46$), para a obtenção de resultados similares aos encontrados aqui. Isto mostra que tais metodologias podem limitar a utilização de reprodutores de alto potencial genético, por se tornar inviável a coleta contínua do sêmen do garanhão ou até mesmo pela distância das matrizes, bem como devido ao garanhão necessitar servir grande número de éguas durante a estação de monta, como nas utilizadas nos condomínios de garanhões (Silva Filho, 1994).

Desta forma, ressaltando a importância da utilização de coberturas após a ovulação que, segundo Belling (1984), pode ser benéfica por: I) reduzir a chance de trauma

da égua; II) reduzir a chance de injúria do garanhão; III) reduzir a chance de infecção da égua e do garanhão; e IV) eliminar o desgaste provocado por cobrições sucessivas e desnecessárias da égua, principalmente no início da estação de monta, quando o estro é prolongado e, às vezes, anovulatório.

Os valores aqui obtidos têm implicações práticas e econômicas no sistema de produção animal que, atualmente, possui grande preocupação com a redução dos custos e com o aumento da produtividade. A diminuição do número de inseminações artificiais ou de coberturas para se obter um produto, além de diminuir os gastos com material, tempo e mão-de-obra especializada, proporciona também a economia do garanhão, por reduzir o número de cobrições durante a estação de monta (Brandão, 2001).

4.4 Efeito da idade sobre a taxa de perda embrionária de éguas cobertas 24 ou 12 horas após a ovulação

A idade da égua foi incluída neste trabalho como parâmetro de controle e a distribuição entre os diferentes tratamentos indicou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na idade média dos animais para os diferentes grupos experimentais. Entretanto, apesar de não mostrar distribuição homogênea entre os tratamentos, os resultados da taxa de concepção para os diferentes intervalos de palpação (P1 e P2) e garanhões (G1 e G2) não foram influenciados ($p > 0,05$) pela idade da égua.

A idade média das éguas para os grupos P1G1, P2G1, P1G2 e P2G2 foi de $104,56 \pm 47,46$, $116,73 \pm 65,80$, $156,38 \pm 82,98$ e $159,70 \pm 85,54$ meses, respectivamente (Tab. 3). A idade média do grupo P1G1 diferiu ($p < 0,05$) dos grupos P1G2 e P2G2, mas não do grupo P2G1. Também, vale ressaltar que não houve diferença ($p > 0,05$)

entre os grupos dos intervalos de palpação para um mesmo ganhão, mas sim, entre os ganhões. Desta forma, poder-se-ia esperar diferença nos parâmetros reprodutivos entre os dois ganhões, mas não entre os dois intervalos de palpação. Contudo, não foram encontradas diferenças ($p>0,05$) tanto entre os ganhões quanto entre os intervalos de palpação retal.

Poderia ser esperado que os grupos P1G2 e P2G2 apresentassem maior taxa de perda embrionária, já que eram compostos por éguas com idade média de 13 anos. Isto porque, segundo Hearn et al. (1993), a taxa de perda embrionária aumenta em éguas a partir desta idade.

Alguns autores consideram que a redução da fertilidade ocorre um pouco mais cedo, podendo ser considerada em éguas a partir de dez anos de idade.

Durante os anos de 1971 e 1972, Laing e Leech (1975) demonstraram que a fertilidade de éguas da raça Puro Sangue Inglês não se alterou até a idade de 10 anos. Todavia, após agruparem animais com faixa etária de dois a cinco, seis a nove, 10 a 13 e mais de 14 anos, verificaram que a taxa de gestação foi de 82,7%; 82,5%; 78,8% e 74,7%, respectivamente, com redução de 4% na taxa de fertilidade de éguas com idade de 10 a 13 anos. Estes dados foram corroborados pelo trabalho de Woods et al. (1987) que, após analisarem os resultados correspondentes a 1.115 ciclos estrais de éguas cobertas ou inseminadas durante o ano de 1985, e divididas em faixas etárias: 2-5 ($n=273$), 6-9 ($n=319$), 10-13 ($n=216$), 14-17 ($n=142$), 18-21 ($n=76$) e >21 ($n=36$) anos, obtiveram taxas de gestação de 56%, 55%, 60%, 51%, 45% e 33%, respectivamente.

Na mesma linha, Waelchli (1990), Camillo et al. (1997) e Brandão (2001) encontraram redução na taxa de concepção a partir de 11 anos de idade. Já, Wesson e Ginther (1981)

e Carnevale e Ginther (1992) observaram redução da fertilidade a partir de 15 anos.

Valle et al. (1999) estudaram o efeito da idade sobre as características ovulatórias e a fertilidade de 99 éguas (147 ciclos estrais) agrupadas segundo classes de idade (3-6, 7-10, 11-14 e 15-19 anos). Os autores não encontraram influência da idade sobre a velocidade de crescimento folicular e sobre o tamanho do folículo ovulatório. Todavia, observaram que a fertilidade reduziu após os 15 anos de idade, traduzida pela diminuição na taxa de concepção/ciclo (62,07%, 63,64%, 52,50% e 29,41%) e na eficiência de prenhez (5,93, 5,96, 4,80 e 2,71), respectivamente. Eles concluíram que as éguas mais velhas são responsáveis pelas maiores taxas de mortalidade embrionária devido, principalmente, às anormalidades no ambiente uterino, falhas do transporte embrionário ou ambiente inadequado da tuba uterina e por defeitos embrionários (Ball et al., 1986).

Considera-se que éguas mais velhas possuam pior qualidade do ambiente uterino, uma vez que exista posição anormal do útero, que se localiza mais cranioventralmente no abdômen, resultante da perda do suporte estrutural caudal do trato reprodutivo e o estiramento do ligamento largo do útero. Estes eventos prejudicam a eliminação do conteúdo uterino devido à ineficiência ou modificação no padrão de propagação e intensidade da contração miometrial, que impedem o satisfatório esvaziamento uterino nesses animais (LeBlanc et al., 1998; LeBlanc, 2003). A redução da contratilidade uterina pode dificultar a eliminação de bactérias e corpos estranhos do útero, aumentando a incidência de endometrites e acumulando exsudato inflamatório intra-uterino (Carnevale e Ginther, 1992).

Éguas mais velhas também possuem maior grau de degeneração vascular endometrial,

como elastose, fibrose, fibroelastose, fibrose perivasculare e processos de calcificação que contribuem com os distúrbios na drenagem uterina e, conseqüentemente, levam à persistência de edema endometrial, formando lacunas linfáticas. Isto também contribui para o atraso na limpeza uterina (LeBlanc, 2003).

Embora as mudanças uterinas estejam presentes nas éguas velhas, há redução da fertilidade antes mesmo do embrião chegar ao útero. Logo, a patologia uterina parece não ser a grande causa primária responsável pela redução da fertilidade de fêmeas mais velhas. Assim, considera-se que os oócitos anormais resultam na perda significativa da fertilidade de animais velhos (Carnevale e Ginther, 1994).

Estudos têm determinado que o aumento da idade materna (Bukvic et al., 2001) está associado com a deterioração do oócito. Infelizmente, poucos estudos têm tratado deste assunto em eqüinos. A reduzida fertilidade em éguas mais velhas também

pode ser atribuída à perda embrionária precoce (pré-blastocisto), ocasionada por anormalidades do oócito oriundo das alterações no crescimento folicular, que levam à grande incidência de aneuploidias (Ball, 2000), principalmente, quando envolve oócitos fecundados após 12 horas da ovulação, aumentando a taxa de perda embrionária (Allen, 1981; Ball et al., 1986; Woods et al., 1987).

Entretanto, apesar dos dados acima citados, no presente experimento isto não foi confirmado, já que a taxa de concepção e das perdas embrionárias, entre os tratamentos, não diferiram ($p>0,05$) em função da idade da égua.

No presente trabalho, todas as perdas embrionárias ocorreram entre o intervalo de 30^o e o 40^o dia de gestação, na frequência de 11,10% (1/9) para P1G1, 7,69% (1/13) para P2G1, 14,29% (1/7) para P1G2 e 33,33% (2/6) para P2G2, não diferindo ($p>0,05$) entre tratamentos (Tab. 4).

Tabela 4: Efeito da idade sobre a taxa de perda embrionária de éguas cobertas a intervalos de até 12 ou 24 horas após a ovulação.

Intervalo de Palpações	Garanhão 1		Garanhão 2	
	24 horas (P1G1)	12 horas (P2G1)	24 horas (P1G2)	12 horas (P2G2)
Parâmetros avaliados				
N ^o de éguas	17	20	12	10
N ^o de ciclos estrais	25	33	16	10
Idade das éguas (meses)	104,56 ±47,46 ^a	116,73 ±65,80 ^{a,b}	156,38 ±82,98 ^b	159,70 ±85,54 ^b
Perda gestacional (%)	11,10 (1/9)	7,69 (1/13)	14,29 (1/7)	33,33 (2/6)

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas, na mesma linha, diferem ($p<0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

Belling (1984) considera que a incidência de falhas na fecundação e de morte embrionária varia de 2 a 31%, e sua origem possui causas diversas. Também, para o mesmo autor a taxa de aborto, dependendo da classificação reprodutiva da égua, pode variar de 2,3 a 21%. Contudo, Bain (1969),

utilizando-se de palpação retal, estimou que a incidência de morte embrionária e a perda fetal, em éguas, variam entre sete e 16% e, para Ginther et al. (1985), utilizando exame ultra-sonográfico realizado entre 11 e 50 dias de gestação, variou entre cinco e 24%.

Diferente dos resultados encontrados no presente experimento (7,69 a 33,33% - Tab. 4), Belling (1984) analisou os dados de coberturas, por monta natural, realizadas em um período de até 24 horas após a ovulação e obteve média de 3,07% (0,0 – 6,9%) de perda embrionária, diagnosticada por exame no 19º dia de gestação.

Outros trabalhos realizados com coberturas após a ovulação, em períodos de tempo variados (6, 12, 24 ou 27 horas), corroboram com os dados obtidos no presente estudo: 11,10% (P1G1), 7,69% (P2G1), 14,29% (P1G2) e 33,33% (P2G2). Dentre aqueles, Kloppe et al. (1988) trabalharam com sêmen congelado e inseminaram éguas até seis horas após a ovulação, obtendo-se 9% (1/11) de perda embrionária. Já Woods et al. (1990), inseminando éguas até 12 ou 24 horas após a ovulação, registrou perda embrionária de 34 (13/38) e 33% (1/3), respectivamente, até o 40º dia de gestação. Koskinen et al. (1990) estudaram a fertilidade de 28 éguas cobertas entre zero e 27 horas pós-ovulação e observaram 13 gestações (46%). Dentre estas, verificaram cinco casos de morte embrionária (38,5%), o que reduziu a taxa de prenhez para 29%.

Estes resultados podem tentar suportar a hipótese de que a baixa taxa de concepção, advinda de oócitos fecundados após 12 ou 24 horas da ovulação, esteja mais associada ao envelhecimento do oócito pós-ovulação do que à idade materna. Esta hipótese difere dos resultados encontrados por Silva (1995) que utilizou cobrições de dois garanhões, seis e 12 horas após a ovulação, e obteve 9,09 e 8,33% de aborto (morte fetal acima de 60 dias de gestação), respectivamente. O autor considerou este resultado como mais ligado a fatores relacionados ao ambiente uterino do que à qualidade do embrião.

Assim, deve-se considerar que o alto índice de morte embrionária, no intervalo de 12 a 24 horas, mostra que, em éguas, idêntico ao

que acontece em outras espécies domésticas, a habilidade do oócito para ser fecundado desaparece mais tardiamente do que a habilidade do oócito fecundado se desenvolver em um embrião normal. Após 24 horas da ovulação, o oócito parece perder, inclusive, a capacidade para ser fecundado. Uma comprovação desta afirmativa poderiam ser os resultados apresentados por Katila et al. (1988) para o intervalo de 24 a 30 horas após a ovulação, que obtiveram taxa de concepção de 0%, resultado semelhante ao apresentado por Kahmi e Varadin (1964), utilizando cobrições dois dias após a ovulação.

