



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

# **Patologia e Clínica de Equinos**

## **Reprodução no Cio do Poldro**

**Ana Maria Pinto** nº23745

Orientador externo: Dr<sup>a</sup> Marta Úson Olaso

Orientador: Dr<sup>a</sup> Susana Monteiro

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Área de especialização: *Patologia e Clínica de Equinos*

Relatório de Estágio

Évora, 2014



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

# **Patologia e Clínica de Equinos**

## **Reprodução no Cio do Poldro**

**Ana Maria Pinto** nº23745

Orientador externo: Dr<sup>a</sup> Marta Úson Olaso

Orientador: Dr<sup>a</sup> Susana Monteiro

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Área de especialização: *Patologia e Clínica de Equinos*

Relatório de Estágio

Évora, 2014

Todas as fotografias sem referência são de fonte própria.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de dedicar este espaço a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra me acompanharam ao longo de toda a jornada do curso de Medicina Veterinária que no final culminou na escrita da tese. Sem elas, nada disto teria sido possível e por isso um grande OBRIGADA.

Agradeço à Dra. Susana Monteiro pela disponibilidade em ser minha orientadora de estágio, por ter proporcionado todas as condições necessárias para a realização deste estágio e dos estágios extracurriculares e pela ajuda criativa e crítica na elaboração do presente relatório e pela amizade.

À Dra. Marta Úson Olaso, quase não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim ao longo deste estágio, e nos anos anteriores a possibilidade de a acompanhar nas horas livres do horário académico. Obrigado pelo seu apoio incansável, por tudo o que me ensinou, pela paciência e preocupação constantes, pela sua simpatia que proporcionava os dias muito mais alegres e pela paciência de responder a todas as dúvidas. Queria destacar um muito obrigado pela confiança que depositou em mim, pois fez-me crescer como médica veterinária, independentemente da pouca experiência com que comecei o estágio. Espero sinceramente não a ter desiludido. Muito obrigada.

A todos os professores e docentes que tive a oportunidade de conhecer desde o 1º ano do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Évora, que tiveram sem dúvida impacto positivo no decorrer do meu curso.

Agradeço a toda a minha família por todo o apoio que me deram ao longo de toda a grande jornada que foi tirar este curso. Um grande e especial obrigado à minha Mãe, por ter sempre confiado em mim, independentemente de eu repetir vezes sem conta “não vou conseguir”. Ao meu pai, que toda a minha vida me fez olhar para o campo e para os animais com outros olhos. À minha irmã pela capacidade de despertar alegria e “entropia” em todo o lado, e ao meu irmão a incansável alegria e gosto pelo mundo dos cavalos.

Um muito obrigado aos amigos de Évora, que tive o privilégio de acompanhar nos momentos alegres, divertidos e até nos mais secantes durante os 6 anos de curso, sem eles não seria possível. E um especial agradecimento aos verdadeiros grandes amigos que contei e sei que poderei contar sempre com eles: Vanessa, Beatriz, Fábio e Colaço.

Por fim, e não menos importante, um grande obrigado ao André, que tive o privilégio de conhecer já na etapa final do curso, mas mesmo assim, teve grande influência, obrigado por toda ajuda e apoio incansável.

## ***RESUMO***

O presente relatório é baseado no estágio curricular realizado entre 1 de Março e 31 de Julho de 2014, co-orientado pela Dra. Marta Úson Olasso, focando-se principalmente no tema “reprodução equina”. É composto por 3 partes: casuística, monografia e análise de dados sobre o tema “reprodução no cio do poldro”. A primeira parte descreve a casuística que se acompanhou durante o estágio, diversas técnicas e casos reprodutivos assim como casos clínicos de diversas áreas. A monografia aborda o tema da reprodução no cio do poldro. A última parte, consiste num estudo retrospectivo referente aos dados das éguas acompanhadas pela Dra. Marta de 2009 a 2014, sobre a taxa de fertilidade no cio do poldro e diversos fatores que demonstraram afetar positiva ou negativamente esta taxa.

Palavras-chave: equinos; clínica; reprodução; cio do poldro

## ***ABSTRACT***

### **Externship report - Breeding mares on foal heat**

The following document is the report of my externship that was realized from March 1st until July 31st, supervised by Dr<sup>a</sup> Marta Úlson Olaso and with “Equine Reproduction” as the main focus. It is composed by three parts: casuistics, monography and data analysis on the subject “Breeding mares on foal heat”. The first part of the document describes the casuistics that I observed during the externship, namely a diversity of reproduction cases and other different clinical cases. The monograph is focused on the breeding of mares on Foal Heat and the last part of the document is data analysis of Dr<sup>a</sup>. Marta Olaso clinical cases regarding this theme. The data comprises cases from 2009 until 2014 and relates fertility rate on foal heat with several external factor that were reported to influence this rate.

Key-words: equine; clinics; reproduction; foal heat

**ÍNDICE GERAL**

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>I - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>II- CASUÍSTICA</b> .....	<b>2</b>
<b>1- CONTROLO REPRODUTIVO / TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO</b>	
<b>ASSISTIDA</b> .....	<b>3</b>
1.1 Controlo folicular e exame ecográfico por via transretal .....	5
1.2 Colheita e processamento de sémen .....	10
1.3 Técnicas de inseminação artificial.....	15
1.4 Diagnóstico de gestação .....	17
1.5 Transferência de embrião .....	20
<b>2- CLÍNICA REPRODUTIVA</b> .....	<b>24</b>
2.1 Endometrites .....	24
2.2 Vulvoplastia.....	29
<b>3- MEDICINA PREVENTIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>4- IDENTIFICAÇÃO EQUINA</b> .....	<b>31</b>
<b>5- SISTEMA LOCOMOTOR</b> .....	<b>33</b>
<b>6- DENTISTERIA</b> .....	<b>38</b>
<b>7- LESÕES TRAUMÁTICAS</b> .....	<b>39</b>
<b>8- DERMATOLOGIA</b> .....	<b>43</b>
<b>9- OFTALMOLOGIA</b> .....	<b>44</b>
<b>III - REPRODUÇÃO NO CIO DO POLDRO</b> .....	<b>45</b>
1- INTRODUÇÃO .....	45
2- ANATOMIA E HISTOLOGIA DO ÚTERO DA ÉGUA .....	46

3. INVOLUÇÃO UTERINA .....	47
3.1 Alterações morfológicas durante a involução uterina .....	49
3.2 Controlo hormonal do cio do poldro e involução uterina.....	52
4. CARACTERISTICAS DO CIO DO POLDRO .....	53
4.1 Intervalo Parto - Cio do poldro.....	53
4.2 Sazonalidade / Anestro pós-parto .....	54
5. FERTILIDADE ASSOCIADA AO CIO DO POLDRO .....	55
5.1 Fatores que afetam a fertilidade do cio do poldro .....	56
6. TAXA DE FERTILIDADE PARA DIFERENTES TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO (monta natural vs inseminação artificial) E TIPO DE SÉMEN (refrigerado vs congelado).....	59
7. REABSORÇÃO EMBRIONÁRIA NO CIO DO POLDRO.....	60
8. TÉCNICAS PARA MELHORAR A TAXA DE FERTILIDADE DO CIO DO POLDRO .....	61
<b>IV - TAXA DE FERTILIDADE DO CIO DO POLDRO .....</b>	<b>65</b>
1. OBJETIVOS .....	65
2. MATERIAS E MÉTODOS .....	65
3. RESULTADOS .....	67
4. DISCUSSÃO .....	73
5. CONCLUSÃO.....	80
<b>V - BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>82</b>
<b>VI - ANEXOS.....</b>	<b>i</b>

## **ÍNDICE DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1:</b> Medição do tónus, contracção e diâmetro do corno uterino e acumulação do fluido no período pós-parto (Griffin e Ginther 1991).....	49
<b>Gráfico 2:</b> Percentagem de éguas que ovularam em cada dia pós-parto, do dia 7 ao 28 pós-parto. O número em cima de cada barra corresponde ao número total de éguas a ovularem nesse dia.....	68
<b>Gráfico 3:</b> Representa o intervalo parto-ovulação das éguas que entraram em inatividade ovárica após o parto (anestro pós-parto) e respetivo mês da ocorrência do parto. Cada barra corresponde a uma égua.....	68
<b>Gráfico 4:</b> Taxa de gestação e reabsorção embrionária no cio do poldro, 2ºcio pós-parto e população em geral. a,b,c representam conjuntos de dados estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do Post Hoc Test LSD com valor de $p < 0,05$ ; as letras a vermelho são referentes à reabsorção embrionária, e as letras a azul são referentes à taxa de gestação (depois dos 30 dias).....	69
<b>Gráfico 5:</b> Número de éguas gestantes ou não em relação ao dia da 1ºovulação pós-parto, em relação ao 1ºdiagnóstico de gestação (14 dias) .....	70
<b>Gráfico 6:</b> Taxa de gestação em relação ao dia da 1ºovulação pós-parto, em relação ao 1ºdiagnóstico de gestação (14 dias). a,b,c representam conjuntos de dados estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do Post Hoc Test LSD com valor de $p < 0,05$ .....	71
<b>Gráfico 7:</b> Taxa de gestação (diagnósticos de gestação aos 14 e 30 dias), relacionando o dia da ovulação com a idade. Éguas velhas mais de 10 anos, éguas novas menos igual a 10 anos. a,b representam conjuntos de dados estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do Post Hoc Test LSD com valor de $p < 0,05$ .....	72
<b>Gráfico 8:</b> Representa a relação do tipo de sémen (refrigerado ou congelado) com o dia da ovulação pós-parto e sucessiva taxa de gestação (diagnóstico de gestação aos 14 dias) .....	72
<b>Gráfico 9:</b> Número de éguas que sofreram reabsorção embrionária (Diagnóstico de gestação aos 30 dias) em relação ao dia da ovulação pós-parto. Os números nas barras gráficas significam o número de éguas que sofreram reabsorção embrionário em relação ao número de éguas gestantes aos 14 dias. a,b,c representam conjuntos de dados	

estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do Post Hoc Test LSD com valor de  $p < 0,05$  .....73

**ÍNDICE DE TABELAS**

**Tabela 1:** Número de casos acompanhados durante o estágio para cada área clínica, e respetiva representatividade em percentagem .....3

**Tabela 2:** Técnicas realizadas durante reprodução assistida equina e número de vezes que foram efetuadas durante o estágio .....4

**Tabela 3:** Procedimentos efetuados na área de medicina preventiva .....30

**Tabela 4:** Procedimentos efetuados na área de identificação Equina.....32

**Tabela 5:** Procedimentos efetuados relativos ao sistema locomotor .....34

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1:** Tronco de contenção.....2

**Figura 2:** Imagem ecográfica, sonda linear de 5 Mhz, onde se pode observar a presença de edema uterino patológico (grau 3+).....6

**Figura 3:** Imagem ecográfica de folículo com diâmetro de 43 mm .....7

**Figura 4:** Imagem ecográfica de folículo pré-ovulatório de 37 mm, com dupla parede ..7

**Figura 5:** Imagem ecográfica de folículo pré-ovulatório de 50 mm, com forma não esférica e parede folicular espessada .....8

**Figura 6:** Imagem ecográfica de Corpo Lúteo .....9

**Figura 7:** Imagem ecográfica de folículo hemorrágico anovulatório (FHA) .....9

**Figura 8:** Sudação consequente a administração de PGF2 $\alpha$  (Dinolytic®).....10

**Figura 9:** Vagina artificial modelo CSU (Brinsko *et al.* 2011).....10

**Figura 10:** Medição da temperatura da égua na vagina artificial .....11

**Figura 11:** Colheita de sémen com uso da vagina artificial em manequim.....12

**Figura 12:** Microscópio com placa de aquecimento.....13

**Figura 13:** Inseminação profunda com sémen congelado. Observação da palheta, e palheta de 0,5 mL a ser introduzida pelo estileto .....17