No entanto, associando-se aos valores atribuídos às fêmeas, para a mesma variável, o garanhão também demonstra ser uma importante fonte de variação, devendo portanto ser considerado em qualquer que seja a forma de avaliação proposta para a fertilidade (Palhares, 1997).

No presente trabalho, os dois garanhões (G1 e G2) utilizados tinham 21 e 18 anos de idade, respectivamente. Segundo Pickett (1993), até aos cinco anos de idade, a produção espermática aumenta rapidamente, permanece constante até 12 anos e declina em seguida. Esse declínio é evidente quando se comparam as produções espermáticas de garanhões dos seis aos 20 anos de idade. Assim, por estar relacionada diretamente com o desenvolvimento e a funcionalidade testicular, a idade deve ser considerada como o principal fator que influencia a produção espermática diária, tendo conseqüências diretas no número de éguas que podem ser cobertas utilizando-se um único ejaculado (Pickett et al., 1989).

Smith e Lodge (2005), trabalhando com oócitos e espermatozoides envelhecidos de camundongos, demonstraram decréscimo na taxa de fecundação pela diminuição da penetração do espermatozóide no oócito. Estes autores citam que a formação do pró-núcleo não é afetada pelo espermatozóide

envelhecido. Entretanto, ela sofre ação do envelhecimento do oócito. Apesar de não interferir na formação pronuclear, estes autores consideram que os espermatozoides envelhecidos podem influenciar no processo de fecundação por atuarem negativamente no estágio de pró-metáfase. Desta forma, sugere-se que os efeitos prejudiciais na fecundação, resultantes de gametas envelhecidos, são devidos a diferentes mecanismos envolvendo tanto o espermatozoide quanto o oócito, sendo esses mecanismos afetados em diferentes momentos e em diferentes passos do processo de fecundação.

Por isto, se faz necessário incluir a idade dos garanhões como variável que possa interferir na taxa de concepção, apesar de que alguns autores (Parlevliet, 1997) consideram que o declínio na produção espermática, do garanhão, nem sempre influencie a qualidade espermática. Isto porque, mesmo com baixas concentrações espermáticas e alta porcentagem de espermatozoides mortos, alguns animais com mais de 13 anos podem produzir sêmen com morfologia espermática normal (Dowsett e Pattie, 1987).

No início da estação de monta o garanhão G1 apresentou 5% de defeito de cauda, 3% de defeito de cabeça, 5% de defeito de peça intermediária, 3% de gota citoplasmática proximal, 4% de gota citoplasmática distal e 80% de células normais. No fim da estação de monta, em novo exame, o mesmo garanhão apresentou 10% de defeito de cauda, 1% de defeito de cabeça, 2% de gota citoplasmática proximal, 2% de gota citoplasmática distal e 85% de células normais. Já, o garanhão G2, no início da estação de monta, apresentou 19% de defeito de cauda, 1% de defeito de cabeça, 3% de gota citoplasmática proximal, 5% de gota citoplasmática distal e 72% de células normais. Em novo exame, no final da estação de monta, apresentou 7% de defeito

de cauda, 3% de defeito de cabeça e 90% de células normais (Anexo 7.4).

Vários autores tentam correlacionar a fertilidade com uma ou várias características seminais, mas as correlações são baixas ou nulas. Em alguns casos esta interpretação torna-se difícil, pois garanhões com parâmetros considerados normais podem ser subfêrteis ou infêrteis, enquanto outros que apresentam parâmetros anormais são férteis. O trabalho de Bielanski (1975) demonstrou que garanhões com alto índice de anormalidades morfológicas espermáticas podem apresentar boa fertilidade. Além disso, quando se correlacionam os parâmetros seminais com a porcentagem de éguas gestantes/ciclo estral, a fertilidade parece ser um fenômeno casual (Magistrini et al., 1996).

Por esta razão, apenas os dados da avaliação espermática dos garanhões não são suficientes para determinar o quanto estes podem interferir ou não nos resultados de fertilidade do rebanho. Segundo Rousset et al. (1987), a capacidade reprodutiva de um garanhão deveria ser estimada somente após seis estações de monta, caso o garanhão viesse a cobrir pelo menos 25 ciclos/ano, ou então, ser estimada somente ao final de sua vida reprodutiva (por volta dos 17 anos), caso ele venha a cobrir menos de 25 ciclos/ano. Entretanto, Kenney et al. (1983) consideram que um garanhão, para ser considerado fértil, deve cobrir 40 éguas em monta natural ou 120 em inseminação artificial, e obter 75% de prenhez. Com isto, a única prova conclusiva da manutenção de boa fertilidade, para qualquer tratamento que a célula espermática seja submetida, é a inseminação ou a cobertura de éguas, avaliando-se a taxa de fecundação ou de prenhez (Palhares, 1997).

Infelizmente, no presente trabalho, não foi possível a obtenção dos dados anteriores dos garanhões, para que os mesmos fossem

julgados frente aos critérios de Rousset et al. (1987) ou Kenney et al. (1983). Contudo, Xavier (2006) trabalhou com o mesmo garanhão (G1), do presente experimento, e realizou inseminações artificiais com sêmen diluído em diferentes volumes e locais de deposição. Ele comparou seus dados (volume do sêmen sem gel, do número total de espermatozoides/mL, número total de espermatozoides/ejaculado e motilidade espermática) com os valores preconizados por Pickett (1993), e verificou menor qualidade das características espermáticas, dentro dos valores aceitáveis, para um garanhão aprovado para a fertilidade.

Entretanto, a má qualidade dos parâmetros físicos seminais não impediu que Xavier (2006) obtivesse, deste mesmo garanhão, boa taxa de concepção total (84,21%) que, de certa forma, concorda com Magistrini et al. (1996). Estes autores afirmam que os garanhões com parâmetros considerados

anormais, em comparação com o padrão, em alguns casos, são férteis.

Desta forma, pode ser considerado que as taxas de perda embrionária (Tab. 4) encontradas no presente trabalho, podem estar ligadas mais ao envelhecimento do oócito fecundado após a ovulação, do que pela idade do garanhão, já que não diferiram ($p>0,05$) entre os tratamentos e os garanhões.

4.5 Intervalo de palpação e palpação/cobertura

Os intervalos de palpações e da palpação à cobertura foram avaliados, neste trabalho, como parâmetro de controle, onde os intervalos de palpações para os grupos P1G1, P2G1, P1G2 e P2G2 foram de $23,45 \pm 2,23$, $12,66 \pm 2,40$, $24,12 \pm 0,50$ e $12,64 \pm 1,68$, respectivamente (Tab. 5). Os intervalos da palpação a cobertura foram de $1,04 \pm 0,79$, $1,09 \pm 0,66$, $1,43 \pm 0,55$ e $1,09 \pm 0,62$, seguindo a mesma ordem anterior.

Tabela 5: Intervalo de palpação e palpação/cobertura de éguas cobertas a intervalos de 24 ou 12 horas após a ovulação.

Intervalo de Palpações	Garanhão 1		Garanhão 2	
	24 horas (P1G1)	12 horas (P2G1)	24 horas (P1G1)	12 horas (P2G2)
Parâmetros avaliados				
Nº. de éguas	17	20	12	10
Nº. de ciclos	25	33	16	10
Intervalo de Palpação (h)	$23,45 \pm 2,23^a$	$12,66 \pm 2,40^b$	$24,12 \pm 0,50^a$	$12,64 \pm 1,68^b$
Interv. Palpação/Cobertura (h)	$1,04 \pm 0,79$	$1,09 \pm 0,66$	$1,43 \pm 0,55$	$1,09 \pm 0,62$

^{a,b} Médias seguidas por letras minúsculas, na mesma linha, diferem ($p<0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

Os resultados indicaram homogeneidade entre os tratamentos ($p>0,05$) para o intervalo palpação/cobertura e diferença ($p<0,05$) para os intervalos de palpações. A diferença encontrada entre os intervalos de palpações (P1= 24 horas e P2= 12 horas) já era esperada, em virtude desta variável constituir fonte dos tratamentos.

Deve-se ressaltar que neste trabalho, devido aos animais sofrem apenas uma (P1= 24 h) ou duas (P2= 12 h) palpações diárias (manhã ou manhã e final da tarde) respectivamente, as éguas que tinham a ovulação diagnosticada poderiam ter, no máximo, de tempo de ovulação de 24 ou 12 horas. Como a ovulação, na espécie equina, é distribuída igualmente ao longo das 24

horas do dia (Palhares, 1989), deve-se levar em consideração que as éguas que não ovularam logo após o término do exame dos ovários, poderiam ter a ovulação distribuída ao longo do dia. Assim, os animais que eram palpados apenas pela manhã (07:00 às 08:00 horas) e não foram diagnosticados como ovulados, poderiam ter suas ovulações distribuídas, segundo Palhares (1989), em 22,30% das 06:00 às 12:00h, 30,70% das 12:00 até as 18:00h, 21,20% das 18:00 até as 00:00h e 25,80% das 04:00 até as 06:00 horas. Da mesma forma, as éguas que eram palpadas duas vezes por dia e que não tinham a ovulação diagnosticada no segundo exame (18:00 – 19:00h), poderiam ter a ovulação diagnosticada no próximo exame, distribuída em 21,20% das 18:00 às 00:00h e 25,80% das 00:00 às 06:00 horas (Palhares, 1989).

Com isto, considerou-se que nos animais examinados apenas uma única vez ao dia, 77,7% das ovulações (Palhares, 1989) poderia ser decorrente de períodos de tempo menores do que 24 horas. Contudo, no grupo de duas palpções diárias, cujos animais que não eram diagnosticados ovulados no momento do segundo exame, 47% das ovulações (Palhares, 1989) poderia ser oriunda de um período de tempo menor do que 12 horas.

Além do que foi exposto anteriormente, devemos considerar o tempo necessário para a formação do reservatório e capacitação espermática, já que no presente estudo foi utilizado monta natural para a cobertura das éguas. Nos eqüinos, durante o estro, sugere-se que as pregas edematosas longitudinais e profundas da junção útero-tubária (Boyle et al., 1987) funcionem como o local de estabelecimento do reservatório espermático (Lyle e Ferrer, 2005). Após a passagem pela junção útero-tubária, os espermatozóides são normalmente retidos no istmo inferior, formando “um reservatório espermático

funcional”, possivelmente pelo padrão miocontrátil dessa região e pela extrema viscosidade do fluido no lúmen tubárico, durante o estro. Juntamente com este processo, os espermatozóides devem sofrer uma série de mudanças metabólicas e estruturais (capacitação espermática), que são necessárias antes de adquirirem a habilidade de se ligarem à zona pelúcida e fecundarem o oócito (Triana et al., 1990).

A duração do processo de capacitação, *in vivo*, não é conhecida para todas as espécies (Amann e Graham, 1993), mas acredita-se que seja dependente do balanço de estrógeno/progesterona (Delpuch e Thibault, 1993). Assim, levando-se em consideração apenas o tempo requerido para a formação do reservatório espermático que, segundo alguns autores, é de aproximadamente quatro horas a partir da deposição das células espermáticas no útero (Troedsson et al., 1998), deveremos contabilizar esse período de tempo no envelhecimento do oócito após a ovulação. Segundo Hunter (1974), além destes fatores, deve-se considerar que para a maioria das espécies, o intervalo necessário para ativação do oócito poderá ser, provavelmente, de seis a oito horas, levando-se em consideração o oócito já ovulado.

Outro fator adicional para o aumento do tempo transcorrido da ovulação à concepção, é o intervalo palpação/cobertura que, apesar de não ter diferido ($p>0,05$) entre os tratamentos, deve ser considerado, contribuindo para o tempo de envelhecimento do oócito após a ovulação. Esta variável ocorreu em virtude do tempo de preparo da égua para a cobertura, que envolveu a lavagem do períneo, o enfaixamento da cauda, a colocação dos travões na égua e o deslocamento do garanhão para o local onde se realizaram as coberturas das éguas.

O intervalo da palpação à cobertura foi, em média, de 1,17 horas, variando entre $1,04 \pm 0,79$ e $1,43 \pm 0,55$, respectivamente, para os grupos de intervalo de palpação de 24 e 12 horas. Desta maneira, apesar de parte das ovulações, provavelmente, terem ocorrido em um período de tempo menor do que o esperado, 24 (P1) ou 12 horas (P2), elas sofreram influência do período de tempo para a formação do reservatório espermático, capacitação espermática, ativação do oócito e preparo do animal para a cobertura. Com isto, dever-se-ia contabilizar, aproximadamente, até oito horas a mais, quanto ao envelhecimento do oócito. Assim, as ovulações que ocorreram dentro do período esperado, 22,3% (P1) e 53% (P2) (Palhares, 1989), e contabilizando-se um tempo de, aproximadamente, 24 ou 12 horas da ovulação, respectivamente, poderiam ter sido subseqüentemente fecundadas em um período de tempo maior do que estes, podendo ter ocorrido dentro de, aproximadamente, 32 ou 20 horas após a ovulação.

4.6 Taxa de concepção total e por ciclo estral de éguas mestiças submetidas a dois regimes de palpação diária

A taxa de concepção de éguas inseminadas, após a ovulação, tem sido citada desde a década de 30 (Saltzman, 1940), e os autores consideram que inseminações realizadas após 12 horas da ovulação, tanto com sêmen a fresco quanto por monta natural, possuem baixa taxa de fertilidade (Koskinen et al., 1990). Isto se deve ao curto período de viabilidade do oócito no trato genital, considerado ser de 8 a 10 horas (Chang, 1951; Hunter, 1990). Todavia, Silva (1995), que trabalhou com monta natural seis e 12 horas pós-ovulação,

demonstrou que o oócito equino mostra-se viável por até 12 horas após ser ovulado, sendo sua viabilidade dependente do estágio de desenvolvimento em que este se encontra no momento da ovulação (Hunter, 1990).

Entretanto, considera-se que a taxa de recuperação embrionária reduz com o aumento do tempo entre ovulação e a cobertura. Segundo Koskinen et al. (1990), a taxa de perda embrionária pode chegar a 31,00% (4/13) em coberturas realizadas após 12 horas da ovulação. Isto porque acarretam atraso no desenvolvimento embrionário, resultando em embriões menores e com desenvolvimento retardado. À medida que o tempo entre a ovulação e a inseminação artificial aumenta, ocorre desenvolvimento embrionário cada vez mais lento em decorrência do envelhecimento do oócito (Huhtinen et al., 1996).

Neste contexto, as taxas de gestação no primeiro, segundo e terceiro ciclos estrais, do presente experimento foram, respectivamente, de: 29,41% (5/17) e 50,00% (4/8), para o tratamento P1G1; 25,00% (5/20), 54,54% (6/11) e 100,00% (2/2) para o tratamento P2G1; 41,66% (5/12) e 50,00% (2/4) para o tratamento P1G2; e 60,00% (6/10) para o tratamento P2G2. A taxa total de concepção por ciclo, para os mesmos grupos, foi de 36,00% (9/25), 39,40%, 43,75% (7/16) e 60,0% (6/10), respectivamente (Tab. 6). Sendo que as taxas de concepção total, para estes mesmos grupos, foram de 52,9%, 65%, 58,3% e 60%. Todos os tratamentos tiveram menos de dois ciclos estrais por gestação: $1,44 \pm 0,53$ (P1G1), $1,77 \pm 0,73$ (P2G1), $1,29 \pm 0,49$ (P1G2) e $1,00 \pm 0,00$ (P2G2).

Tabela 6: Taxa de gestação por ciclo estral de éguas mestiças cobertas após a ovulação por dois garanhões, seguindo o regime de duas ou uma palpação retal diária.

Trat.	Garanhão 1				Garanhão 2			
	24 horas (P1G1)		12 horas (P2G1)		24 horas (P1G2)		12 horas (P2G2)	
Ciclo	Nº de ciclos	Taxa de Concepção	Nº de ciclos	Taxa de Concepção	Nº de ciclos	Taxa de Concepção	Nº de ciclos	Taxa de Concepção
1	17(5)*	29,41%	20(5)*	25,00%	12(5)*	41,66%	10(6)*	60,00%
2	8(4)*	50,00%	11(6)*	54,54%	4(2)*	50,00%	--	--
3	--	--	2 (2)*	100,00%	--	--	--	--
Total/Ciclo	25(9)*	36,00%	33(13)*	39,40%	16(7)*	43,75%	10(6)*	60,00%
Taxa de Concepção Total	52,9% (9/17)		65% (13/20)		58,3% (7/12)		60% (6/10)	

*Nº entre parênteses referem-se às éguas gestantes. A taxa de concepção por ciclo não difere ($p > 0,05$).

As taxas de concepção total e por ciclo estral, apresentadas na Tab. 6, não diferiram ($p > 0,05$) pelo teste Exato de Fisher, tanto para os intervalos de palpação (12 e 24

horas) quanto para os garanhões. Desta forma, os dados foram agrupados levando-se apenas em consideração a frequência de palpação retal (Tab. 7).

Tabela 7: Taxa de concepção total e por ciclo estral de éguas mestiças cobertas após a ovulação, segundo o regime de duas ou uma palpação retal.

Intervalo de Palpações	24 horas		12 horas	
	Nº de ciclos	Taxa de Concepção	Nº de ciclos	Taxa de Concepção
Ciclo				
1	29 (10)*	34,48%	30 (11)	36,67%
2	12 (6)	50,00%	11(6)	54,55%
3	--	--	2 (2)	100,00%
Total/Ciclo	41 (16)	39,02%	43 (19)	44,19%
	Nº de Éguas	Taxa de Concepção	Nº de Éguas	Taxa de Concepção
Total/Égua	29 (16)	55,17%	30 (19)	63,3%

* N° entre parênteses referem-se às éguas gestantes. A taxa de concepção por ciclo não diferiu ($p > 0,05$), independente do garanhão, pelo teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado.

É difícil realizar uma comparação dos dados obtidos neste experimento em relação aos dados da literatura, devido à utilização de diferentes metodologias de inseminações artificiais ou monta natural, diferentes intervalos de cobrição em relação ao momento da ovulação e diferentes maneiras de utilização do sêmen (fresco, fresco-diluído, resfriado ou congelado), além de outras variáveis a se considerar, tais como, a fertilidade das éguas e dos garanhões utilizados.

Desta forma, levando-se em consideração apenas a relação dos intervalos de palpação sobre a taxa de concepção, o presente experimento obteve 39,02% (16/41) para o intervalo de 24 horas e 44,19% (19/43) para o intervalo de 12 horas, considerando o número total de ciclos e 55,17% (16/29) e 63,3% (19/30), considerando o número total de éguas. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Palmer (1984; 47%) e Silva (1995; 36,50%) para taxa de concepção por ciclo e Zivotokov (1940; 34,7%) e Skatkin (1943; 39%) para taxa de concepção total

realizando coberturas até 12 horas após a ovulação.

Katila et al. (1988) trabalharam com controle folicular a intervalos de 6 horas e avaliaram a taxa de concepção de éguas inseminadas de seis a 12, de 12 a 18, de 18 a 24 e de 24 a 30 horas após a ovulação. Eles obtiveram índices de concepção total de 100% (5/5), 100% (5/5), 40% (2/5) e 0% (0/5), respectivamente. Todas as éguas cobertas até 18 horas após a ovulação ficaram gestantes, mas nenhuma após 24 horas da ovulação.

Aliev e Ochkin (1979) utilizaram doses de sêmen congelado (25 – 30 mL), contendo 2×10^9 a 3×10^9 espermatozoides, para inseminar éguas de 2 a 12 h ou de 13 a 24 h após a ovulação, e obtiveram taxas de concepção total de 63 e 67%, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Cheng (1965) que, por meio de controle folicular a intervalos de 6 a 12 h e utilizando inseminações seis horas após a ovulação, obteve taxa de concepção total de 85,7%.

Kedrov (1944) utilizou grupos de 19, 21, 43, 15 e sete éguas, com inseminações artificiais dentro de 2, 4, 6, 8 e 10 h após a ovulação, e obteve taxas de concepção total de 79, 76,2, 77, 75,3 e 82,7%, respectivamente. Além disso, observou que nas fêmeas inseminadas de 2 a 10 h após a ovulação, a taxa de concepção total foi de 76,2%. Este mesmo autor, durante os anos de 1937 a 1939, realizou comparações entre éguas inseminadas antes ($n = 241$) e após a ovulação ($n=150$), e obteve taxa de concepção de 51,8% 56%, respectivamente.

Aehnelt e Plas (1947) realizaram inseminações após a ovulação e obtiveram taxa de concepção de 62,9%. Da mesma forma, Martin (1980) realizou inseminações após a ovulação durante três anos consecutivos (1977, 1978 e 1979), e os

resultados obtidos foram de 25,2%, 27,2% e 21,1%, respectivamente.

Skatkin (1943), em cobrições realizadas após a ovulação, obteve taxas de concepção de 55,2% para 29 éguas cobertas na primeira ou segunda hora, e de 39% para 41 éguas cobertas de 2 a 10 h após. Além disto, não registrou nenhuma gestação acima do intervalo de 10 h.

Em trabalho similar, Kloppe et al. (1988) estudaram o efeito do intervalo da inseminação e a ovulação, utilizando sêmen congelado (600×10^6 espermatozoides/dose inseminante). Para tal, dividiram as éguas em três grupos experimentais: I – éguas inseminadas diariamente até a ovulação, com palpções retais também diárias; II – éguas inseminadas em dias alternados até a ovulação, mas submetidas a palpções transretais diárias; e III – éguas inseminadas seis horas após a ovulação, e submetidas a palpções transretais a cada seis horas. No grupo controle utilizou-se sêmen a fresco, sendo as éguas inseminadas em dias alternados (500×10^6 de espermatozoides por dose inseminante). As taxas de prenhez obtidas aos 16 dias, no primeiro ciclo, não diferiram ($p>0,05$). As inseminações pré-ovulação com sêmen congelado, resultaram em 60% de concepção, enquanto inseminações pré-ovulação com sêmen a fresco resultaram em fertilidade de 70%. Além disso, uma única inseminação pós-ovulação com sêmen congelado respondeu com taxa de concepção total de 55%. Os autores concluíram que as inseminações de 12 a 15 horas após a ovulação são o limite para a gestação, em virtude do oócito reter a habilidade para ser fecundado por poucas horas após a sua liberação (Skatkin, 1943; Kloppe et al., 1988).

Ferraz e Vicente (2006) estudaram a influência do momento da cobrição em relação à ovulação, sobre a fertilidade e a

ocorrência de morte embrionária. Estes autores utilizaram 405 éguas da raça Puro Sangue Inglês, acompanhadas por 629 ciclos estrais. As éguas foram divididas em cinco grupos, de acordo com o momento da cobertura: grupo I - composto por 79 éguas cobertas entre 48 e 36 horas antes da ovulação; grupo II - com 102 éguas cobertas 36 a 24 horas antes da ovulação; grupo III - com 166 éguas cobertas 24 a 12 horas antes da ovulação; grupo IV - com 185 éguas cobertas até 12 horas antes da ovulação; e grupo V - formado por 97 éguas cobertas até 12 horas após a ovulação. Os maiores índices de gestação foram observados nos grupos III e IV ($p < 0,06$), e determinou-se que o melhor momento para cobertura é a realizada 24 horas antes da ovulação.

Esses dados ressaltam como demonstrados no presente estudo, que há queda na taxa de concepção de oócitos fecundados após 12 ou 24 horas da ovulação, tal como observado por Zivotkov (1940) que obteve os melhores resultados de concepção total (85,6 a 87,6%), em mais de 700 éguas com inseminações antes da ovulação. As inseminações no momento da ovulação resultaram numa queda de 12% (63 éguas; de 72,7 a 76,7% de concepção), e nas realizadas de 2 a 10 horas após a ovulação queda acima de 50% (27,3% e 34,7% em 44 éguas). Estes resultados são contrários aos obtidos no presente experimento, onde foram encontradas taxas de concepção total de 55,17% (16/29) para o intervalo de até 24 horas e de 63,3% (19/30) para o intervalo de até 12 horas da ovulação.