**Figura 14:** Imagem ecográfica de vesícula embrionária (13 mm) referente a uma gestação de 13 dias .....18

**Figura 15:** Imagem ecográfica de vesícula embrionária (22 mm) no corno uterino referente a uma gestação de 19 dias, início da perda da conformação esférica .....18

**Figura 16:** Imagem ecográfica de vesícula embrionária, aproximadamente no 30º dia de gestação .....18

**Figura 17:** Imagem ecográfica de dois folículos pré-ovulatórios, e medição do diâmetro do folículo de maior dimensão (38 mm) .....19

**Figura 18:** Colheita de embrião. Observação do cateter colocado e acoplado ao sistema de tubo em Y .....21

**Figura 19:** Filtro para deposição do embrião .....22

**Figura 20:** Deposição do líquido do filtro na placa de Petri, e uso de uma seringa com soro para empurrar todas as substâncias aderentes ao filtro .....22

**Figura 21:** Placa de Petri pequena para lavagem do embrião .....23

**Figura 22:** Pistolet de inovulação (Minitube 2014).....23

<b>Figura 23:</b> Zaragatoa uterina estéril com dupla proteção (Minitube 2014).....	25
<b>Figura 24:</b> Cateter <i>flushing</i> uterino (Minitube 2014) .....	26
<b>Figura 25:</b> União da porção dorsal dos lábios da vulva com agrafo .....	29
<b>Figura 26:</b> Vulvoplastia, início da sutura na comissura dorsal .....	29
<b>Figura 20:</b> Deposição do líquido do filtro na placa de Petri, e uso de uma seringa com soro para empurrar todas as substâncias aderentes ao filtro .....	22
<b>Figura 27:</b> Exame Ecográfico dos tendões flexores digitais do MAE, visualização da lesão no tendão flexor digital superficial, com vista transversal e longitudinal.....	35
<b>Figura 28:</b> Administração de PRP intratendinosa guiada por ecografia. Observação da zona hiperecogénica intralesional que corresponde à entrada da solução PRP.....	37
<b>Figura 29:</b> Égua Lusitana com trauma no chanfro. a) Ferida no chanfro; b) anestesia local com lidocaína; c) no final da sutura; d) evolução 1 semana depois .....	41
<b>Figura 30:</b> Égua com lesão no membro anterior direito; a) proliferação de tecido de granulação, b) ferida infectada com pús, c) ferida livre de infeção.....	42
<b>Figura 31:</b> Dermatofilose. Observação de crostas e “efeito pincel” .....	43
<b>Figura 32:</b> Corte transversal do corno uterino (Kainer 2011) .....	46
<b>Figura 33:</b> Imagem ecográfica do corno uterino não gravítico e do corno uterino não gravítico .....	50

**ÍNDICE DE ANEXOS**

**Anexo 1:** Desenvolvimento folicular e alterações hormonais durante o ciclo éstrico da égua.....i

**Anexo 2:** Diagrama representativo da embriologia da concepção e respetivas imagens ecografias em relação ao dia da gestação relativo à ovulação (Bergfelt e Adams 2011). ii

**Anexo 3:** Classificação do embrião de 1 a 4 segundo a sua qualidade e descrição (McCue 2011) e na última coloca imagens de blastocistos por grau de qualidade (Camargo *et al.* 2013)..... iii

**Anexo 4:** Fases de desenvolvimento do embrião e respetivas imagens..... iii

**Anexo 5:** Certificação de identificação equino (DGAV 2014).....iv

**Anexo 6:** Demonstração das zonas ecográficas da região do carpo e metacarpo (Ross 2011).....v

**Anexo 7:** Tabelas da estimativa da idade dos cavalos pela observação dos incisivos temporários e definitivos inferiores (Silva *et al.* 2003).....v

## **ABREVIATURAS**

AAEP - American Association of Equine Practitioners – Associação Americana dos Clínicos de Equinos

AB - Antibiótico

AH - Ácido Hialurónico

art. - Articulação

BID – bis in die – duas vezes ao dia

CL - Corpo lúteo

DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DIE - Documento de Identificação de Equídeos

DMSO - Dimetil Sulfóxido

EGF - Epidermal Growth Factor - Fator de crescimento epidermal

EPZ - Espermatozóides

FEI - Federação Equestre Internacional

FEP - Federação Equestre Portuguesa

FGF - Fibroblastic Growth Factor - Fator de crescimento fibroblástico

FHA - Folículos hemorrágicos anovulatórios

FPA - Folículos persistentes anovulatórios

FSH - Hormona folículo estimulante

GAGPS - Glicosaminoglicanas polisulfatadas

GnRH - Hormona de libertação de gonadotrofinas

hCG - Gonadotrofina coriônica humana

IA - Inseminação Artificial

IGF-1 - Insulin-like Growth Factor - fator de crescimento tipo insulina 1

IM - Intramuscular

IV - Intravenoso

LH - Hormona luteinizante

MAE - Membro anterior esquerdo

OCD - Osteocondrite dissecante

PDEGF - Platelet Derived Epidermal Growth Factor - Fator de crescimento epidermal derivado de plaquetas

PDGF - Platelet Derived Growth Factor - Fator de crescimento derivado das plaquetas

PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  - Prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

SID – semel in die – duas vezes ao dia

SNIRA - Sistema Nacional de Informação e Registo Animal

TE - Transferência de embriões

TFDS - Tendão flexor digital superficial

TGF- $\beta$  - Transforming Growth Factor beta - Fator de crescimento transformador-beta

TSA - Teste de sensibilidade a antibióticos

UI - Unidade Internacional

VEGF - Vascular Endotelial Growth Factor - Fator de crescimento vascular endotelial

## ***I – INTRODUÇÃO***

O presente relatório de estágio, no âmbito do mestrado integrado em medicina veterinária, da universidade de Évora, descreve as atividades desenvolvidas durante a época de reprodução equina de 2014, co-orientada pela Dra. Marta Usón, nas quais a estagiária baseou o estágio curricular.

Os equinos são reprodutores sazonais, de março a junho, tendo as éguas maior atividade ovárica durante dias longos, desta forma, para um melhor aproveitamento do estágio este foi realizado entre os meses de março e julho. O estágio teve a duração de 5 meses (de 1 de março a 31 de julho), foi realizado na Herdade da Pereira, com a esplêndida ajuda e orientação da Dra. Marta Olaso Usón. Durante este, tive a oportunidade de ver, aprender e praticar clínica e técnicas de reprodução assistida, bastante distintas, tomando contacto com inseminação artificial, transferência de embrião, colheita de sémen, etc., ou fatores que alteram o comportamento e atividade reprodutivos (sazonalidade, condição corporal, idade, nutrição, etc.) despertaram-me bastante atenção. Contudo o tema que me despertou mais interesse foi a taxa de gestação do cio do poldro. Durante o estágio tive oportunidade de ver inseminações no cio do poldro em éguas bastante distintas, e a ansiedade de alguns proprietários de voltar a reproduzir a sua égua o mais cedo possível, justificando-se com as altas temperaturas e condições das pastagens no Alentejo Central durante verão.

Com o presente trabalho procurou-se consolidar os conhecimentos teóricos e práticos obtidos ao longo do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária e ao longo do estágio curricular. O relatório de tese está dividido em três partes:

- A primeira parte - Casuística, consiste num relatório de estágio, no qual será destacado o que a estagiária realizou ao longo do período com a orientação da Dra. Marta Usón.
- A segunda parte - Revisão bibliográfica sobre o tema “reprodução do cio do poldro”.
- E por fim, a terceira parte - Estudo de caso sobre o tema “taxa de gestação do cio do poldro”, que será realizada com os registos gentilmente cedidos pela Dra. Marta Usón Olaso do ano corrente e anteriores. Sucessivamente os resultados serão debatidos em função da análise bibliográfica realizada anteriormente e por observações e aprendizagem durante o estágio curricular.

Este estágio proporcionou-me principalmente aquisição de competências práticas e autonomia nas técnicas de reprodução assistida e na área de clínica reprodutiva equina.

### **II - CASUÍSTICA**

O estágio curricular foi sobre reprodução equina, pelo que a maior incidência de casos foi nesta área. A estagiária teve a oportunidade de ver, aprender e praticar várias técnicas relativas à reprodução assistida em equinos e também de assistir ao trabalho diário do médico veterinário. Durante a época surgiram casos diversos que foram analisados e discutidos.

O estágio processou-se no centro de inseminação nas instalações da Herdade da Pereira, e por vezes no exterior em serviço veterinário ambulatório, em que nos deslocávamos até à propriedade do cliente. As éguas destinadas ao controlo reprodutivo, pela opção do proprietário, podiam ser acompanhadas na clínica ou nas suas próprias instalações. Nos casos de inseminação com sémen congelado, que é necessário um controlo mais exaustivo, e em casos de transferência de embrião, que são necessárias instalações convenientes à sua realização, as éguas eram sempre deslocadas à clínica. As instalações permitem o alojamento dos cavalos em boxes ou em *paddocks*, individuais ou em grupo. Para o controlo reprodutivo, as instalações estão apetrechadas

com um laboratório, uma sala de colheita de sémen e uma área de trabalho, nesta última encontra-se o tronco de contenção (figura 1), e perto deste os utensílios e equipamentos utilizados diariamente, tais como o ecógrafo, soluções de lavagem, apoio para a rabada, suporte de soro, recipiente para o lixo, caixa de luvas, etc.. O laboratório está equipado com



Figura 1 - Tronco de contenção.

equipamentos necessários para o controlo reprodutivo das éguas, inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE) e processamento de sémen do garanhão (refrigerado ou congelado). Existe ainda um picadeiro de muita utilidade para doenças de sistema locomotor.

Na tabela 1 estão descritos o número de casos e respetivas percentagens de cada área clínica acompanhadas ao longo do estágio. Desta forma, como previsto, observou-

se uma maior incidência na área de reprodução equina, na ao qual foram acompanhadas no total 83 éguas para controlo reprodutivo e 7 garanhões para colheita e processamento de sémen. As áreas clínicas que se seguiram com alguma frequência foram: identificação animal em 24 cavalos, medicina preventiva em 29 cavalos, dentisteria em 15 cavalos, sistema locomotor com 9 casos clínicos e lesões traumáticas também em 9 casos. Com muito menos frequência oftalmologia e dermatologia com 2 casos clínicos cada (tabela 1).

**Tabela 1 - Número de casos acompanhados durante o estágio para cada área clínica, e respetiva representatividade em percentagem.**

	Nº de casos	Percentagem (%)
clínica e técnicas de reprodução assistida	90	52,0
medicina preventiva	31	17,9
identificação animal	24	13,9
Dentisteria	15	8,7
lesões Traumáticos	9	5,2
Oftalmologia	2	1,2
Dermatologia	2	1,2
<b>TOTAL</b>	<b>173</b>	<b>100,0</b>

A casuística irá ser abordada por especialidades clínicas, apresentando as diversas técnicas realizadas e/ou casos clínicos assistidos durante o estágio em cada especialidade. Desta forma, em cada área será referido o número total de ocorrências da referida técnica, e caso tenha existido, o número de casos clínicos acompanhados.

## **1- CONTROLO REPRODUTIVO / TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

As técnicas praticadas na reprodução equina assistida engloba uma ampla variedade de técnicas, com a finalidade de obter o maior êxito na reprodução e adquirir a descendência pretendida. Hoje em dia, a aquisição e investigação de técnicas reprodutivas assistidas já se encontra bastante ampliada, pelo que é importante ter conhecimento de todas as técnicas praticadas na reprodução equina e compreende-las corretamente para serem bem executadas. Será descrito e apresentado, ao longo do presente relatório, todas as técnicas reprodutivas que foram realizadas durante o estágio. Na tabela 2 estão descritas as referidas técnicas e o número de vezes que cada uma foi efetuada.

O estágio incidiu principalmente na realização do exame ginecológico, este envolve o exame ecográfico do sistema reprodutor para controlo ecográfico do desenvolvimento folicular e avaliação uterina, para posteriormente proceder à IA. A afeção mais frequentemente detetada durante o exame ecográfico do sistema reprodutor foi a endometrite, pelo que os procedimentos realizados também com mais frequência foram a realização de zaragatoas uterinas para cultura microbiológica, lavagem uterina e aplicação tópica de medicação intrauterina.

Uma outra técnica reprodutiva, cada vez mais utilizada na prática da clínica reprodutiva equina, é a transferência de embrião, que se realizou com alguma frequência durante o estágio.

A estagiária também teve a oportunidade de aprender e praticar os procedimentos necessários à colheita de sémen. E, com menor destaque, adquiriu conhecimento sobre técnicas de processamento de sémen fresco, refrigerado e congelado.

Tabela 2 - Técnicas realizadas durante reprodução assistida equina e número de vezes que foram efetuadas durante o estágio.

Técnicas reprodutivas		Nº de procedimentos	
Técnicas abordadas nas éguas	exame ecográfico por via transretal do trato reprodutivo	1062	
	diagnóstico de gestação precoce	positivo	51
		negativo	45
	diagnóstico de gestação aos 30-14 dias	positivo	26
		negativo	3
	zaragatoa uterina		15
	lavagem uterina		14
	vulvoplastia	definitiva	1
		temporária	3
	aplicação tópica de medicação intrauterina	gentamicina	48
		DMSO	1
		lufenuron	2
	inseminação artificial	inseminação no corno uterino	74
		inseminação profunda	50
redução manual de embrião em gestação gemelar		2	
lavagem uterina para recolha de embrião		22	
transferência de embrião		12	
Técnicas abordadas em garanhões	colheita de sémen	20	
	pesquisa de <i>Theilorella equigenitalis</i>	4	
Técnicas de processamento de sémen	processamento de sémen para aplicação em fresco	4	
	refrigeração de sémen	2	
	congelamento de sémen	4	

### **1.1 Controlo folicular e exame ecográfico por via transretal**

O controlo das estruturas ováricas permitindo identificar a fase do ciclo ovárico em que a égua se encontra é fundamental para obter êxito na época reprodutiva, desta forma é muito importante conhecer o historial reprodutivo da égua e realizar exame reprodutivo completo. Este consiste no exame visual do trato reprodutor externo, e exame do trato reprodutivo interno, análise completa e pormenorizada das características da vagina, cérvix, útero e ovários. Durante o estágio, esta avaliação foi geralmente realizada através de palpação e ecografia por via transretal, podendo também recorrer-se à observação direta da vagina e cérvix com espéculo vaginal. A ecografia do trato reprodutor por via transretal foi a técnica de assistência reprodutiva com maior representatividade. Esta técnica é fundamental para análise do sistema reprodutivo interno, e principalmente para controlo folicular da égua e sucessivamente detetar a fase do ciclo em que se encontra.

No exame visual do trato reprodutor externo é importante observar a conformação da vulva, se há presença de trauma vulvar, principalmente em éguas recém-paridas, e se há presença de muco. Durante o cio, a vulva aumenta de volume, apresenta-se edemaciada, de cor avermelhada ou alaranjada, húmida e brilhante (Hafez e Hafez 2004b).

O exame da genitália interna e órgãos reprodutores baseia-se no exame ecográfico por via transretal para controlo folicular e deteção de patologias. Assim, é importante entender o ciclo éstrico da égua, juntamente com as alterações morfológicas do útero, ovários e cérvix que ocorrem devido às variações endócrinas, e são diferenciados por este exame. O ciclo éstrico da égua tem em média a duração de 21 dias (varia entre 19-25 dias), dividido em diestro (fase luteal) de 14 dias em média (varia entre 12 a 16 dias), e estro (fase folicular) de 7 dias (varia entre 5-9 dias) (Hafez e Hafez 2004b e Aurich 2011).

Para realização do exame ecográfico do trato reprodutor por via transretal, deve-se proceder a uma palpação transretal e retirar o material fecal do reto, facilitando a avaliação por ecografia do útero e ovários. A sonda ecográfica utilizada foi a sonda linear transretal com frequência de 5 Mhz. A sequência de avaliação de estruturas do trato reprodutivo no exame ecográfico é indiferente desde que não seja esquecido qualquer detalhe importante que possa ser fundamental nas decisões futuras de tratamento ou determinação do momento de IA ou monta natural.

A cérvix é avaliada por duas formas: por palpação transretal e por ecografia. O tónus cervical pode-se classificar de grau 1 a 3 por palpação transretal, grau 1 se cérvix firme e estreita (diestro ou gestante) e grau 3 se cérvix relaxada e sucessivamente maior diâmetro (estro). Por ecografia, se a égua estiver em estro a cérvix é hipocogénica e pode ser difícil de diferenciar das estruturas adjacentes, sendo visível uma única linha ecogénica, se em diestro ou em gestação são visualizadas linhas paralelas hiperecogénicas horizontais que correspondem aos limites musculares periféricos (Carnevale e Olsen 2011).

A vaginoscopia é excelente para visualizar a vagina e a cérvix, mais concretamente, a cor e aparência da mucosa vaginal; a aparência, cor e posição da cérvix e a presença ou não de corrimentos sanguíneos, mucopurulentos ou serosos (Zente e Steiner 2011). Anteriormente à introdução do espéculo limpa-se corretamente a vulva com água e solução iodada em espuma (Betadine®). Foi utilizado no estágio para uma égua com corrimento mucoso vaginal, que não apresentava qualquer fluido intrauterino, pelo que a aplicação do espéculo foi útil para averiguar se o muco vaginal provinha da cérvix.

No útero, as alterações endometriais são influenciadas pela fase do ciclo éstrico, sendo reguladas pelas hormonas esteroides ováricas, progesterona e estrogénio, que interagem com os recetores endometriais (Aurich 2011). A evolução do edema uterino pode ser utilizada como indicador da proximidade da ovulação. A imagem ecográfica do edema endometrial é caracterizada por um padrão heterogénico resultante do edema dentro das pregas endometriais (Aurich 2011). O edema uterino deve ser classificado quanto à sua intensidade, esta classificação varia entre autores. Durante o estágio foi usada a graduação



Figura 2 - Imagem ecográfica, sonda linear de 5 Mhz, onde se pode observar a presença de edema uterino patológico (grau 3+).

de 1 a 3, em que grau 1 corresponde a ausência de edema, e grau 3 a edema uterino elevado (Carnevale e Olsen 2011). Quando o edema era pronunciado, indicativo de patologia associada, era classificado como grau 3+ (figura 2). O edema pronuncia-se durante o início do estro (aumento do estrogénio e diminuição de progesterona) e diminui ou desaparece 24 horas antes da ovulação (diminuição de estrogénio e aumento

de progesterona) (Carnevale e Olsen 2011) (Anexo 1). Durante a fase luteal (diestro) a ecogenicidade do útero é homogênea e nenhum edema está presente (Aurich 2011).

O exame ecográfico dos ovários é útil e avalia em tempo real estruturas foliculares e luteínicas. Os ovários da égua têm a forma de rins com proeminente depressão, a fossa de ovulação, e bordo côncavo ventral. Ecograficamente, os folículos são estruturas circulares preenchidas de líquido anecogénico dentro do estroma ovárico (Carnevale e Olsen 2011). Para controlo folicular é importante o conhecimento das 3 fases de desenvolvimento folicular (Beg e Bergfelt 2011):

- I – Fase de crescimento comum, crescimento comum dos folículos (aumento de estrogénio e diminuição de progesterona);

- II – Fase dominante, estabelecimento de dominância de um ou dois folículos, quando atingem em média 22 mm, migram para o local de ovulação (fossa de ovulação), aproximadamente no dia 15 do ciclo éstrico, e os outros cessam o crescimento e regridem (Jacob *et al.* 2009);

- III – Fase pré-ovulatória, o folículo dominante atinge o máximo do seu tamanho e sofre alterações morfológicas e fisiológicas de preparação à ovulação.

Após identificação da fase folicular e sabendo que à partida o folículo cresce em média 3 mm/dia, podendo atingir tamanhos até 55 mm ou mais (figura 3), muito variável entre éguas e mesmo entre ciclos (Ginther 2008). A avaliação morfológica do folículo, incluindo tamanho e forma, e o grau de edema uterino devem ser avaliados para determinar o momento em que acontece a ovulação e sucessivamente a altura ideal de inseminação. No anexo 1 está representado esquematicamente o desenvolvimento folicular do ciclo éstrico associado ao dia após a ovulação, ao tamanho folicular e às variações da concentração hormonal na circulação periférica.

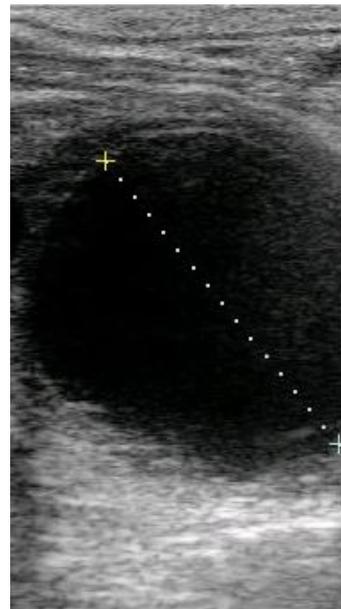


Figura 3 - Imagem ecográfica de folículo com diâmetro de 43 mm.



Figura 4 - Imagem ecográfica de folículo pré-ovulatório de 37 mm, com dupla parede.

Quando se realiza IA com sémen congelado é importante determinar o momento da ovulação. Um a três dias antes da ovulação o folículo pré-ovulatório sofre aumento progressivo da espessura da parede folicular, devido à expansão da camada celular da granulosa, e observa-se uma proeminente banda anecogénica na área da camada da teca (expondo-se com uma “dupla parede” - figura 4), devido ao aumento do fluxo sanguíneo, o qual diminui 4 horas antes da ovulação (Gastal *et al.* 2006, Aurich 2011 e Carnevale e Olsen 2011). Além da alteração da parede folicular, o folículo pré-ovulatório fica macio e sensível à palpação, e altera a forma de esférico para não esférica (24 a 12 horas antes da ovulação) (figura 5).

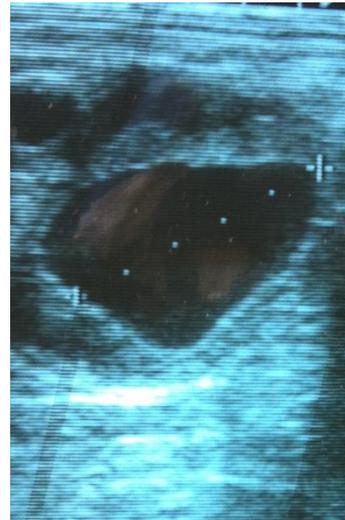


Figura 5 – Imagem ecográfica de folículo pré-ovulatório de 50 mm, com forma não esférica e parede folicular espessada.