Poucos são os trabalhos que, utilizando coberturas após a ovulação, obtiveram bons resultados e, dentre estes, se destacam os trabalhos de Allen (1981) e Belling (1984), realizados sob diferentes condições.

Em 1980, Allen (1981) utilizou 17 fêmeas cobertas após a ovulação, por apenas um

garanhão, e obteve taxa de concepção total de 76%, com 1,2 ciclos/concepção.

Belling (1984) utilizou cobrições após a ovulação em larga escala, em 12 rebanhos particulares. Durante um período de sete anos, o autor supervisionou o cruzamento de 355 éguas dentro de 24 horas após a ovulação. Os resultados das cobrições após a ovulação foram computados, utilizando-se o número de serviços/concepção e índice total de concepção. Foram necessários 425 serviços para obter 293 gestações. Ao final do quarto ciclo estral a taxa de concepção total foi de 82,53% (293/355). Devendo, aqui ressaltar, que os valores encontrados para taxa de gestação total, no presente estudo, 55,17% (16/29) para o intervalo de até 24 horas e de 63,3% (19/30) para o intervalo de até 12 horas da ovulação, foram obtidos com a utilização de apenas dois ciclos estrais por égua. Salvo dois animais que foram cobertos até o terceiro ciclo estral.

Jacob et al. (2000) realizaram um experimento com éguas da raça Mangalarga Marchador, visando analisar a fertilidade de inseminações realizadas antes e após a ovulação. Os autores utilizaram sêmen a fresco diluído com concentração sempre superior a 500×10^6 espermatozoides móveis por dose inseminante. A taxa de concepção total foi de 73,3% para o grupo de fêmeas inseminadas uma única vez após a ovulação, não diferindo ($p > 0,05$) do grupo inseminado no período pré-ovulatório (89,5%). Os resultados acima citados divergem de outros autores, tais como os obtidos por Katila et al. (1988) que obtiveram taxas de 40% para o intervalo de 18 a 24 h após a ovulação, e de 46% (13/28) para o intervalo de zero a 27 horas.

Deve-se ressaltar que a maior parte dos trabalhos citados na literatura faz menção às inseminações ou coberturas realizadas até 12 horas após a ovulação. Os trabalhos que realizaram coberturas em intervalos

superiores a 12 horas, mencionam queda da fertilidade.

Palmer (1984), realizando duas palpções transretais diárias em 34 éguas inseminadas com sêmen a fresco, observou queda drástica da fertilidade/ciclo quando o intervalo da ovulação à inseminação passou de 0-12 horas (8/17 – 47%) para o período de 12-24 horas (3/17 – 18%).

O trabalho de Woods et al. (1990) corrobora com os dados encontrados por Palmer (1984), onde demonstraram que as inseminações realizadas até seis horas após a ovulação foram acompanhadas por melhor taxa de gestação, quando comparadas com as realizadas 18 a 24 horas após a sua detecção.

Também, Koskinen et al. (1990) avaliaram a fertilidade segundo vários intervalos de inseminação pós-ovulação (6-12, 12-18, 18-24 e 24-30 horas) utilizando sêmen a fresco diluído, na dose de 500×10^6 de espermatozoides e obtiveram taxa de concepção total de 100% (n=5), 100% (n=5), 40% (n=5) e 0% (n=5), respectivamente, demonstrando que a capacidade de fecundação do oócito equino decresce após 18 horas da ovulação.

Frente aos resultados citados pela literatura, acima descritos, seriam esperadas diferenças nas taxas de concepção das coberturas realizadas até 24 (P1) e 12 horas (P2) após a ovulação. Contudo, no presente experimento, isto não ocorreu ($p > 0,05$). Hunter (1990) sugere que a homogeneidade entre as respostas de éguas cobertas 12 ou 24 horas após a ovulação se dá pelo fato do oócito, ocasionalmente, poder ser liberado no estágio de desenvolvimento primário, secundário ou até mesmo num estado intermediária, condição variável entre animais e entre ciclos estrais. Tal variação, na égua, poderia ser atribuída à falta do pico pré-ovulatório de LH, diferente de outras espécies (ovelha, vaca e porca).

Dessa forma, o oócito primário ovulado na forma imatura poderia continuar à meiose na tuba uterina, o que daria maior viabilidade, antes do início do processo degenerativo, do que para oócitos ovulados em estágio secundário (Hunter, 1990).

Apesar de, aparentemente, a viabilidade do oócito ter garantido a homogeneidade ($p > 0,05$) dos valores da taxa de concepção total por ciclo, 44,19% (19/43) e 39,02% (16/41) e por égua, 63,3% (19/30) e 55,17% (16/29), para as coberturas realizadas dentro do intervalo de 12 horas e 24 horas, respectivamente, após ovulação, considera-se esses valores como baixos, quando comparados com os trabalhos de Allen (1981 - 76-100 %), Belling (1984 - 80,82%), Koskinen (1990 - 100 %) e Jacob et al. (2000), 75 %, que realizaram coberturas a intervalos de até 12 ou 24 horas após a ovulação.

Esta menor taxa de concepção total, tanto por ciclo quanto por animal, pode ser atribuída a vários fatores, podendo ocorrer por: retenção do embrião na tuba uterina (Huhtinen et al., 1996), falha na fecundação (Hunter, 1990; Baird et al., 2005; Pellestor et al., 2006), incidência de mosaicismos nos cromossomos sexuais (Blue, 1981), deterioração progressiva (Fissore et al., 2002; Yuan et al., 2005), edemaciação dos grânulos corticais (Hunter, 1990) e rompimento de algumas das membranas mitocondriais do oócito, ou mesmo pela redução da sua habilidade de gerar adenosina trifosfato (ATP), por conta do envelhecimento após a ovulação, tendo conseqüências negativas sobre a proliferação e a sobrevivência da célula (Fissore et al., 2002).

Desta forma, deve-se considerar, segundo Carnevale e Ginther (1994), que há redução da viabilidade do embrião, antes mesmo dele chegar ao útero, levando-se em consideração o aumento do tempo transcorrido da ovulação à fecundação.

Vários estudos, envolvendo diversas espécies, indicaram que a qualidade do oócito diminui com o maior tempo transcorrido entre o momento da ovulação e a fecundação, podendo haver maior incidência de oócitos anormais e com falhas no desenvolvimento subsequente. Devendo-se ressaltar, segundo o trabalho de Palhares (1989) que realizou controle folicular ovariano em éguas da raça Mangalarga Marchador, a cada 6 horas (06:00-12:00, 12:00-18:00, 18:00-24:00 e 24:00-06:00 horas), e encontrou 22,30%, 30,70%, 21,20% e 25,80% de ovulações, respectivamente, que, no presente experimento, os oócitos fecundados podem ter sido ovulados até 12 ou 24 horas antes da cobertura, de acordo com o tratamento exposto.

A associação dos fatores acima descritos explica, pelo menos em parte, a queda da fertilidade, quando coberturas são realizadas com mais de 18 horas após a ovulação (Palmer, 1984; Hunter, 1990, Woods et al., 1990; Pellestor et al., 2006).

A ausência de diferenças ($p > 0,05$) entre os intervalos de palpação (P1=12 e P2=24 horas) deste experimento, permite especular que a viabilidade do oócito equino perdurou por, pelo menos, 24 horas, apesar de apresentar baixa viabilidade, expressa pela menor taxa de concepção total por ciclo 39,02% (16/41) e por égua 55,17% (16/29). Assim, considera-se que independentemente do sistema de cobrição utilizado, as taxas de concepção mais satisfatórias são obtidas quando as éguas são inseminadas o mais próximo da ovulação (Cheng, 1965; Aliev, 1979), dependendo o sucesso de cobrições pós-ovulação, fundamentalmente, do tempo necessário para a capacitação do espermatozóide e da duração da viabilidade do oócito no sistema genital da égua (Silva Filho, 1994).

Apesar de todas essas prerrogativas, o resultado da taxa de concepção total do presente estudo foi obtido de dois ciclos estrais por égua. Podendo, assim, especular que a possibilidade de um maior número de serviços por égua geraria uma taxa final de concepção maior, independente do intervalo de palpação, como obtido por Belling (82,53%, 1984) após o quarto serviço.

4.7 Eficiência de prenhez de éguas submetidas a dois intervalos distintos de palpação

Segundo Belling (1984), um dos métodos de avaliar a eficiência de prenhez é baseado no número de serviços/concepção, estando sujeito a uma gama de fontes de variações e, dentre essas, pode-se considerar o estado reprodutivo da égua (seca, lactante ou solteira), o número de vezes que foi coberta por ciclo, o método usado para determinar o momento da cobertura e se foi coberta por monta natural ou inseminação artificial. Outro método para avaliar a eficiência de prenhez, segundo este mesmo autor, é baseado na taxa de concepção, que é influenciada pela monta natural ou inseminação artificial, número de coberturas por ciclo estral, o estado reprodutivo da égua e o intervalo de parição.

No presente estudo, utilizou-se a taxa de concepção para avaliação da eficiência de prenhez, segundo o método de sistema de pontos proposto por Voss et al. (1975), onde as éguas que concebiam no primeiro ciclo estral recebiam a nota 10, no segundo ciclo recebiam a nota oito, no terceiro ciclo a nota seis e as éguas que saíam da estação de monta vazias recebiam a nota zero. Esta metodologia permite, por meio deste sistema, utilizar métodos estatísticos mais adequados para detectar menores diferenças (Voss et al., 1975).

A eficiência de prenhez encontrada neste trabalho não diferiu ($p>0,05$) entre os tratamentos, sendo de $3,28 \pm 4,50$ para o tratamento P1G1, $3,33 \pm 4,29$ para o

tratamento P2G1, $4,13 \pm 4,87$ para o tratamento P1G2 e $6,00 \pm 5,16$ para o tratamento P2G2 (Tab. 8).

Tabela 8: Taxa de concepção/ciclo, perda gestacional e eficiência de prenhez em éguas submetidas a dois intervalos de palpação retal.

Tratamento	Garanhão 1		Garanhão 2	
	(P1G1)	(P2G1)	(P1G2)	(P2G2)
Parâmetros avaliados	24 horas	12 horas	24 horas	12 horas
Nº Éguas	17	20	12	10
Nº Ciclos estrais	25	33	16	10
Taxa de concepção/ciclo (%)	36,00 (9/25)	39,40 (13/33)	43,75 (7/16)	60 (6/10)
Perda Gestacional (%)	11,10 (1/9)	7,69 (1/13)	14,29 (1/7)	33,33 (2/6)
Eficiência de Prenhez	$3,28 \pm 4,50$	$3,33 \pm 4,29$	$4,13 \pm 4,87$	$6,00 \pm 5,16$

Resultados semelhantes foram obtidos por Valle (1997), Palhares (1997) e Brandão (2001) que inseminaram éguas 72 horas antes e após o diagnóstico da ovulação, utilizando sêmen diluído e resfriado para os dois primeiros autores e sêmen fresco diluído no caso do último autor. A eficiência de prenhez foi de 5,11, 4,22 e 5,30, respectivamente, para os mesmos autores. E, para Silva (1995), utilizando de cobertura por monta natural às seis e 12 horas após ovulação, obteve 4,93 e 5,77 de eficiência de prenhez, respectivamente.

A ausência de diferenças pode ser devido ao pequeno número de ciclos utilizados no experimento. Segundo Silva Filho (1994), este é um dos problemas encontrados por diferentes pesquisadores no que diz respeito à experimentação com reprodução de equinos, onde a utilização de pequeno número de éguas ou ciclos por tratamento pode gerar a sobreposição dos intervalos de confiança, levando ao erro do tipo II, ou seja, os resultados são diferentes mas, à luz da baixa amostragem, a análise estatística os considera como semelhantes.

Isto pode ser verificado quando comparamos os valores de P2G1 (3,33) e P2G2 (6,00), que apresentaram desvios padrão de 4,29 e 5,16, respectivamente. Logo, pode-se considerar que os valores

poderão oscilar entre 0 e 7,62 ou 0,84 e 11,16 e, desta maneira, sobrepondo-se.