A indução da ovulação em éguas, hoje em dia, é uma técnica bastante comum no manejo reprodutivo. Durante o acompanhamento reprodutivo a aplicação de agentes indutores da ovulação tem inúmeros benefícios e foram fundamentais: para agendar a ida ao garanhão quando monta natural e assim reduzir o número de cobrições por ciclo; para agendar o transporte de sémen refrigerado na inseminação artificial, sobretudo quando este é adquirido no estrangeiro (custos no transporte) ou o garanhão tem baixa fertilidade; e para agendar a inseminação artificial com sémen congelado em que o conhecimento do momento da ovulação é fundamental.

Para induzir a ovulação utilizou-se um agonista da hormona libertadora de gonadotropina (GnRH) (Deslorelin acetato® 17,5 mg/10mL, 0,5 mL IM) ou Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) (Pregnil® 5000UI/mL, 0,5 mL IV). O mecanismo de ação da Deslorelin é estimular as células gonadotrópicas da glândula pituitária a secretar hormona luteínica (LH), que subsequentemente liga-se aos recetores de LH do ovário e induzem a maturação folicular e ovulação. Já a hCG atua diretamente nos recetores de LH das células da teca e granulosa do folículo ovárico (Ferris *et al.* 2012).

Ambos foram administrados quando o folículo tinha mais de 35 mm de diâmetro e havia presença de edema uterino. A escolha do agente indutor foi baseada na idade da égua, no tipo de sémen a utilizar (congelado ou refrigerado), no custo, e no sucesso e número de administrações anteriores na égua. A hCG induz a ovulação 24-48 horas

após o tratamento (variando entre 12-72 horas), já a maior parte das éguas tratadas com Deslorelin ovulam em 36-42 horas (Samper 2001). A principal desvantagem do hCG em relação a Deslorelin é que quando a hCG é administrada várias vezes durante a mesma época reprodutiva a taxa de indução da ovulação pode diminuir devido à produção de anticorpos anti-hCG, pela mesma razão éguas com mais de 20 anos ou induzidas em dois ciclos subsequentes têm reduzida eficácia na resposta à hCG. Por outro lado, a indução com Deslorelin pode ser repetida sem diminuição da sua eficácia (Siddiqui *et al.* 2009 referido por Gomes *et al.* 2014, Ferris *et al.* 2012 e Gomes *et al.* 2014).

A ovulação é visualizada por ecografia com o desaparecimento do folículo e aparecimento de uma área hiperecogénica (figura 6), e formação do corpo lúteo (CL). Imediatamente depois da ovulação, a palpação do ovário normalmente continua sensível (Carnevale e Olsen 2011). Como o folículo pré-ovulatório rutura numa região específica do ovário, na fossa de ovulação, o CL não pode ser detetado por palpação, mas pode ser visualizado por ecografia, tem forma bem delimitada e moderada ecogenicidade devido às suas estruturas densas formadas por células luteais, secretoras de progesterona, que derivam exclusivamente das células da granulosa do folículo pré-ovulatório (Aurich 2011 e Carnevale e Olsen 2011).

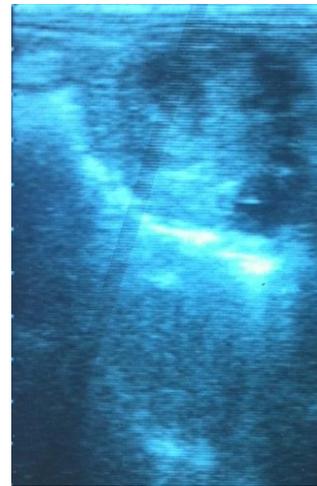


Figura 6 - Imagem ecográfica de Corpo Lúteo.

Durante o estágio observou-se folículos anovulatórios. A bibliografia afirma que a incidência de falha de ovulação é entre 3,1 e 8,2%, e existem dois tipos de folículos anovulatórios: folículo persistente anovulatório (FPA) e folículo hemorrágico anovulatório (FHA). No FPA não há luteinização, permanecem durante várias semanas e eventualmente acabam por regredir espontaneamente (McCue e Ferris 2011). Nos FHA a falha da ovulação é proveniente de uma hemorragia no antro do folículo pré-ovulatório, ocorre a luteinização da parede folicular e do conteúdo. Por exame ecográfico modo-B dos ovários é impossível diferenciar um folículo pré-ovulatório que irá



Figura 7 - Imagem ecográfica de folículo hemorrágico anovulatório (FHA).

ovular de um futuro FHA um dia antes da suposta ovulação. Só no dia da suposta ovulação é que se observa uma imagem de pontos hiperecogénicos flutuantes no interior do antro folicular e ausência da ovulação. Nos dias seguintes há aumento da ecogenicidade do conteúdo e aumento da espessura da parede, e atinge diâmetro bastante superior ao anterior folículo pré-ovulatório (figura 7). Ginther (2007) afirma só ser possível distinguir os dois folículos, dias antes da ovulação, através da técnica ecográfica Doppler, pois o FHA à partida terá maior vascularização na parede folicular.

No final do diestro, ocorre a luteólise, devido à ação da prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), o CL regride e normalmente está associado ao crescimento de novos folículos.

Na tentativa de iniciar um novo cio mais rapidamente, procedia-se à administração de dinoprost trometamina 1 mL IM (Dinolytic® 5mg/mL), análogo da  $PGF_{2\alpha}$ , e promove lise do CL maduro, permitindo assim, que a égua retorne em cio 3 a 4 dias depois do tratamento, e a ovulação ocorra em 8 a 10 dias, diminuindo o intervalo interovulação (Staempfli 2011). Só administramos  $PGF_{2\alpha}$  5 dias depois da ovulação. Contudo novos estudos afirmam que o desenvolvimento precoce do CL, menos de 5 dias depois da ovulação, é suscetível à  $PGF_{2\alpha}$  exógena. Bergfelt *et al.* (2006) estudaram o efeito da administração de  $PGF_{2\alpha}$  (lutalyse 10mg/éguas IM) 3 dias depois da ovulação e demonstraram regressão estrutural e funcional do CL e diminuição do intervalo inter-éstrico. Algumas éguas apresentam efeitos adversos após a administração de  $PGF_{2\alpha}$  exógena, nomeadamente: sudação, diarreias e desconforto abdominal (Staempfli 2011) (figura 8).



Figura 8 - Sudação consequente a administração de  $PGF_{2\alpha}$  (Dinolytic®)

## 1.2 Colheita e processamento de sémen

A colheita de sémen durante o estágio foi realizada com uma vagina artificial fechada e auxílio de um manequim. A vagina artificial é um dispositivo através do qual se tentam recriar as condições de pressão e temperatura da vagina da égua de forma a estimular o garanhão a ejacular. Existem vários tipos, a utilizada foi o Modelo CSU de vagina artificial (figura 9), versão modificada do modelo de Colorado. O Modelo CSU é mais leve que o modelo



Figura 9 - Vagina artificial modelo CSU (Brinsko *et al.*)

Colorado e tem uma rígida pega para facilitar a sua manipulação. Tem as vantagens do modelo de Colorado, ou seja, composto por revestimento de borracha entre a câmara de água e o lúmen da vagina artificial, diminuindo, assim, a probabilidade de contaminar o sêmen com água, e proporciona boa retenção de calor (Brinsko *et al.* 2011).

Para a preparação da vagina artificial coloca-se o recipiente coletor para a receção do sêmen fora do lúmen da vagina artificial e para proteger o sêmen da luz o recipiente coletor era envolvido por uma proteção. Era colocado um filtro no depósito do sêmen, permitindo a separação da sujidade e da fração gelatinosa da fração rica em EPZ (fração não gelatinosa), uma vez que a primeira fração apresenta efeitos nocivos às células espermáticas (Bortot 2013). Se esta separação for realizada depois da colheita há maiores perdas de sêmen. O filtro deve ser removido imediatamente depois da colheita

de sêmen para prevenir infiltração do gel para a porção não gelatinosa (Brinsko *et al.* 2011). Imediatamente antes da colheita de sêmen, a câmara de água era cheia à temperatura de 45°-50°C, para esta se encontrar entre 44°-48° no momento da colheita (figura 10). A temperatura da água acima da temperatura corporal ajuda a estimulação peniana e facilita a ejaculação. A pressão da vagina artificial era ajustada, com o punho da mão fechado e



Figura 10 - Medição da temperatura da água na vagina artificial.

braço, para promover boa uniformidade de contato à volta do pénis do garanhão, sem interferir com a penetração peniana. A temperatura e pressão da água devem manter-se relativamente constantes entre colheitas para promover o desempenho consistente do cavalo e máxima eficácia da colheita (Brinsko *et al.* 2011). No final, era colocado gel lubrificante estéril não espermicida nos bordos da vagina artificial.

A utilização de manequim para realizar a colheita é uma técnica mais segura para o garanhão, para a égua e para o médico veterinário do que quando o garanhão monta a égua. Os elementos desejáveis de um manequim são: altura ajustável, largura suficiente para permitir o garanhão envolve-lo firmemente com os membros anteriores, com revestimento adequado, não abrasivo e fácil de limpar, suporte vertical colocado no centro para evitar danos nos membros posteriores do garanhão durante a colheita e instalado numa área livre de obstáculos, com espaço para a égua estar perto do manequim (Brinsko *et al.* 2011).

Na sala de colheita de sémen, quando o garanhão já se encontra excitado, e imediatamente antes de montar o manequim, o pénis do cavalo era limpo com algodão embebido em água morna, posteriormente deve-se secar.

Para o uso do manequim é necessário treinar o garanhão sem ou com pouca experiência neste procedimento. Desta forma, para estimular o comportamento de monta no garanhão novato usa-se uma égua em cio e esta é colocada perto do manequim. Por vezes, o garanhão novato permanece relutante em montar o tronco. Nestas situações, o garanhão é posicionado atrás do tronco e coloca-se a vagina artificial no pénis, isto normalmente faz com que o garanhão se empurre para a frente, baixe os membros posteriores, elevando-o para o manequim. Depois de uma ou duas colheitas obtidas desta forma, não é mais necessário repetir esse procedimento para incentivar a monta. Depois de treinado, alguns garanhões não necessitam da presença de égua em cio para montar no manequim (figura 11).



Figura 11 - Colheita de sémen com uso da vagina artificial em manequim.

Imediatamente depois da colheita retirava-se a água da vagina artificial e o sémen era levado para o laboratório para minimização exposição à luz e choque térmico quer pelo frio quer por excesso de calor.

Sieme *et al.* (2004b) indicam que colheita dupla (com 1 hora de intervalo) em dias alternados tem bons resultados ou melhores do que colheitas duplas diárias. O primeiro ejaculado da dupla colheita demonstra melhor qualidade espermática antes e depois de refrigerar ou congelar. Múltiplas colheitas aumentam a secreção de plasma seminal e resultam na diminuição da concentração espermática e longevidade do sémen (Sieme *et al.* 2004b).

No laboratório, era determinado o volume e coloração da fração não gelatinosa. No garanhão, a coloração normal é branca acinzentada e qualquer alteração nesta pode indicar processo patológico ou simplesmente contaminação com urina e/ou sujidades. O volume do ejaculado é muito variável com a idade, época do ano, raça, técnica de colheita de sémen, entre outros fatores. A maioria dos garanhões ejacula entre 25 e 80 mL de fração rica em espermatozoides (Bortot 2013).