Entretanto, deve ser considerado que a eficiência de prenhez obtida neste estudo é reflexo direto da baixa taxa de concepção. Lembrando, como citado anteriormente, que nem a idade das éguas nem os garanhões utilizados, puderam ser determinados como fonte da baixa taxa de concepção e, conseqüentemente, do baixo valor da eficiência de prenhez. Logo, pode-se especular que esta variável é efeito direto da viabilidade dos oócitos fecundados após 12 ou 24 horas da ovulação.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste experimento pode-se concluir que:

- 1 - Coberturas realizadas, após a ovulação, a intervalos de palpação de até 24 horas, na espécie equina, mostram-se viáveis;
- 2 - A menor taxa de concepção de éguas cobertas 24 ou 12 horas após a ovulação não foi associada diretamente à idade da égua ou do garanhão;
- 3 - Estratégias de manejo de palpação transretal, a cada 12 ou 24 horas, podem ser

utilizadas como alternativa para assegurar bons índices de fertilidade, a partir de garanhões ou éguas limitados para esta função.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T. J.; BERISHA, B; OZAWA, T; et al. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biology of Reproduction*, v. 61, n. 6, p. 1419–1425, 1999.

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, v. 82–83, p. 127–140, 2004.

AEHNELT, E.; PLAS, J. Ovulation and fertilization in the mare. *Animal Breeding Abstracts*, v.15, n. 4, p. 233, 1947 (Abstract).

AGUIAR, J. J.; LOSINNO, L.; KONCURAT, M.; et al. Nuclear, cytoplasmic and mitochondrial patterns of ovulated oocytes in young and mares. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 689-692, 2002 (Abstract).

ALIEV, A.; OCHKIN, D. The optimum time of insemination. *Animal Breeding Abstract*, v. 47, n. 10, p. 5273, 1979 (Abstracts).

ALJARRAH, A. H. *Methods to induce earlier onset of cyclicity in transitional mares*. 2004. 65f. (Dissertation) - Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, USA.

ALLEN, W. E. Fertility in pony mares after post ovulation service. *Equine Veterinary Journal*, v. 13, n. 2, p.134-135, 1981.

ALLEN, W. R. The physiology of early pregnancy in the mare. Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, v. 46, p. 338-354, San Antonio, Texas, USA, 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2000/contents.pdf>. Aces so em: 26/10/2006.

ALLEN, W. R. Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. *Animal of Reproduction*, v. 2, n. 4, p.209-223, 2005.

ALMAHBOBI, G.; PAPADOPOULOS, V.; CARREAU, S. et al. Age-related morphological and functional changes in the leydig cells of horse. *Biology of Reproduction*, v. 38, n. 3, p. 653-665,1988.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Practice*, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, Cap. 80, p. 717-718.

ANGELL, R. R.; XIAN, J.; KEITH, J. Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Human Reproduction*, v. 8, n. 7, p. 1047–54, 1993.

ARMSTRONG, D. T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, v. 55, n. 6, p.1303-1322, 2001.

AURICH, J.E.; HOPPEM, H. O.; HOPPE, H. et al. Endogenous opioids and reproductive functions the horse. *Animal Reproduction Science*, v. 42, n. 1-4, p. 119-129, 1996a.

- AURICH, C.; BURGMANN, F.; HOPPE, H. Opioid regulation of luteinising hormone and prolactin release in the horse-identical or independent endocrine pathways? *Animal Reproduction Science*, v. 44, n. 2, p. 127-134, 1996b.
- AURICH, C.; BUDIK, S. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandins in early equine embryos. In: *Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare III*. Ed. Stout T. A. E. and Wade, J. F. 13th – 16th, Barbados, West Indies, 2004, p. 31-32.
- BAIN, A. M. Estrus and infertility of the thoroughbred mare in Australasia. *Journal American Veterinary Medical Association*. v. 15, p. 179-185, 1957.
- BAIN, A. Foetal losses during pregnancy in the thoroughbred mare: a record of 2562 pregnancies. *New Zealand Veterinary Journal*, v.17, n.1-2, p.155-158, 1969.
- BAIRD, D.T.; COLLINS, J.; EGOZCUE, J.; et al. Fertility and ageing. *Human Reproduction Update*, v.11, n.3 p. 261–276, 2005.
- BALL, B. A.; LITTLE, T. V.; HILLMAN, R. B. et al. Pregnancy rates at days 2 and 14 estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. *Theriogenology*, v. 26, n. 5, p. 611-619, 1986.
- BALL, B. A. Reduced reproductive efficiency in the aged mare: role of early embryonic loss. In: Recent Advances in Equine Theriogenology. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2000/contents.pdf>> Acesso em: 02/09/2006.
- BALL, B. A.; BAUMBER, J.; SABEUR, K. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 299-300, 2002.
- BAZER, F.W.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T. Fertilização, clivagem e implantação. In: HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap. 8, p. 191-193.
- BEDFORD, J. M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biology of Reproduction*, v. 28, n. 1, p. 108-120, 1983.
- BEDFORD, S. J.; HINRICHS, M. K. K.; FISSORE, R. A. Patterns of intracellular calcium oscillations in horse oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection: possible explanations for the low success of this assisted reproduction technique in the horse. *Biology of Reproduction*, v.70, n. 4, p. 936–944, 2004.
- BELLING, T. H. Postovulation breeding and related reproductive phenomena in the mare. *Equine Practice*, v. 6, n. 6, p. 12-19, 1984.
- BEN-YOSEF, D.; SHALGI, R. Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends in Molecular Medicine*, v.7 n. 4, p. 163-169, 2001.
- BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C. et al. Interação entre células do *cumulus* e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.4, p.488-496, 2004.
- BIELANSKI, W. The evolution of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. *Journal Reproduction and Fertility*, Suppl. 23, p. 19-23, 1975.
- BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J. Reproductive

- physiology of the nonpregnant mare. In: *Manual of Equine Reproduction*. Missouri, 1998, p. 9-13, Mosby-Year Book.
- BLUE, M.G. A citogenetical study of prenatal loss in the mare. *Theriogenology*, v.15, n. 3, p.295-309, 1981.
- BOERBOOM, D.; BROWN, K. A.; VAILLANCOURT, D. et al. Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.70, n. 2, p. 391–399, 2004.
- BOYLE, M.S.; CRAN, D.G.; ALLEN, W.R. et al. Distribution of spermatozoa in the mare's oviduct. *Journal Reproduction and Fertility*, Suppl. 35, p. 79-86, 1987.
- BOWMAN, M. C. *Utilizing body temperature to evaluate ovulation in mature mares*. 2006, 53f. (Master of science). Graduate Studies of Texas A&M University, Texas, USA.
- BOWEN, J. A.; BURGHARDT, R. C. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm Animals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 11, 2000: p. 93–104 doi: 10.1006/scdb. 2000.0155. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>> Acesso em: 10/10/ 2006.
- BRANDÃO, F.Z. Efeito da concentração espermática e do intervalo entre as duas últimas inseminações sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído. 2001.94f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária UFMG.
- BRANDON, C.I.; HEUSNES, G.L.; CAUDLE, A.B. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, v.52, n. 5, p. 363-373,1999.
- BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Artificial insemination and preservation of semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 8, n. 1, p. 205-218, 1992.
- BRINSKO, S.P.; BALL, B.A.; ELLINGTON, J.E. In vitro maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares. *Theriogenology*, v. 44, n. 4, p. 461469, 1995.
- BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BAUER, J. E. et al. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. *Animal Reproduction Science*, Article in Press. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>, Acesso em: 23/11/ 2006.
- BUKVIC, N.; GENTILE, M.; SUSCA, F. et al. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutation Research*, v. 498, n. 1-2, p. 159–167, 2001.
- CAMILLO, F.; MARMORINI, P.; ROMAGNOLI, S. et al. Fertility at the first post partum estrous compared with fertility at the following estrous cycles in foaling mares and with fertility in nonfoaling mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 17, n. 11, p. 612-616, 1997.
- CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Relationship of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*, v. 37, n. 5, p. 1101-1115, 1992.
- CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Reproductive function in old mares. *American Association of Equine Practitioners*, annual convention, 37, p.15, 1994.

- CECCONI, S. Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: Problems and future perspective. *Journal of Reproduction and Development*, v. 48, n. 5, p. 431-445, 2002.
- CHANG, M. C. Fertilization capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. *Nature*, v. 168, n. 4277, p. 997-998, 1951.
- CHEN, M. S.; TUNG, K. S. K.; COONROD, S. A. et al. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6 \beta 1$: Implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 21, p. 11830 - 11835, 1999.
- CHENG, P. L. The application of some investigations of reproductive physiology in horse breeding practice in China. *Animal Breeding Abstract*, v. 33, n. 1, p. 58, 1965 (Abstract).
- CHEVALIER-CLÉMENT, F. Pregnancy loss in the mare. *Animal Reproduction Science*, v. 20, n. 3, p. 231-244, 1989.
- CLAUS, R.; SCHAMS, D. Influence of mating and intrauterine oestradiol infusion on peripheral oxytocin concentrations in pigs. *Journal of Endocrinology*, v. 126, n. 3, p. 361-365, 1990.
- COLENBRANDER, B.; BROWERS, J. F. H. M.; NEILD, D. M. et al. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4., p.341-345, 2002.
- COSGROVE, J. R.; de RENSIS, F.; FOXCROFT, G. R. Opioidergic pathways in animal reproduction: their role and effects of their pharmacological control. *Animal Reproduction Science*, v. 33, n.1-4, p. 373-392, 1993.
- CUMMINS, J.M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 115S, Suppl.1, p. S23-S29, 2004.
- D'CRUZ, O. J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. *Frontiers in Bioscience*, v.1, p. 161-176, 1996.
- DEICHSEL, K.; AURICH, J.; PARVIZI, N.; et al. LH and IGF-1 release during oestrus and early luteal phase in lactating and non-lactating horse mares. *Animal Reproduction Science*. v. 91, n. 1-2, p. 97-106, 2006.
- DELPECH, S.; THIBAUT, C. Acquisition of sperm fertilizing ability: epididymal maturation, accessory glands and capacitation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. *Reproduction in mammals and man*, Paris: Ellipses, 1993. Cap. 14, p. 268-278.
- DINGER, J. E.; NOILES, E. E. Ovarian activity in synchronized mares following administration of follicles stimulating hormone. *Animal Reproduction Science*. v. 7, n. 6, p. 511-516, 1984.
- DOWSETT, K.F.; PATTIE, W.A. Variation in characteristics of stallion semen caused by breed, age, season of year and service frequency. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 35, p. 645-647, 1987.
- DOWSETT, K.F.; KNOTT, L.M. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*, v. 46, n. 3, p. 397-412, 1996.
- DUC-GOIRAN, P.; MIGNOT, T. M.; BOURGEOIS, C. et al. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *European Journal of*

Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v. 83, n. 1, p. 85–100, 1999.

EICHENLAUB-RITTER, U. Genetics of oocyte ageing. *Maturitas*, v. 30, n. 2, p. 143–169, 1998.

EVANS, J. P. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human Reproduction Update*, v.8, n.4, p.297-311, 2002.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 203-216. 2003.

FERNANDES, C. B. *Maturação in vitro de ovócitos eqüinos: comparação entre os meios TCM 199, SOFaa e HTF:BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do hormônio de crescimento eqüino por meio da transferência de ovócitos*. 2004. p.129. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu-SP.

FERNANDES, C. E.; PIMENTEL, C. A. Características seminais e fertilidade em garanhões. *Ciência Rural*, v.32 n.5, p. 829-834, 2002.

FERRAZ, L.E.S.; VICENTE, W.R.R. Influência do momento da cobrição, em relação à ovulação, na fertilidade e na ocorrência de morte embrionária precoce em eqüinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.4, p.537-543, 2006.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; MATTOS, A L.G.; et al. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, 2006 (no prelo).

FISSORE, R. A.; KUROKAWA, M.; KNOTT, J. et al. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*, v. 124, n. 6, p. 745–754, 2002.

FITZGERALD, B.P.; MELLBYE, L.B. Effect of administration of an α -adrenergic agonist, xylazine, on 2 pulsatile gonadotrophin secretion in anoestrous horse mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 84, n. 2, p. 693–700, 1988.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 135-163, 2003.