A morfologia e motilidade espermática eram avaliadas com auxílio do microscópio ótico e placa de aquecimento (figura 12), para tal, uma gota de sémen era colocada entre a lâmina e a lamela. De seguida, procedia-se de imediato a uma diluição com INRA 96 inicial apropriada (1:1 a 1:2) para maximizar a longevidade dos EPZs, e voltava-se a analisar ao microscópio. A motilidade total e a motilidade progressiva dos EPZ eram avaliadas em



Figura 12 - Microscópio com placa de aquecimento.

escala percentual (0 a 100%), na maioria dos ganhões varia de 40 a 80% e 35 a 75%, respetivamente. Para medições da concentração espermática do sémen diluído era utilizado o espectrofotómetro, podendo esta variar de 50 a 400 milhões de EPZ/mL para a maioria dos ganhões.

Os diluidores de sémen melhoram a sobrevivência de EPZ durante o intervalo entre a colheita e a inseminação. Têm como vantagens o tratamento antibiótico, a diminuição da contaminação bacteriana, a diluição de fatores tóxicos presentes no plasma seminal, a melhora da fertilidade do sémen devido ao aporte de nutrientes contidos no diluidor e a maior flexibilidade de IA (Bortot 2013). Os diluidores utilizados são constituídos por água, tampões e substâncias não iónicas, açúcares e diferentes tipos de macromoléculas e antibióticos. Os AB nos diluidores ajudam a eliminar bactérias, que invariavelmente contaminam a amostra de sémen durante a colheita. O pH do diluidor deve ter 6,6 a 7,2 para otimizar a motilidade espermática enquanto evita a capacitação prematura dos EPZs, particularmente durante a fase de armazenamento (Brinsko *et al.* 2011). Os diluidores podem ser divididos em quatro grupos, à base de salinos, de gema de ovo, de leite e derivados e os que apresentam albumina sérica bovina. O diluidor mais comumente usado em equinos é à base de leite. Durante o estágio, o diluidor mais utilizado foi o INRA 96, diluidor à base de leite, que contém proteínas com alta efetividade na proteção de células espermáticas, e contém AB; penicilina 27 mg/L e gentamicina 76 mg/L, e antifúngicos; anfotericina.

De seguida, o processamento e armazenamento do sémen dependeram do tipo de sémen que se pretendia, fresco, refrigerado ou congelado.

No sémen fresco a dose de inseminação recomendada para alcançar taxa de gestação satisfatória é  $250-500 \times 10^6$  EPZ de motilidade progressiva, e o intervalo colheita-inseminação não deve exceder duas horas (Brinsko 2006 e Bortot 2013).

No sémen refrigerado, é comum utilizar-se uma dose igual à do sémen fresco,  $500 \times 10^6$  EPZ com motilidade progressiva, com concentração final de  $25-50 \times 10^6$  EPZ/mL, normalmente a diluição é pelo menos 1:3. O sémen deve ser armazenado a 4-6°C. Quando as condições não são ideais, por exemplo, subfertilidade do garanhão ou égua, ou maneo inadequado, é recomendado concentrações espermáticas mais elevadas ou diluições mais baixas para aumentar o número de SPZ por dose (Brinsko 2006). O armazenamento do sémen refrigerado mais utilizado e também aplicado durante o estágio foi por sistema de refrigeração passivo através do uso de caixas isotérmicas com fonte de frio. Estas devem ter isolamento completo do ambiente, baixo custo, manutenção da temperatura para o período proposto e realizar curva de refrigeração lenta. A redução da temperatura do sémen auxilia na sua conservação por diminuição do crescimento bacteriano, redução do metabolismo espermático e consequente controlo da acidificação do diluidor. Nestas condições, o sémen deve manter as suas capacidades de fecundação num período de 48 horas (Bortot 2013).

O processo de congelação e descongelação de sémen expõem os EPZ a lesões que são principalmente manifestadas pela redução dramática da motilidade. A inseminação com sémen congelado contém usualmente menor número de EPZ progressivos do que o recomendado pelo fresco e refrigerado. A dose de inseminação varia consideravelmente entre  $800 \times 10^6$  a  $1 \times 10^9$  EPZ totais exibindo pelo menos 30% de motilidade, tendo assim as doses entre 240 a  $600 \times 10^6$  EPZ com motilidade progressiva. As palhetas de 0,5 mL são as mais utilizadas, o número de EPZ por palheta bem como o número recomendado de palhetas por inseminação vai depender do laboratório (Brinsko 2006). O diluidor utilizado é diferente, terá de proteger a integridade da membrana tanto no processo de congelamento como no de descongelamento. Após a congelação com sucesso, pode ser armazenado por anos, ficando conservado em temperaturas de  $-196^\circ\text{C}$  em tanques de azoto líquido (Bortot 2013).

### 1.3 Técnicas de inseminação artificial

Foram utilizadas duas técnicas de inseminação: inseminação convencional (no corpo uterino) e inseminação profunda (no corno uterino).

A inseminação no corpo uterino procedeu-se em éguas inseminadas com sémen fresco ou refrigerado. Durante o estágio utilizou-se em mais ocasiões IA com sémen refrigerado comparativamente com o sémen fresco. O sémen refrigerado tinha de ser encomendado pelo menos 1 a 2 dias antes da data prevista para inseminação. Na data combinada o médico veterinário responsável pelo ganhanho procedia à colheita de sémen e este era enviada para a Dra. Marta, no próprio dia. Desta forma, antes da inseminação era realizado o exame reprodutivo completo e controlo do ciclo éstrico a todas as éguas.

O esquema base para inseminação com sémen refrigerado era o seguinte: induzia-se a ovulação quando o folículo tinha diâmetro superior a 35 mm (folículo maduro), procedia-se à IA com sémen refrigerado aproximadamente 24 horas após a indução da ovulação. Decorridas mais 24 horas, procedia-se à confirmação da ovulação. Cumpria-se este procedimento por se considerar o momento mais propício ao sucesso da fecundação pois os agentes indutores em média induzem a ovulação em 36 horas, e o sémen refrigerado de boa qualidade começa a perder propriedades ao fim de 24 horas (embora estejam descritas gestações resultantes de sémen refrigerado armazenado durante 3-4 dias (Conboy 2011)). Se as éguas não ovulavam 24 horas após a inseminação eram novamente inseminadas, se possível, contudo esperava-se até as 48 horas se o sémen refrigerado fosse de óptima qualidade.

Para inseminação convencional, no corpo uterino, a égua era preparada segundo um protocolo de assepsia. A rabadia era segura e envolvida com uma ligadura, impedindo a conspurcação desta na zona perineal, depois procedia-se à limpeza da vulva e áreas adjacentes da zona perineal com água morna e Betadine® em espuma, no final secava-se a zona com papel. Para a inseminação é necessário uma luva de palpação e pipeta de inseminação estéril presa entre o polegar e o dedo indicador. Coloca-se nos nós dos dedos uma pequena quantidade de lubrificante estéril, não espermicida, e os dedos são posicionados em cone para proteger a ponta da pipeta e permitir a entrada suave sem traumatizar a vagina. Com os dedos identificava-se a cérvix, que devia estar flácido no estro, passava-se a pipeta gentilmente pelo cérvix até ao corpo uterino e o sémen era depositado a 3 a 5 cm cranialmente à cérvix.

A inseminação profunda procedeu-se principalmente em éguas inseminadas com sémen congelado, mas também com sémen refrigerado quando o volume da dose de sémen enviado era pequena, ou a égua já tinha ovulado recentemente.

Para obter uma taxa satisfatória de sucesso com sémen congelado, a qualidade do sémen, a fertilidade da égua e garanhão, e o controlo do ciclo éstrico tem grande impacto. O tempo da inseminação com sémen congelado é crítico, não pode ser muito cedo porque os espermatozoides (EPZ) morrem antes da ovulação, e não muito tarde pois o oócito perde capacidade de fertilização (Newcombe *et al.* 2011). A necessidade de inseminar perto da ovulação está relacionada com os danos nos EPZs que reduzem a sua sobrevivência no oviduto (Conboy 2011), mantendo a sua viabilidade por menos tempo. Desta forma, inseminar perto da ovulação aumenta a taxa de gestação. Está estipulada que a inseminação com sémen congelado deve ser realizada entre o período que decorre desde 12 horas antes até 6 horas depois da ovulação.

Durante o estágio as éguas que se destinavam a ser inseminadas com sémen congelado, quando atingiam folículos maduros eram induzidas no final do dia, devido ao tempo de atuação dos agentes indutores (36-42 horas, como referido anteriormente) haveria, assim, maior probabilidade de ovularem durante a parte do dia. Após a indução da ovulação passavam a ser monitorizadas regularmente com 4 a 6 horas de intervalo, quando se detetava ovulação procedia-se há inseminação pós-ovulação. A inseminação pré-ovulação era executada quando se suspeitava de breve ovulação e impossibilidade de examinar a égua nas horas seguintes (por exemplo durante a noite). A égua era examinada cerca de 8 horas depois para verificação da ovulação, caso não tenha ovulado continuava a ser controlada regularmente. Barbacini *et al.* (1999) estudaram a taxa de reabsorção embrionária em éguas inseminadas pós e pré-ovulação com sémen congelado (com pelo menos 30% de motilidade progressiva,  $250 \times 10^6$  EPZ com motilidade progressiva) e concluíram não haver diferença significativa na taxa de gestação e reabsorção embrionária quando inseminadas 6 horas antes ou 6 horas depois da ovulação.

Num estudo recente de 2011, Newcombe *et al.* estudaram a taxa de gestação com sémen congelado num programa de inseminação pós-ovulação e administração rotineira de antibiótico intrauterino e oxitocina, 8 horas pós-inseminação. Obtiveram resultados semelhantes independentemente da hora da inseminação pós-ovulação (43,2% se inseminação menos de 3 horas pós-ovulação, 44,7% se inseminação entre 3 e

6 horas após ovulação, 45,1% se 6 a 9h, 55,8% se 9 a 12h e 54,9% se 12 a 15h), assim concluíram que se realizar exames de 12 em 12 horas a taxa de gestação é igual ao regime de examinação mais frequente.

Na técnica de inseminação profunda com sémen congelado foi utilizado pipeta flexível, estilete e as palhetas de 0,5 mL contendo sémen congelado. Os cuidados iniciais de higiene são semelhantes aos



Figura 13 - Inseminação profunda com sémen congelado. Observação da palheta, e palheta de 0,5 ml a ser introduzida pelo estilete.

anteriores. Coloca-se a pipeta flexível, por manipulação transretal, até à ponta do corno uterino ipsilateral à ovulação. De seguida, introduzem-se as palhetas uma a uma dentro da pipeta e o sémen é empurrado com o estilete (figura 13).

#### 1.4 Diagnóstico de Gestação

O 1º diagnóstico de gestação após inseminação era realizado 12 a 14 dias depois da ovulação. Este exame reprodutivo consistia na confirmação ou não da gestação, e em que se identificava gestação era gemelar ou se apresentava indícios de retorno ao cio, o que obrigava a procedimentos imediatos. Se positivo, voltava-se a realizar o diagnóstico de gestação no 30º a 45º dia de gestação. Este exame é fundamental porque a incidência de reabsorção embrionária (entre 14ª a 40ª dia de gestação) varia entre 5 a 15% (Vanderwall 2011).

O diagnóstico de gestação era sempre realizado por exame ecográfico por via transretal, assim, é importante adquirir conhecimento básico do desenvolvimento normal da vesícula embrionária, para deteção de anormalidades e caso necessário a previsão da duração da gestação (Anexo 2). Durante o diagnóstico precoce de gestação (12º a 14º dia de gestação) a vesícula embrionária está na fase de mobilidade intrauterina, o que obriga a exploração completa e minuciosa do útero, prevenindo os falsos-negativos. Nesta altura, a vesícula embrionária no equino é esférica e preenchida por líquido, o que produz uma imagem ecográfica esférica anecogénica, com artefactos hiperecogénicos na face dorsal e ventral do saco vitelino (ecos especulares) (Bergfelt e Adams 2011) (figura 14). Para minimizar falsos-positivos, teve-se maior atenção nas éguas com quistos uterinos. Em caso de dúvida, a vesícula embrionária pode ser

distinguível destes pela mobilidade e crescimento da concepção. No dia 15 e 16 há aumento da vesícula embrionária e do tónus uterino, e no dia 17 a 19 há início da perda da conformação esférica (figura 15). No dia 20, o embrião é observado como uma pequena estrutura ecogénica na face ventral do saco vitelino. Nos dias 24 a 36 o saco alantoide expande-se e o saco vitelino regride, elevando o embrião e saco amniótico da fase ventral da vesícula. A oposição das paredes da membrana do saco vitelino e membrana do saco alantoide, ecograficamente, aparecem como uma linha ecogénica em ambos os lados do embrião (figura 16), nesta altura deve-se detetar os batimentos cardíacos. No dia 40 a membrana do saco alantoide engloba o vestígio do saco vitelino, e a convergência da aposição das paredes do alantoide e sua fusão em volta do úraco, vasos sanguíneos e saco vitelino resultam na formação do cordão umbilical (dia 45), e há descida do feto e saco amniótico (Bergfelt e Adams 2011).

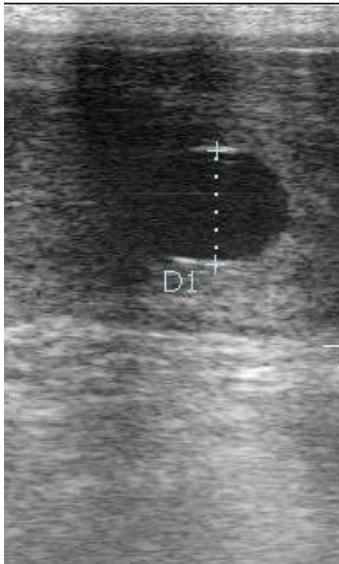


Figura 14- Imagem ecográfica de vesícula embrionária (13 mm) referente a uma gestação de 13 dias.

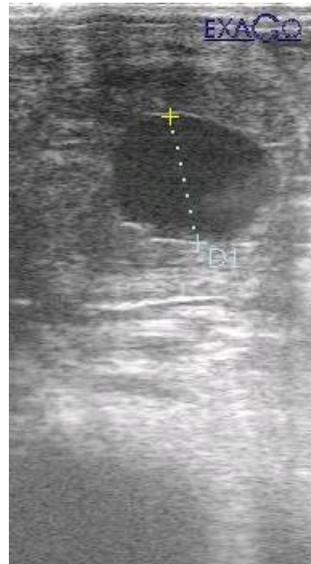


Figura 15- Imagem ecográfica de vesícula embrionária (22 mm) no corno uterino referente a uma gestação de 19 dias, início da perda da conformação esférica.



Figura 16 - Imagem ecográfica de vesícula embrionária e embrião, aproximadamente no 30º dia de gestação.

A gestação gemelar deve ser evitada devido ao frequente insucesso no final da gestação, causando na maior parte das vezes aborto de um ou ambos os fetos. Assim, um fator considerado de grande importância no diagnóstico de gestação precoce foi a deteção de gémeos, dando sobretudo maior importância às éguas que tiveram dupla ovulação. A incidência espontânea da dupla ovulação varia entre raças (2 a 25 %) (Ginther 2008). Quando dois folículos dominantes se desenvolvem na mesma onda folicular, a probabilidade da dupla ovulação ocorrer é de 43% (Ginther 2008). O

crescimento folicular é menor quando há ovulação dupla, esta redução está relacionada com a baixa concentração da hormona folículo estimulante (FSH), mais provavelmente devido a alta concentração de estradiol dos dois folículos pré-ovulatórios (Ginther 2008). Na figura 17 observa-se uma imagem ecográfica de um ovário por via transretal com dois folículos pré-ovulatórios que deram origem a ovulação dupla, um caso que ocorreu durante o estágio.

Quando era detetada gestação gemelar procedia-se imediatamente à rutura manual por palpação transretal de uma das vesículas embrionárias. Morel *et al.* (2012) concluíram que a redução manual de gestação gemelar não aumenta o risco de perda de gestação em relação à gestação simples.

Durante o estágio procedeu-se há rutura manual da vesícula embrionária em gestação gemelar em duas situações distintas. Na primeira, a deteção de gestação gemelar foi ao 13º dia pós-ovulação, detetaram-se vesículas embrionárias unilaterais juntas e de diferentes tamanhos. Por manipulação transretal tentou-se proceder à rutura do mais pequeno, o que foi impossível devido a proximidade, procedendo-se assim à rutura da maior vesícula embrionária. Mais tarde ocorreu reabsorção embrionária. A bibliografia afirma haver maior taxa de sucesso quando realizada antes da fixação (até ao 16º dia pós-ovulação), no entanto, há um risco acrescido na rutura quando a gestação é unilateral e quando é removida a vesícula embrionária maior (Newcombe 2000 e Morel *et al.* 2012).

Numa segunda égua procedeu-se ao diagnóstico de gestação gemelar de vesículas embrionárias bilaterais no 17º dia pós-ovulação. Nesta altura a redução manual de uma vesícula é mais difícil porque já está fixada, contudo, como se fixaram bilateralmente, em cada corno uterino, foi possível proceder à sua rutura. No final da redução foi administrada flunixinina meglumina 5 mL IV (1,1mg/kg) e administrado oralmente 10 mL de altrenogest (VirbaGest® 4mg/mL), análogo sintético da progesterona, durante 5 dias. Três dias depois, a égua foi reavaliada e confirmou-se a continuação da gestação simples. Há menor probabilidade em manter a gestação quando o procedimento é realizado depois do 20º dia de gestação e 100% de insucesso se realizados depois do 40º dia (Newcombe 2000).

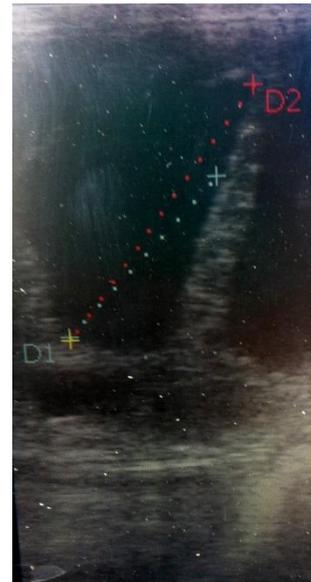


Figura 17 - Imagem ecográfica de dois folículos pré-ovulatórios, e medição do diâmetro do folículo de maior dimensão (38 mm).

Como já referido, outro fator que foi avaliado no diagnóstico de gestação precoce é o possível início do retorno ao cio, ou seja, aos 14-15 dias observa-se a regressão do CL e edema endometrial. A concentração de progesterona em éguas gestantes que retornam ao cio é baixa pelo 13º dia e continua baixa até ao 20º havendo reabsorção embrionária. Nesta altura a progesterona poderá estar tao baixa que atinge 1 ng/mL. A causa deste efeito é controversa, ou o embrião anormal falha no bloqueio da luteólise, ou há regressão espontânea do CL causando perda de gestação (Newcombe 2000). O tratamento, a fim de manter a gestação, consistia na administração oral de altrenogest 10 mL (VirbaGest® 4mg/mL, sintético da progesterona) diária, e procedia-se à recolha de sangue e envio para o laboratório a fim de analisar a concentração de progesterona. Se o resultado confirmava baixos níveis de progesterona (limite inferior, 4ng/mL). A administração de progesterona deve continuar até os ovários da égua produzirem CL secundário (Newcombe 2000), ou até a placenta começar a secretar progesterona (80-100 dias de gestação), assim depois dos 100 dias de gestação a égua contém suficiente progesterona para manter a gestação, podendo-se parar o tratamento.

### **1.5 Transferência de Embrião**

Durante o estágio tive oportunidade de acompanhar vários casos de recolha e transferência de embrião. Esta técnica tem cada vez maior destaque e interesse na reprodução equina tanto para clínicos como para proprietários. Permite obter vários poldros da mesma égua na mesma época reprodutiva, maior número de descendência de éguas com alto valor zootécnico, poldros de éguas desportivas e poldros de éguas subférteis, idosas ou com problemas reprodutivos ou musculares.

Os critérios de seleção das éguas recetoras são: idade entre 4 a 10 anos (limitando assim éguas com endometrite crónica), bom desenvolvimento mamário, ciclos éstricos normais e livres de anormalidades uterinas e ováricas, que já tenham reproduzido pelo menos uma vez, com boa capacidade reprodutiva e musculoesquelética, com bom temperamento, boa conformação perineal (caso necessário proceder à vulvoplastia), e livre de infeção uterina (Bortot 2013). Desta forma, durante o estágio todas as candidatas a recetoras passaram pelo exame reprodutivo completo, com exame ecográfico por via transretal do trato reprodutor e, quando estas se encontravam em cio, realizava-se zaragatoa uterina para cultura microbiana. Sempre que possível, era preferível que pelo menos duas recetoras estivessem disponíveis para

cada dadora, permitindo assim, no momento da transferência escolher a que apresentava as melhores condições reprodutivas para receber o embrião, ou seja, com CL bem definido e bom tônus uterino, e nenhuma alteração no útero (edema ou fluido).

O fator fundamental na TE é a sincronização da égua recetora e dadora. As éguas recetoras que ovulam até 1 dia antes ou até 5 dias depois da dadora, podem ser usadas, mas segundo Camargo *et al.* (2013) se ovularem no mesmo dia ou até 4 dias depois da dadora melhora a eficiência da transferência de embrião. O fundamental é que a recetora responda ao reconhecimento maternal da gestação e tenha adequado nível de progesterona.

A lavagem uterina para recolha do embrião da égua dadora era realizada 7 a 8 dias após ovulação desta. Não deve ser realizada muito tarde porque embriões mais desenvolvidos são mais frágeis, e por outro lado, se executado muito cedo, o embrião ainda pode estar no oviduto, pois os embriões migram para o útero 5 a 6 dias após a ovulação (Bortot 2013). No dia da TE, a égua dadora era examinada por palpação e ecografia por via transretal, para deteção da presença de CL e ausência de fluido uterino, este último é uma preocupação mas não impede a realização da lavagem uterina para recolha do embrião. É importante ter em conta que mesmo com endometrites pode haver conceção e produção de um embrião, sendo possível encontrar embrião num lavado uterino contaminado, contudo, independentemente do número de vezes que o embrião seja lavado, é difícil que sobreviva à transferência (Hartman 2011).