FORTUNE, J.E.; RIVERS, G. M.; YANG, M.Y. Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83. 2004.

FRANZ, L. C. *Effects of roscovitine on in vitro maturation of equine*. 2002. 132f. (Master of Science). Colorado State University. Fort Collins, Colorado.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, v. 63, n. 2, p. 431–444, 2005.

GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: PROCEEDINGS OF A WORK SHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12, 2003, Brewster – Massachusetts, p. 43-48.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M. et al. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n.3-4, p. 249-265, 2001.

- GASTAL, E. L. *Selection of the dominant follicle in mares: role of follicle – diameter differences, gonadotropins, and estradiol*. 1999. 258f. (Doctor in Philosophy) University of Wisconsin – Madison.
- GERLACH, T; AURICH, J. E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science*, v. 58, n. 3-4, p. 197–213, 2000.
- GINTHER, O. J.; WHITMORE, H. I.; SQUIRES, M. S. Characteristics of estrus, diestrus and ovulation in mares and effects and nursing. *American Journal Veterinary Research*, v. 33, n. 10, p. 1935-1939, 1972.
- GINTHER, O. J. In: *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. *Equiservices Publishing*, Cross Plains, WI, USA, p 137-144, 1979.
- GINTHER, O. J. Intrauterine movement of the early conceptus in barren and postpartum mares. *Theriogenology*, v. 21, n. 4, p. 633-644, 1984.
- GINTHER, O. J.; GARCIA, M. C.; BERGFELT, D. R. Embryonic loss in mares: Pregnancy rate, length of interovulatory intervals and progesterone concentrations associated with loss during days 11 to 15. *Theriogenology*, v.24, n. 4, p.409-417, 1985.
- GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, n. 2, p. 61-79, 2000.
- GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, 2003.
- GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. et al. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 4, p. 1195–1201, 2004.
- GINTHER, O.J.; BEG, M. A.; GASTAL, E.L. et al. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. *Reproduction*, v. 130, n. 3, p. 379–388, 2005.
- GONZÁLEZ, F. H. D. Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária. Laboratório de bioquímica clínica animal. UFRGS, 87p, 2002. Disponível em <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/endocrino/endocrinolvet.pdf>. Acesso em: 05/09/2006.
- GORDO, A. C.; RODRIGUES, P.; KUROKAWA, M.; et al. Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in in vitro aged mouse Eggs. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 6, p. 1828–1837, 2002.
- GRANGER, A.L.; WYATT, W.E.; CRAIG, W.N. et al. Effects of breed wintering diet on growth , puberty and plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in heifers. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 6, n. 3, p, 253-262. 1989.
- GREENHOFF, G.H.; KENNEY, R.M.. Evaluation of reproductive status of nonpregnant mares. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 167, n.6, p. 449-458, 1975.
- GUPTA, S. K.; SRIVASTAVA, N.; CHOUDHURY, S. et al. Update on zona pellucida glycoproteins based contraceptive vaccine. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 62, n. 1-2, p. 79–89, 2004.
- HABLE, W. E.; KROPF, D. L. Sperm entry induces polarity in fucoid zygotes, *Current*

Opinion in Plant Biology, v. 3, n. 3, p.174, 2000.

HE, Z.Y.; BRAKEBUSCH, C.; FÄSSLER, R. et al. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Developmental Biology*, v. 254, n. 2, p. 226-237, 2003.

HEARN, P.; BONNETT, B.; SAMPER, J. Factors influencing pregnancy and pregnancy loss on one thoroughbred farm. American association of equine practitioners, annual convention, v. 39, p. 161-162, 1993

HENRY, M. R. J. M. *Some special aspects of the physiopathology of reproduction in mares*. 1981. 219f. Thesis... Rijksuniversiteit Gent, Faculteit Van de Diergeneeskunde, Voortplanting en Verloskunde Bij Grote Huisdieren.

HERRLER, A.; PELL, J. M.; ALLEN, W. R. et al. Horse conceptuses secrete insulin-like growth factor-binding protein 3. *Biology of Reproduction*, v.62, n. 6, p. 1804-1811, 2000.

HESS, M. F.; ROSE, J. F. The effects of age, season and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor I concentration in stallions. *Theriogenology*, v. 56, n. 5, p. 723-733, 2001.

HOMA, S. T.; CARROLL, J.; SWANN, K. Fertilization and early embryology: The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reproduction*, v. 8, n. 8, p. 1274-1281, 1993. Abstract. Disponível em: <<http://humrep.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/8/8/1274>> Acesso em 16/11/2006.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Estrous cycle and ovulation

in the mare. *Journal American Veterinary Medical Association*. v. 161, n. 11, p. 1367-1374, 1972.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. The oestrous cycle of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 23, p. 161-166, 1975.

HUHTINEN, M.; KOSKINEN, E.; SKIDMORE, J. A. et al. Recovery rate and quality of embryos from mares inseminated after ovulation. *Theriogenology*, v. 45, n. 4, p. 719-726, 1996.

HUNTER, R. H. F. Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *Sus scrofa*. *Anatomical Record*, v. 178, n. 2, p. 169-185, 1974.

HUNTER, R. H. F. Gamete lifespans in the mare's genital tract. *Equine Veterinary Journal*, v. 22, n. 6, p. 378-379, 1990.

IROIG, J. M. ; MUÑOZ, F.; PIEDRAFITA, J.; et al. Prediction of the day of ovulation in mares through physiological parameters measured during estrous. *Revista Científica*, v. 14, p. 1-8, 2005. Disponível em: file:///C:/SciELO/serial/rc/v14n1/body/art_08.htm. Acesso em: 10/09/2006.

JACOB, J. C. F.; ALBUQUERQUE, F. T.; DOMINGUES, M. B.; et al. Taxa de gestação em éguas mangalarga marchador inseminadas pós-ovulação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.24, n.1, p.51-55, 2000.

JAMNONGJIT, M.; HAMMES, S. R. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Seminars In Reproductive Medicine*, v. 23, n. 3, p. 234-241, 2005.

KAJI, K.; KUDO, A. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction*, v. 127, n. 4, p. 423-429, 2004.

- KAMHI, S.; VARADIN, M. Time breeding and ovulation in mares relationship with conception arte in the mares. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 5, 1964, Trento. Proceedings..., Trento: 1964. v. 2, p.274-277.
- KATILA, T; KOSKINEN, E.; KUNTSI, H. et al. Fertility after postovulatory inseminations in mares. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 11, 1988, Dublin. Proceedings..., Dublin: University College Dublin, 1988. v. 2, abstr. 96. (Brief communications).
- KATILA, T. Sperm–uterine interactions: a review. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n. 3-4, p. 267–272, 2001.
- KEDROV, V. K. Mating of mare with prolonged heat. *Animal Breeding Abstracts*, v. 13, n. 3, p. 131, 1944 (Abstracts).
- KELLEY, K. K. *Estradiol interactions with dopamine antagonists in mares: prolactin secretion and reproductive traits*. 2004. 48f. (Master of Science). Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, USA.
- KENNEY, R. M.; R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R. et al. *Manual for breeding soundness examination of stallions*. Fort Collins: Journal Society of Theriogenology, 1983, v. 3, 100p.
- KING, S. S.; CAMPBELL, A. G.; DILLE, E. A. et al. Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 28, n. 4, p. 405–415, 2005.
- KLOPPE, L. H.; VARNER, D. D.; ELMORE, R. G.; et al. Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 29, n. 2, p. 429-439, 1988.
- KOSKINEN, E.; LINDEBERG, H.; KUNTSI, H.; et al. Fertility of mares after postovulatory insemination. *Zentralbl Veterinarmed A*. v. 37, n. 1, p. 77-80, 1990. Pubmed – Abstract. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>. Acesso em: 19/08/2006.
- LAFOREST, M. L. E Controle de la maturation nucléaire des ovocytes porcins: Implication de la phosphodiesterase de type 3 et de l'AMPK (5'adenosine monophosphate-activated protein kinase). 2005. 158f. Faculte des Ciencias de L'Agriculture et de L'Alimentation Université Laval, Québec.
- LAING, J. A.; LEECH, F. B. The frequency of infertility in thoroughbred mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. n. 23, p. 307-310, 1975.
- LAMIRANDE, E. De; JIANG, H.; ZINI, A. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, n. 2, p. 48-54, 1997.
- LASSERRE, A.; LEZ-ECHEVERRÍ, F. G; MOULES, C. et al. Identification of human sperm proteins involved in the interaction with homologous zona pellucida. *Fertility and Sterility*, v. 79, Suppl. 3, p. 1606-1615, 2003.
- LeBLANC, M. M.; NEUWIRTH, L.; JONES, L. et al. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology*, v. 50, n. 1, p.49-54, 1998.
- LeBLANC, M. M. Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. In: Recent Advances in Equine Reproduction,

- B.A. Ball (Ed.) Publisher: *International Veterinary Information Service* (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA, 2003.
- LEEB, T.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E. Genetic markers for stallion fertility-lessons from humans and mice. *Animal Reproduction Science*, v. 89, n. 1-4, p. 21-29, 2005.
- LEITH, G. S.; GINTHER, O. J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology*, v. 22, n. 4, p.401-408, 1984.
- LENNARD, S. N.; GERSTENBERG, C.; ALLEN, W. R. et al. Expression of epidermal growth factor and its receptor in equine placental tissues. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.112, n.1, p. 49-57, 1998.
- LIU, C.; LITSCHER, E. S.; WASSARMAN, P.M. Zona pellucida glycoprotein mZP3 bioactivity is not dependent on the extent of glycosylation of its polypeptide or on sulfation and sialylation of its oligosaccharides. *Journal of Cell Science*, v. 110, n. 6, p. 745-752, 1997.
- LYLE, S. K.; FERRER, M. S. Low-dose insemination - Why, when and how. *Theriogenology*, v. 64, n. 3, p. 572-579, 2005.
- MACMILLAN, K. L.; SEGWAGWE, B. V. E.; PINO, C. S. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Animal Reproduction Science*. v. 78, n. 3-4, p. 327-34. 2003.
- MAGISTRINE, M.; VIDAMENT, M.; CLEMENT, F. et al. Fertility prediction in stallions. *Animal Reproduction Science*, v. 42, n. 2, p. 181-188, 1996.
- MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. n. 27, p. 447-451, 1979.
- MARTIN, J. C. Regulation on oestrus cycle, particularly oestrus synchronization, in connection with artificial insemination in the horse. *Animal Breeding Abstracts*, v. 49, n. 7, 3703, 1981.
- MAYES, M. *The meiotic arrest of bovine oocytes*. 2002. 171f. (Doctor Philosophy). Faculte des Sciences de L'Agriculture et de L'Alimentation, Université Laval Québec.
- McDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W. et al. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biology of Reproduction*, v. 39, n. 2, p. 340-348, 1988.
- McDonnell, S. M. Techniques for extending the breeding career of aging and disabled stallions. *Clinical Techniques in Equine Practical*, v. 4, n. 4, p. 269-276, 2005.
- MEIZEL, S.; TURNER, K. O. Chloride efflux during the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction is inhibited by lavendustin A, a tyrosine kinase inhibitor. *Journal of Andrology*, v. 17, n. 4, p. 327-30, 1996.
- MEN, H; MONSON, R. L.; PARRISH, J. J.; et al. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology*, v. 47, n. 1, p. 73-81, 2003.
- MENG, L.; WOLF, D. P. Sperm-induced oocyte activation in the rhesus monkey: nuclear and cytoplasmic changes following intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, v.12, n.5, p.1062-1068, 1997.