Antes da lavagem uterina, a rabada era segura o reto esvaziado e procedia-se à limpeza da zona perineal com água e Betadine® em espuma, esta era essencial para prevenir a contaminação do cateter introduzido no útero. Os embriões foram colhidos por lavagem uterina da égua dadora, utilizando uma cateter, sistema de tubo em Y, filtro e solução de lactato de ringier ou um meio próprio de recolha de embriões equinos (Vigro™ Complete Flush) previamente aquecida a temperatura corporal (37°C). O meio próprio de recolha de embriões contem ingredientes que ajudam a prevenir a aderência do embrião no tubo e paredes de plástico e contém AB (gentamicina e kanamicina). O tubo em Y ligava-se ao cateter, e uma das extremidades



Figura 18 - Colheita de embrião. Observação do cateter de Foley colocado e acoplado ao sistema de tubo em Y.

do Y ligava-se ao soro e a outra ao filtro (figura 18 e 19), estes eram preenchidos por soro antes de iniciar o processo para prevenir a entrada de ar no sistema. O cateter passa a cérvix até ao corpo uterino, o cuff do cateter era insuflado, impedindo que o meio de lavagem refluisse através da cérvix para a vagina. Quando o cateter estava bem posicionado procedia-se à introdução do meio de lavagem e sua posterior recolha, por gravidade, para que todo o lavado passasse pelo filtro. Este procedimento era repetido 3 ou 4 vezes ou até à



Figura 19 - Filtro para deposição do embrião.

obtenção do embrião, no último lavado administrava-se 1,7 mL de oxitocina IV (Partovet® 10UI). Durante a lavagem, procedia-se à massagem dos cornos uterinos por palpação transretal, certificando-se que os dois cornos eram preenchidos e auxiliando a passagem do embrião das pregas endometriais para o meio de lavagem. O fluido normal deve ser transparente e é frequente haver restos celulares, a sua presença é indicativa de um bom lavado. Os fluidos não transparentes são indicativos de endometrite. No final, em caso de dificuldade de extração do líquido, efetuava-se uma ecografia para verificar onde se encontrava o fluido, pois este predispõe a endometrites.

Quando se terminava a lavagem, o filtro era levado para o laboratório, e o restante fluido que ficava no filtro era passado para uma placa de petri estéril com grelha de contagem na parte inferior (figura 20) para facilitar a localização do embrião com a utilização de uma estereomicroscópico (ampliação 10 a 50 vezes). A procura do embrião deve ser muito minuciosa pois é muito fácil não o localizar somente por incorreta focagem. Uma vez localizada a vesícula embrionária é importante diferenciar um oócito não fertilizado de uma mórula (embrião de 6 dias). São parecidos e só se diferenciam porque a mórula é esférica e o oócito não fertilizado é redondo e achatado, assim para auxiliar na identificação de ambos agita-se ligeiramente a solução (Hartman 2011). Uma vez localizado, este é removido por aspiração com o auxílio de uma palheta de 0,5 ou 0,25 mL, acoplada a uma seringa de insulina, e



Figura 20 - Deposição do líquido do filtro na placa de Petri, e uso de uma seringa com soro para empurrar todas as substâncias aderentes ao filtro.

transferido para uma placa de petri pequena, contendo o meio de manutenção (Syngro™ - Holding Media).

Posteriormente, o embrião era classificado quanto à qualidade e estado de desenvolvimento. Quanto à qualidade este era classificado de categoria 1, embrião excelente, a categoria 4, embrião degenerado (Anexo 3). Quanto ao desenvolvimento era classificado em mórula, blastocisto jovem ou blastocisto expandido (Anexo 4). Após avaliação e classificação, o embrião era lavado com cerca de 10 passagens consecutivas no



Figura 21 - Placa de Petri pequena para lavagem do embrião.

meio de manutenção nas placas de petri pequenas (figura 21). O objetivo deste procedimento era eliminar as impurezas presentes na zona pelúcida. Depois o embrião era colocado numa palheta de 0,25 ou 0,5 mL, dependendo do tamanho do embrião, tendo em conta que, o embrião não deve ocupar mais de 60-70% do diâmetro interno da espessura da palheta. A palheta era carregada com 3 segmentos do meio de solução, separadas por dois segmentos de ar, e o embrião era colocado no segmento central. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero. De seguida, a palheta é introduzida num pistoete de inovulação (figura 22), e esta era por sua vez introduzida num plástico esterilizado, para assim não perder a esterilidade ao passar na vagina e vestíbulo.



Figura 22 - Pistoete de inovulação (Minitube 2014).

Antes da transferência, a égua recetora era examinada por palpação e ecografia por via transretal, para certificar a presença de bom tónus uterino, cervix fechada firme e CL, indicativo de aceitável circulação de progesterona. Inicialmente, era procedido à remoção do conteúdo fecal do reto, a rabada da égua era segura e a zona perineal limpa com água e clorhexidina. A transferência do embrião para a recetora era realizada por via transcervical, por técnica asséptica, com mínima manipulação na cervix. Depositava-se suavemente o embrião no lúmen uterino perto da bifurcação. Deve-se ter cuidado na manipulação da cervix porque pode resultar na libertação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , e esta sucessivamente pode resultar em luteólise prematura (Hartman 2011).

A medicação rotineira para as éguas recetoras era flunixin meglunima 0,5 mg/kg IV (Finadyne® 50 mg/mL) e acepromazina 0,05 mg/kg IV (Calmivel® 5 mg/mL), este último é usado com o intuito de tranquilização e obtenção de relaxamento cervical.

A grande dificuldade da TE é a coordenação de variados fatores, que vai afetar a taxa de sucesso de gestação. Estas variáveis incluem o manejo e qualidade da égua dadora e recetora, sincronização da ovulação, a qualidade das técnicas e métodos usados na TE, a qualidade do embrião, condições do útero da dadora e da recetora e a saúde das recetoras depois da transferência (Camargo *et al.* 2013). Recentes estudos têm-se focado nos fatores que afetam o sucesso da TE. Panzani *et al.* (2014) afirmam que os fatores que afetam a colheita do embrião na dadora são a idade, a raça e a categoria reprodutiva da égua dadora, o tipo de sémen, o número de ovulações e a técnica de IA, enquanto, o protocolo e dia da transferência após ovulação (entre 7º ao 10º dia pós-ovulação) não têm efeito significativo na colheita. Um dos fatores que afetam o sucesso da TE é o tamanho do embrião na altura da transferência para a égua recetora, por sua vez este é influenciado pela idade da égua dadora, pelo tipo de sémen, pelo número de ovulações por ciclo e pelo dia da transferência após ovulação. Camargo *et al.* (2013) afirmam que embriões com 400 a 1199µm produzem maior taxa de gestação na recetora do que os embriões que medem 150 a 399µm, e afirmam ainda que blastocisto e blastocisto expandido produzem melhor taxa de gestação do que mórula e blastocisto precoce. A qualidade do embrião também afeta a taxa de gestação, esta é superior em embriões de grau 1 ou 2 em relação aos de grau 3. A sincronização da ovulação da recetora e dadora também é essencial para o sucesso da TE (Camargo *et al.* 2013).

## **2 - CLÍNICA REPRODUTIVA**

### **2.1 Endometrites**

As endometrites são a maior causa de infertilidade nas éguas, ocorrem devido a falhas nos mecanismos de defesa uterinos na eliminação de antigénios (bactérias ou espermatozoides) e produtos inflamatórios do útero. As endometrites, agudas ou crónicas, têm duas origens distintas: contaminação bacteriana ou espermática. Entre 10 a 15% das éguas desenvolvem endometrites persistentes induzidas pela inseminação/monta natural (Liu e Troedsson 2008), desta forma, é importante realização do exame ecográfico uterino por via transretal 12 a 24 horas depois da

inseminação, para identificação das éguas suscetíveis a endometrites após inseminação, e proceder ao tratamento, se necessário.

Após inseminação o sémen desencadeia um processo inflamatório agudo fisiológico, havendo aumento pronunciado de neutrófilos entre as 8 e 12 horas pós-inseminação. O fluido proveniente dos produtos inflamatórios é removido pelas contrações uterinas e por reação imunomediada proporcionando o adequado retorno ao ambiente uterino propício ao desenvolvimento do concepto. Éguas que falham nos mecanismos de defesa uterino em 24-48 horas resultam em endometrites persistentes, sendo improvável a sobrevivência do embrião. A endometrite persistente pode interferir diretamente na sobrevivência do embrião ou causar luteólise prematura e sucessivamente reabsorção embrionária devido ao aumento da concentração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , levando à diminuição da progesterona por lise do CL. As éguas propensas a endometrites pós-inseminação devem ser tratadas entre as 4 a 8 h pós-inseminação, dando tempo ao esperma de chegar ao oviduto, mas não tempo suficiente às bactérias para iniciarem a fase de crescimento (LeBlanc e Mckinnon 2011).

Os possíveis sinais clínicos de endometrite são encurtamento do intervalo interéstrico com sinais de cio no 15º dia pós-ovulação ou por vezes mais cedo, edema uterino patológico, corrimento vaginal, acumulação de fluido intrauterino ou ser assintomático.

O método de diagnóstico de endometrite mais utilizado no estágio consistiu na realização de zaragoas uterinas para cultura bacteriana. Este é um excelente meio para identificação do agente etiológico da endometrite e sucessivamente para teste



Figura 23 - Zaragatoa uterina estéril com dupla proteção (Minitube 2014).

de sensibilidade a antibióticos (TSA), permitindo optar pela terapia apropriada ao tipo de infeção. A amostra intrauterina é recolhida com uma zaragatoa uterina estéril com dupla proteção (figura 23), assim terá mínima probabilidade de contaminação da amostra ao passar pela vagina e a possibilidade de usar a amostra para cultura uterina. Deve-se ter em conta que falsos positivos e falsos negativos podem surgir. Assim, só o resultado da cultura uterina pode não ser suficiente para fazer o diagnóstico de endometrite e, nesses casos, deve ser sempre interpretado juntamente com a citologia uterina. A citologia uterina para diagnóstico de endometrite aguda é mais sensível do que a cultura uterina, porque em resposta à inflamação ocorre a migração dos

polimorfonucleares neutrófilos no lúmen uterino que são rapidamente detetados num esfregaço de células endometriais. Outra opção de diagnóstico de endometrite é a biópsia endometrial, sendo o único teste que avalia a integridade da estrutura do endométrio, infiltração inflamatória, alterações fibróticas e dilatação das glândulas endometriais e vasos linfáticos. É indicado em éguas mais velhas, com suspeita de anormalidades no endométrio, éguas subférteis ou com frequente morte embrionária precoce (LeBlanc e Mckinnon 2011).

As endometrites podem ter origem bacteriana ou fúngica. As bactérias mais comuns que causam endometrites são *Streptococcus beta-hemolíticos (Streptococcus equi ssp. zooepidemicus)*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* (LeBlanc e Mckinnon 2011) e os fungos mais frequentes são *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* (Stout 2008).

As estratégias de tratamento de endometrite são diversas, devem ser baseadas na origem da doença, severidade dos sinais clínicos, e exames de diagnóstico. O tratamento base consiste na atuação dos mecanismos de defesas uterino contribuindo na eliminação dos produtos inflamatórios e bactérias, e administração de agente antimicrobianos.

A oxitocina IM ou IV (Partovet® 10UI) era o tratamento sugerido quando havia acumulação de líquido no lúmen uterino, devido à sua capacidade de promover a contração uterina. A sua duração de ação é de 30 a 45 min, inicia-se em média após 11,8 minutos se administrado IM e 0,5 a 1 minuto se administrado IV (Madill *et al.* 2002). Está descrito que existem éguas que não respondem à oxitocina. Os fatores que podem afetar a resposta incluem: idade da égua, administração de droga concorrente, condição dos recetores de oxitocina endometriais, dose inapropriada, propagação anormal da contração uterina e condição inflamatória do útero (LeBlanc 2011).