- MEYERS, S. A.; IRWIN K.M.; JAMES, L.; et al. Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: comparisons between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, v. 46, n. 7, p. 1277-1268, 1996.
- MIHM, M.; BLEACH, E. C. L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 217-237, 2003.
- MURDOCH, W. J. Differential effects of indomethacin on the sheep ovary: Prostaglandin biosynthesis, intracellular calcium, apoptosis and ovulation. *Prostaglandins*, v. 52, n. 6, p. 497-506, 1996.
- MURDOCH, W. J.; COLGIN, D. C.; ELLIS, J. A. Role of tumor necrosis factor- α in the ovulatory mechanism of ewes. *Journal Animal Science*, v.75, p.1601-1605, 1997.
- MURDOCH, W. J.; MCDONNELL, A. C. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and Carcinogenesis. *Reproduction*, v. 123, n. 6, p. 743-750, 2002.
- MURDOCH, W.J.; PETERSON, T.A.; VAN KIRK, E. A. et al. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biology of Reproduction*, v. 35, n. 5, p.1187-1194, 1986.
- MURRELL, S. L. *Efficacy of oral altrenogest for postponing ovulation in the mare*. 2003. 86f. (Master of Science). Texas A&M University, Texas, USA
- MYLES, D. G. Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Developmental Biology*, v. 158, n. 1, p. 35-45, 1993.
- MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of Reproduction*, v. 56, n. 2, p.320 - 327, 1997
- NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 245-262, 2000.
- NIKOLAKOPOULOS, E.; KINDAHL, H.; GILBERT, C.L. et al. Release of oxytocin and prostaglandin F2 α around teasing, natural service and associated events in the mare. *Animal Reproduction Science*, v.63, n. 1-2, p. 89-99, 2000.
- OSMAN, R. A.; ANDRIA, M. L; JONES, A. D. et al. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.160, n. 2, p. 828-33, 1989.
- PALHARES, M. S. Fertilidade e controle. *Cavalo Marchador*, v. 1, p. 9-10, 1987.
- PALHARES, M. S. *Avaliação da atividade ovariana e eficiência reprodutiva de potras e éguas da raça Mangalarga Marchador*. 1989. 89p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária UFMG.
- PALHARES, M. S. *Adequação de um novo container para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado: I. Características termodinâmicas e funcionais; II. Desempenho reprodutivo das éguas inseminadas*. Tese de doutorado, p. 246. UFMG, Belo Horizonte, 1997.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. *Tenth International Congress Animal Reproduction Arte Insemination II*, p. 377-379, 1984.

- PANG, S.F.; LI, L.; AYRE, E.A.; et al. Neuroendocrinology of melatonin in reproduction: recent developments. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 14, n. 3-4, p. 157–166, 1998.
- PARKINSON, T. J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *Veterinary Journal*, v. 168, n. 3, p. 215–229, 2004.
- PARLEVLIET, J. M. Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. In: Clinical aspects of stallion fertility. Utrecht: Proefschrift Universiteit Utrecht. 1997. 123p.
- PATIÑO, R.; YOSHIZAKI, G.; THOMAS, P. et al. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, v. 129, n. 2-3, p. 427-439, 2001.
- PELLESTOR, F.; ANDRÉO, B.; ANAHORY, T. et al. The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic studies of human oocytes. *European Journal of Medical Genetics*, v. 49, n. 2, p. 103–116, 2006.
- PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O. *Procedures of collections, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination*. Fort Collins: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, 1987, 125 p.
- PICKETT, B. W.; AMANN, R.P.; MCKINNON, A. et al. *O. Management of the stallion for maximum reproductive efficiency, II*. Fort Collins: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, 1989. 126 p.
- PICKETT, B. W. Reproductive evaluation of the stallion: In: MCKINNON, A. D. e VOSS, S. L. (ed.) *Equine Reproduction*, Malvern: Lea e Febiger, 1993. p. 760-764.
- PLACHOT, M. Genetic Analysis of the Oocyte - A Review. *Placenta*, v. 24, S66–S69, 2003.
- PLAS, E.; BERGER, P.; HERMANN, M.; et al. Effects of aging on male fertility? *Experimental Gerontology*, v. 35, n. 5, p. 543–551, 2000.
- PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, v. 296, n. 5576, p. 2183-2185, 2002.
- RAMBAGS, B. P. B.; VAN BOXTEL, D. C. J.; THARASANIT, T. et al. Oocyte mitochondrial degeneration during reproductive ageing in the mare. In: International equine gamete group. Proceedings of a Workshop. Kühlungsborn, Germany. 18th. Editors: H. Alm, H. Torner and J. F. Wade. p. 25-27, 2005.
- RAMBAGS, B. P. B.; VAN BOXTEL, D. C. J.; THARASANIT, T.; et al. Maturation in vitro leads to mitochondrial degeneration in oocytes recovered from aged but not young mares. *Animal Reproduction Science*, v. 94, n. 1-4, p. 359–361, 2006.
- RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; HONARAMOOZ, A. et al. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 259-270. 2003.
- RIGBY, S. L.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R. C. et al. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. *Biology of Reproduction*, v.65, n. 3, p. 740–747, 2001.
- ROBERTS, R. M.; XIE, S.; MATHIALAGAN, N. Maternal

- Recognition of Pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 294-302, 1996.
- ROMANO, M. A.; MUCCILOLO, R. G.; SILVA, A. E. D. Biologia reprodutiva de éguas: estudo do ciclo estral e momento de ovulação. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v. 35, n. 1, p. 25-28, 1998.
- ROSER, J. F. Testicular function and fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 20, n. 2, p. 90-93, 2000.
- ROSER, J. F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n. 3-4, p. 139-151, 2001.
- ROUSSET, H.; CHANTELAUBE, C.; MAGISTRINE, M. Assessment of fertility and semen evaluation of stallion. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 35, p. 25-31, 1987.
- SALTZMAN, A. A. Insemination of mares after ovulation. *Animal Breeding Abstracts*, v. 8, n. 16, 1940.
- SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. *Animal Reproduction Science*, v. 75, n. 1-2, p. 73-94, 2003.
- SHIRAZI, A.; GHARAGOZLOO, F.; NIASARI-NASLAJI, A. et al. Ovarian follicular dynamics in caspian mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 22, n. 5, p. 208-211, 2002.
- SILVA, M. D. *Influência de dois sistemas de cobertura após a ovulação, sobre a fertilidade de éguas, reabsorção embrionária e sexo dos produtos*. 1995. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária.
- SILVA, N.; BRAGA, C. E; COSTA, G. M.; et al. Isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria in uterine infections in mares. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 3, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php>>. Acesso em: 26/11/2006.
- SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, F. A.; CARVALHO, G. R. et al. Efeito da palpação transretal no índice de concepção de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991, Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: CBRA, 1991, p. 267.
- SILVA FILHO, J. M. *Avaliação do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de eqüinos*. 1994, 408f. Tese (Doctor Scientiae). Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia,
- SIRARD, M. A.; COENEN, K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemi-sections of follicles: Effects on meiotic resumption. *Theriogenology*, v. 40, n. 5, p. 933-942, 1993.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*, v. 49, n. 2, p. 483-497, 1996.
- SKATKIN, P.N. Systems of mating and artificial insemination of horses. *Animal Breeding Abstracts*, v. 11, n. 2, p. 86, 1943. (Abstract).
- SKIDMORE, L. Maternal Recognition of Pregnancy. In: Lecture Notes for the Short Course in Reproduction in the Dromedary Camel, L. Skidmore (Ed.) Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. 2004.

- SMITH, M. J.; JENNES, L. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction*, v. 122, n. 1, p 1–10, 2001.
- SMITH, A. L.; LODGE, J. R. Interactions of aged gametes: In vitro fertilization using in vitro-aged sperm and in vivo-aged ova in the mouse. *Molecular Reproduction and Development*, v. 16, n. 1, p. 47 – 56, 2005. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/109927024/ABSTRACT?CRETRY=1&SRETRY=0>. Acesso em: 01/08/06.
- TOPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A. M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M. Oocyte–sperm interactions. *Animal Reproduction Science*, v. 60–61, p. 653–662, 2000.
- TRIANA, L. R.; BABCOCK, D. F.; LORTON, S. P. et al. Release of acrossomal hyaluronidase follows increased membrane permeability of calcium in the presumptive capacitation sequence for spermatozoa of the bovine and other mammalian species. *Biology of Reproduction*, v. 23, n. 1, p. 47-59, 1990.
- TROEDSSON, M. H. T.; CRABO, B. G.; IBRAHIM, N. M. et al. Mating-induced endometritis: mechanisms, clinical importance, and consequences. *Proceedings American Association of Equine Practitioners*, v 41, p. 11–12, 1995.
- TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; CRABO, B. G. Sperm transport and survival in the mare. *Theriogenology*, v. 49, n. 5, p. 905-915, 1998.
- TROEDSSON, M.H.T; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.S. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, v. 89, n. 1-4, p. 171–186, 2005.
- VALLE, G. R. Efeito da rufiação e manipulação do sistema genital e transporte de sêmen, em container “celle” modificado, na avaliação da técnica de inseminação artificial de eqüinos. 1997, 349f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária.
- VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M.; OLIVEIRA, H. N. et al. Efeito da idade sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado a 14° C e transportado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 28, n. 5, p. 1031-1036, 1999.
- VanBUITEN, A. WESTERS, P; COLENBRANDER, B. Male, female and management risk factors for non-return to service in Dutch mares. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 61, n.1, p.17–26, 2003.
- VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, v. 59, n. 1, p. 1-6, 1998.
- VOGE, J.L.; AAD, P.Y.; SANTIAGO, C.A.T. et al. Effect of insulin-like growth factors (IGFs), FSH, and leptin on IGF-binding-protein mRNA expression in bovine granulosa and theca cells: quantitative detection by real-time PCR. *Peptides*, v. 25, n. 12, p. 2195-2203. 2004.
- VonREITZENSTEIN, M.; CALLAHAN, M. A.; HANSEN, P. J. et al. Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin. *Theriogenology*, v. 58, n.5, p. 887-898, 2002.
- VOSS, J. L.; PICKETT, B. W.; BACK, D. G. et al. Effect of rectal palpation on pregnancy rate of non lactanting, normally cycling mares. *Journal of Animal Science*, v.41, n. 3, p. 829-834, 1975.

- VOSS, J. L.; WALLACE, R. A.; SQUIRES, E. L.; et al. Effects of synchronization and frequency of insemination on fertility. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 27, p. 257-261, 1979.
- XAVIER, I. L. G. S. *Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído, no corpo ou ápice do corno uterino, utilizando diferentes números de espermatozoides por dose inseminante*. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária.
- ZHIVKOVA, R. S.; DELIMITREVA, S. M.; TONCHEVA, D. I. et al. Analysis of human unfertilized oocytes and pronuclear zygotes - Correlation between chromosome/chromatin status and patient-related factors. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, In Press, Corrected Proof. Disponível, em: <<http://www.sciencedirect.com/science>> Acesso em: 05/11/ 2006.
- ZIVOTIKOV, H. I. The efficacy of mating and insemination of mares during or after ovulation. *Sovetsk. Zootech*, n. 1, p. 108-109, 1940. *Animal Breeding Abstract*, v. 9, n. 4, p. 303, 1941 (Abstract).
- WAELECHLI, R. O. Endometrial biopsy in mares under nonuniform breeding management conditions: prognostic value and relationship with age. *Canadian Veterinary Journal*, v. 31, n. 5, p. 379-384, 1990.
- WASSARMAN, P. M. Mammalian eggs, sperm and fertilization: dissimilar cells with a common goal. *Seminars in Developmental Biology*, v. 4, n. 3, p. 189-197, 1993.
- WASSARMAN, P. M.; EVELINE, L. J.; LITSCHER, S. et al. Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 115S, Suppl. 1, p. S57-S60, 2004.
- WATSON, E. D. Post-breeding endometritis in the mare. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p. 221-232, 2000.
- WEEMS, C. W.; WEEMS, Y. S.; RANDEL, R. D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Veterinary Journal*, v.171, n. 2, p.206-228, 2006.
- WESSON, J. A.; GINTHER, O. J. Influence of season and age on reproductive activity in pony mares on the basis of a slaughterhouse survey. *Journal of Animal Science*, v. 52, n. 1, p. 119-129, 1981.
- WIERSMA, A.; HIRSCH, B.; TSAFRIRI, A. et al. Phosphodiesterase 3 inhibitors suppress oocyte maturation and consequent pregnancy without affecting ovulation and cyclicity in rodents. *Journal of Clinical Investigation*, v. 102, n. 3, p. 532-537, 1998.
- WITHERSPOON, D. M.; TALBOT, R. B. Nocturnal ovulation in the equine animal. *Veterinary Record*, v. 87, n. 11, p. 302-304, 1970.
- WOODS, G. L.; BAKER, C. B.; BALDWIN, B. A. et al. Early pregnancy loss in brood mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl 35, p. 455-459, 1987.
- WOODS, J.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss in mares. *Equine Veterinary Journal*, v.22, n.6 p. 410-415, 1990.
- YUAN, Y. Q.; Van SOOM, A.; LEROY, J. L. M. R. et al. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine

embryonic developmental competence.
Theriogenology, v.63, n. 8, p. 2147-2163,
2005.

7. ANEXOS

7.1 - Figura 2: Ficha de controle individual

ÉGUA	FAZENDA	PROPRIETÁRIO
PARTO	SEXO	GARANHÃO
COBERTURAS		
DATA		
HORÁRIO		
CIO		
OVÁRIO DIREITO		
OVÁRIO ESQUERDO		

TOQUE DE GESTAÇÃO

DATA	ACHADOS

7.3 - Tabela 9: Comportamento sexual, características físicas e morfológicas do sêmen garanhão G1, na estação de monta 2004/2005 (Xavier, 2006).

Parâmetros	Média ± s
Tempo de reação (seg)	123,02 ± 71,43
Tempo para a monta (seg)	6,98 ± 2,61
Duração da ejaculação (seg)	25,64 ± 5,31
Número de montas por ejaculação	1,02 ± 0,15
Volume de sêmen sem gel (mL)	27,62 ± 9,24
Motilidade total (%)	47,39 ± 6,78
Vigor (0-5)	3,41 ± 0,45
Número total de espermatozóides/mL (X 10 ⁶)	301,09±109,48
Morfologia espermática	
Total de espermatozóides normais	72,25 ± 6,34
Anormais	
Cabeça	
Delgado na base	0,45 ± 0,79
Piriforme	0,47 ± 0,88
Delgada	0,61 ± 0,99
Contorno anormal	0,14 ± 0,35
Microcefalia	0,15 ± 0,65
Cabeça isolada	0,84 ± 0,68
Acrossoma	1,00 ± 1,22
Total de patologias de cabeça	4,20 ± 2,18
Peça intermediária	1,57 ± 1,30
Cauda	
Cauda dobrada	1,55 ± 1,11
Gota citoplasmática proximal	10,05 ± 4,08
Gota citoplasmática distal	10,07 ± 3,68
Total de espermatozóides anormais	27,55 ± 6,18

7.4 - Tabela 10: Características morfológicas do sêmen dos garanhões G1 e G2, na estação de monta 2005/2006.

Morfologia espermática	G1	G2
Início da estação de monta		
Total de espermatozóides normais	80%	72%
Anormais		
Cabeça		
Delgado na base	1%	--
Contorno anormal	1%	1%
Cabeça isolada	1%	--
Peça intermediária	5%	--
Cauda		
Cauda dobrada/enrolada	5%	19%
Gota citoplasmática proximal	3%	3%
Gota citoplasmática distal	4%	5%
Total de espermatozóides anormais	20%	28%
Final da estação de monta		
Total de espermatozóides normais	85%	90%
Anormais		
Cabeça		
Cabeça isolada	1%	3%
Cauda		
Cauda dobrada	6%	6%
Enrolada	4%	1%
Gota citoplasmática proximal	2%	--
Gota citoplasmática distal	2%	--
Total de espermatozóides anormais	15%	10%

8. APÊNDICE

Análise 8.1 – Resumo da análise de variância para o número de ciclos estrais por égua.

Análise de variância					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Total	83	22,32			
Modelo	3	1,69	0,57	2,20	0,09
Tratamento	1	0,058	0,057	0,22	0,64
Cavalo	1	1,18	1,18	4,59	0,03
Tratamento x Cavalo	1	0,63	0,63	2,46	0,12
Erro	80	20,62	0,26		
CV			38,42		
Média de Ciclo		1,32			
Dentro de tratamento					
				P	
	T 1	G1 x G2		0,668	
	T2	G1 x G2		0,015	
Dentro de ganhão					
				P	
	G1	T1 x T2		0,320	
	G2	T1 x T2		0,225	

T1: palpções realizadas a cada 24 horas; T2: palpções realizadas a cada 12 horas. G1: Dartanhan; G2: Hermes.

Análise 8.2 – Resumo da análise de variância para número de ciclos estrais por égua gestante.

Análise de variância					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Total	34	12,685			
Modelo	3	2,722	0,909	2,83	0,054
Tratamento	1	1,730	1,730	5,39	0,027
Cavalo	1	0,003	0,003	0,01	0,922
Tratamento x Cavalo	1	0,749	0,749	2,33	0,136
Erro	31	9,958	0,321		
CV			38,896		
Média de ciclo/égua gestante		1,457			
Dentro de tratamento					
				P	
	T 1	G1 x G2		0,582	
	T2	G1 x G2		0,09	
Dentro de ganhão					
				P	
	G1	T1 x T2		0,196	
	G2	T1 x T2		0,372	

Análise 8.3 – Resumo da análise de variância para número de ciclos estrais por égua vazia.

Análise de variância					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Total	48	8,531			
Modelo	3	0,225	0,075	0,41	0,749
Tratamento	1	0,104	0,104	0,56	0,456
Cavalo	1	0,163	0,163	0,88	0,353
Tratamento x Cavalo	1	0,104	0,104	0,56	0,456
Erro	45	8,305	0,184		
CV			35,085		
Média de ciclo/égua vazia			1,224		

Dentro de tratamento

		P
T 1	G1 x G2	0,877
T 2	G1 x G2	0,294

Dentro de gananhão

		P
G1	T1 x T2	1,000
G2	T1 x T2	0,394

T1: palpações realizadas a cada 24 horas; T2: palpações realizadas a cada 12 horas. G1: Dartanhan; G2: Hermes.

Análise 8.4 – Resumo da análise de variância para valor da idade dentro de todos os ciclos.

Análise de variância					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Total	83	402186,702			
Modelo	3	40444,146	13481,382	2,98	0,036
Tratamento	1	38593,627	38593,626	8,54	0,0045
Cavalo	1	1030,959	1030,959	0,23	0,6343
Tratamento x Cavalo	1	335,845	335,845	0,07	0,7859
Erro	80	361742,555	4521,782		
CV			53,464		
Idade Média			125,773		

Dentro de tratamento

		P
T 1	G1 x G2	0,056
T 2	G1 x G2	0,081

Dentro de gananhão

		P
G1	T1 x T2	0,496
G2	T1 x T2	0,903

T1: palpações realizadas a cada 24 horas; T2: palpações realizadas a cada 12 horas. G1: Dartanhan; G2: Hermes.

Análise 8.5 – Resumo da análise de variância para intervalo das duas últimas palpações.

Análise de variância					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Total	82	2867,196			
Modelo	3	2534,344	844,782	200,50	0,0001
Tratamento	1	2094,183	1,798	0,43	0,5154
Cavalo	1	1,798	2094,183	497,04	0,0001
Tratamento x Cavalo	1	2,008	2,008	0,48	0,4920
Erro	79	332,852	4,213		
CV			11,416		
Média do intervalo palpações			17,979		

Dentro de tratamento

		P
T 1	G1 x G2	0,018
T2	G1 x G2	0,080

Dentro de ganhão

		P
G1	T1 x T2	0,497
G2	T1 x T2	0,902

T1: palpações realizadas a cada 24 horas; T2: palpações realizadas a cada 12 horas. G1: Dartanhan; G2: Hermes.

Análise 8.6 – Resumo da análise de variância para o intervalo da última palpação à cobertura.

Análise de variância					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Total	82	38,368			
Modelo	3	1,678	0,559	1,20	0,313
Tratamento	1	0,655	0,655	1,41	0,238
Cavalo	1	0,370	0,370	0,80	0,374
Tratamento x Cavalo	1	0,678	0,678	1,46	0,230
Erro	79	36,689	0,464		
CV			60,01		
Média do intervalo da palpação a cobertura			1,135		

Dentro de tratamento

		P
T 1	G1 x G2	0,319
T2	G1 x G2	0,980

Dentro de ganhão

		P
G1	T1 x T2	0,0001
G2	T1 x T2	0,0001

Análise 8.7 – Resumo da análise de variância para eficiência de prenhez.

Análise de variância					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Total	83	1736,143			
Modelo	3	64,019	21,339	1,02	0,879
Tratamento	1	15,973	15,973	0,76	0,384
Cavalo	1	52,971	52,971	2,53	0,115
Tratamento x Cavalo	1	14,254	14,254	0,68	0,411
Erro	80	1672,123	20,901		
CV			120,77		
Média eficiência de prenhez			3,785		

Dentro de tratamento

			P
	T 1	G1 x G2	0,565
	T2	G1 x G2	0,110

Dentro de ganhão

			P
	G1	T1 x T2	0,965
	G2	T1 x T2	0,312

T1: palpções realizadas a cada 24 horas; T2: palpções realizadas a cada 12 horas. G1: Dartanhan; G2: Hermes.

Análise 8.8 – Resumo da análise de variância para o número de ciclos positivos considerando grupo de idade.

Análise de variância					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Total	83	20,416			
Modelo	2	0,973	0,486	2,03	0,138
Erro	81	19,443	0,24		
CV			34,584		

Análise 8.9 – Comparação entre as taxas de concepção por ciclo estral dos grupos, considerando o ganhão e o intervalo de palpação.

Frequência	P1G1	P2G1	P1G2	P2G2	Total
Positivo	9	13	7	6	35
Negativo	16	20	9	4	49
Total	25	33	16	10	84

Teste Estatístico	Valor	Grau de Liberdade	Probabilidade
Qui-quadrado	1,812	3	0,612

Análise 8.10 – Comparação entre a taxa de concepção considerando apenas intervalo de palpação.

Frequência	24 horas	12 horas	Total
Positivo	16	19	35
Negativo	25	24	49
Total	41	43	84

Teste Estatístico	Valor	Grau de Liberdade	Probabilidade
Qui-quadrado	0,230	1	0,631
Exato de Fisher	--	--	0,758

Análise 8.11 – Comparação entre taxa de concepção no primeiro ciclo estral, considerando-se o ganhão e o intervalo de palpação.

Análise 8.11 – Comparação entre taxa de concepção no primeiro ciclo estral, considerando-se o ganhão e o intervalo de palpação. Frequência	P1G1	P2G1	P1G2	P2G2	Total
Positivo	5	5	5	6	21
Negativo	12	15	7	4	38
Total	17	20	12	10	59

Teste Estatístico	Valor	Grau de Liberdade	Probabilidade
Qui-quadrado	3	4,054	0,256

Análise 8.12 – Comparação entre a taxa de concepção no primeiro ciclo estral, considerando-se apenas o intervalo de palpação.

Análise 8.12 – Comparação entre a taxa de concepção no primeiro ciclo estral, considerando-se apenas o intervalo de palpação. Frequência	24 horas	12 horas	Total
Positivo	10	11	21
Negativo	19	19	38
Total	29	30	59

Teste Estatístico	Valor	Grau de Liberdade	Probabilidade
Qui-quadrado	0,031	1	0,861
Exato de Fisher	--	--	0,672

Análise 8.13 – Comparação entre taxa de concepção no segundo ciclo estral, considerando-se o ganhão e o intervalo de palpação.

Freqüência	P1G1	P2G1	P1G2	P2G2	Total
Positivo	4	6	2	--	12
Negativo	4	5	2	--	11
Total	8	11	4	--	23

Teste Estatístico	Valor	Grau de Liberdade	Probabilidade
Qui-quadrado	2	0,048	0,977

Análise 8.14 – Comparação entre a taxa de concepção no primeiro ciclo estral, considerando-se apenas o intervalo de palpação.

Freqüência	24 horas	12 horas	Total
Positivo	6	6	12
Negativo	6	5	11
Total	12	11	23

Teste Estatístico	Valor	Grau de Liberdade	Probabilidade
Qui-quadrado	0,048	1	0,827
Exato de Fisher	--	--	0,737