Se a oxitocina não era suficiente ou se o fluido intrauterino era elevado, procedia-se há lavagem uterina, esta promove a remoção do fluido intrauterino e produtos inflamatórios, que interferem com a função neutrofílica e eficácia antibiótica. Esta, se for realizada 4 horas depois da inseminação, não tem qualquer efeito negativo na gestação (Liu e Troedsson 2008). A lavagem uterina era realizada com um cateter de Fóley de grande calibre autoclavável com cuff (figura 24) (para impedir a saída do soro pelo cérvix), e lactato de ringer. O soro entra por gravidade, cerca de 1 litro de

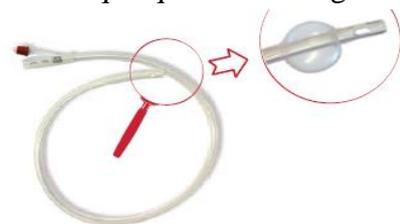


Figura 24- Cateter flushing uterino (Minitube 2014).

cada vez, e depois é removido, este procedimento era repetido até o fluido removido vir limpo. A quantidade total de soro introduzido no útero deve ser igual ou maior à quantidade removida, caso não se consiga retirar o fluido todo administra-se oxitocina.

A terapia bacteriana é fundamental para o tratamento de infecções uterinas persistentes. A escolha do antibiótico, sempre que possível, era baseada nos resultados da cultura e TSA. Caso não se tivesse realizado a cultura, o antibiótico de primeira escolha era a enrofloxacina oral 5,5 mg/kg SID (Floxavex® 100mg/mL) durante 5 dias ou gentamicina intrauterina, que têm ação contra gram-negativos. Desta forma, o tratamento intrauterino realizado com maior frequência foi com gentamicina 1g BID (Gentavin® 100 mg/mL), durante 3 dias, este foi sempre alcalinizado com bicarbonato de sódio (tamponado com igual volume de 7,5% de bicarbonato). A gentamicina é efetiva contra o *Streptococcus equi* ssp., *Zooepidemicus*, *Enterobacter* spp., *E.coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia*, *P.aeruginosa*, *S. aureus* (LeBlanc e Mckinnon 2011).

A incidência de infecções fúngicas endometriais é significativamente menor do que a incidência de infecções bacterianas, contudo as endometrites fúngicas são mais difíceis de tratar e oferecem pior prognóstico de fertilidade. Também podem surgir infecções polimicrobianas, ou seja, infecções uterinas fúngicas e bacterianas, estas são extremamente difíceis de tratar e necessitam de terapia sistêmica antifúngica e antibacteriana (Beltaire *et al.* 2012). A história clínica reprodutiva de endometrite fúngica baseia-se na infertilidade e repetidos tratamentos intrauterinos com AB. Fatores associados podem ser distócias, retenção das membranas fetais, reabsorção embrionária, aborto e má conformação perineal associada a pneumovagina (Stout 2008). As éguas afetadas usualmente exibem acumulação de fluido intrauterino com ou sem corrimento vaginal de consistência purulenta (Silva e Alvarenga 2011).

Durante o estágio procedeu-se a um tratamento de endometrite fúngica. Neste caso, a égua no ano anterior não ficou gestante e teve cultura positiva fúngica, procedeu-se na altura a tratamento antifúngico. Este ano, o primeiro intento resultou em reabsorção embrionária, e procedeu-se novamente a cultura intrauterina, o resultado foi negativo, contudo considerámos a possível ocorrência de falsos negativos.

Diagnóstico de endometrite fúngica é baseado na história clínica, sinais clínicos, e identificação do fungo por culturas endometriais, citologia e biópsia. Contudo durante o estágio só eram realizadas por rotina culturas endometriais, pelo que foi o único teste

complementar de diagnóstico realizado nesta égua. Em casos de endometrite fúngica a citologia endometrial iria detetar sinais de inflamação e presença de fungos (leveduras ou hifas). E a biópsia endometrial seria útil para determinar a localização dos fungos no útero (no lúmen uterino, aderentes à superfície luminal, dentro do lúmen das glândulas endometriais ou dentro do endométrio), severidade da inflamação e extensão dos danos no endométrio. E sucessivamente determinar o tratamento (local ou sistémica), a resposta da infeção ao tratamento e determinar o prognóstico de fertilidade (Stout 2008, Silva e Alvarenga 2011).

Optou-se pelo tratamento de fungos intrauterino com lufenuron (Program® 133mg/ampola) usando uma ampola diluída em soro fisiológico, duas vezes com intervalo de 3 dias. Esta substância é usada para controlo de pulgas, contudo tem-se conhecimento que afeta potencialmente a síntese de quitina, componente da parede celular das leveduras (por exemplo, *Candida* spp.) e hifas (por exemplo, *Aspergillus* spp.), e tem tido sucesso no tratamento de endometrite fúngica (Liu e Troedsson 2008). Contudo, a égua não demonstrou melhoria na endometrite. Devido ao insucesso do tratamento, optou-se pela administração intrauterina de Dimetil Sulfoxido (DMSO). São usadas em endometrites crónicas e quando nenhum outro tratamento teve êxito (LeBlanc e Mckinnon 2011). Ley *et al.* (1989) estudou as alterações histológicas endometriais e a taxa de gestação após o tratamento intrauterino com DMSO a 10 e 30% em éguas problemáticas, e constatou que 30% das éguas tratadas com DMSO demonstram redução do conteúdo celular inflamatório e redução da fibrose glandular por biópsia endometrial. Contudo, a taxa de gestação não demonstrou diferença significativa em relação ao grupo controlo (tratamento com NaCl 0,9%).

O tratamento antifúngico deve ser baseado na cultura fúngica *in vitro*, contudo este requer meios específicos e incubação prolongada (mais de 4 semanas). Beltaire *et al.* (2012) concluíram que os polienes (anfotericina, natamicina e nistatina) são frequentemente usados no tratamento fúngico e são a primeira escolha para o tratamento empírico de infeções fúngicas.

O prognóstico de endometrite fúngica é reservado a pobre, porque o fungo resiste ao tratamento ou devido ao retorno da infeção subsequentemente (Stout 2008). O mesmo autor reporta que o tratamento intrauterino de endometrite fúngica com 2% de ácido acético durante 3 dias ou com antifúngicos durante 5 a 7 dias é eficaz na eliminação do agente somente em 20% dos tratamentos por ciclo éstrico.

## 2.1 Vulvoplastia

Um dos aspetos importantes que foram avaliados nos exames reprodutivos de rotina foi a conformação da vulva, pois a sua anatomia é a primeira linha de defesa em proteger o trato reprodutivo de contaminação. Desta forma, má conformação da vulva tem efeitos adversos numa égua reprodutora, pois irá quebrar esta barreira, predispondo a égua a pneumovagina, a contaminação fecal do trato reprodutivo caudal e infeções bacterianas ascendentes, que sucessivamente levam a infertilidade. Esta condição é frequentemente observada em éguas multíparas com baixa condição corporal. A má conformação da vulva consiste no afundamento do ânus para o canal pélvico provocando inclinação cranial da comissura dorsal da vulva de modo a que esta fica orientada horizontalmente em vez de verticalmente (Woodie 2012).

Suspeita-se de pneumovagina quando há má conformação, quando se separam os lábios vulvares e se apercebe da presença de ar no seu interior, ou presença de ar no útero ou vagina durante o exame ecográfico do trato reprodutivo. O tratamento consiste em suturar a porção dorsal dos lábios da vulva prevenindo a aspiração de ar e material fecal no trato reprodutivo, processo cirúrgico designado de Vulvoplastia (Cirurgia “Caslick”).

Passa-se a apresentar o caso de uma égua com má conformação da vulva e que no exame ecográfico apresentava presença de ar no útero. Como ainda não se encontrava inseminada optou-se pela união da porção dorsal dos lábios da vulva simplesmente com agrafes (figura 25). Após a inseminação, e a confirmação da ovulação procedeu-se a vulvoplastia.

Antes de se proceder à técnica cirúrgica o reto foi evacuado, a cauda segura para não interferir com a cirurgia, e a zona perineal lavada com água e Betadine® em espuma. Procedeu-se a anestesia local, com lidocaína 2%, na margem dos lábios da vulva do arco isquiático à comissura dorsal. Seguidamente, com auxílio de uma tesoura cortou-se as margens dos lábios da vulva, de forma

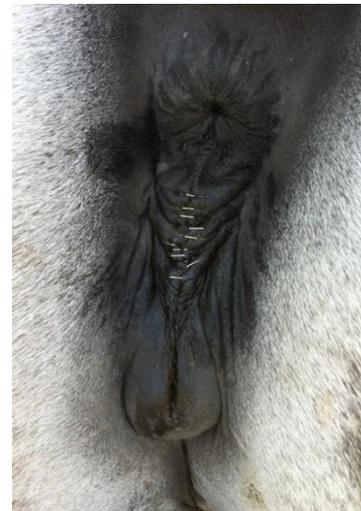


Figura 25 - União da porção dorsal dos lábios da vulva com agrafos.



Figura 26 - Vulvoplastia, início da sutura na comissura dorsal.

a ter 4 a 8 mm de abertura, não esquecendo a comissura dorsal. Os bordos são suturados da comissura dorsal até ao limite ventral que é determinado pela palpação do arco isquiático lateralmente à vulva (figura 26). Foi utilizado fio de sutura absorvível com padrão simples contínuo (Woodie 2012). No final, certificou-se que não existe nenhum orifício ao longo da sutura, pois levaria à formação de fístulas e mais tarde novamente aspiração de ar e material fecal (Woodie 2012).

## 2 - MEDICINA PREVENTIVA

Na medicina preventiva teve lugar a vacinação, contra gripe equina e tétano, e desparasitação equina (tabela 3). A vacinação consiste numa injeção que estimula o sistema imunológico do cavalo a desenvolver proteção contra uma doença específica. Existem várias vacinas contra determinadas doenças, contudo algumas são recomendadas apenas em casos particulares, variando com a localização geográfica. Em Portugal as únicas vacinas utilizadas em cavalos são as vacinas contra a influenza e contra o tétano. Contudo, é importante ter conhecimento que existem vacinas contra outras doenças e que estas estão legisladas em muitos outros países.

Tabela 3 - Procedimentos efetuados na área de medicina preventiva.

Procedimentos em Medicina Preventiva		Nº de procedimentos
Desparasitação	Ivermectina + Praziquantel	20
Vacinação	Gripe Equina + Tétano	22

Em Portugal não existe vacinação obrigatória para equinos. Exceto em cavalos de competição nas provas dirigidas pela Federação Equestre Portuguesa (FEP) ou Federação Equestre Internacional (FEI), neste caso é obrigatória a vacinação contra a influenza equina, sob um regulamento de vacinação, para estarem aptos a participar nas competições. A influenza equina ou gripe equina é uma doença infecto-contagiosa causada pelo vírus-influenza, de elevada prevalência mundial e de grande importância económica pois surge em surtos. O protocolo de vacinação consiste inicialmente numa primovacinação, composto por 2 vacinas com intervalo de 21 a 92 dias (nesta altura os cavalos só podem entrar em provas 7 dias depois da 2ªvacinação), seguidas de uma 3ªdose dentro de 7 meses. O reforço de vacinação deve ser administrado no mínimo de

12 em 12 meses, mas em cavalos de competição, o último reforço deve ser administrado em 6 meses mais 21 dias antes da chegada ao evento, e não podem competir 7 dias depois da última vacinação (FEI 2013).

O tétano é uma doença infecciosa causada por toxinas produzidas pelo *Clostridium tetani*. Para a manifestação clínica do tétano é necessário ferimento ou solução de continuidade que possibilite a introdução da bactéria, esta está disseminada em fezes e no solo, principalmente quando a higiene das instalações é precária. A vacina contra o Tétano, apesar de não ser obrigatória a nível oficial, deve ser administrada em todos os cavalos uma vez que as consequências desta doença são graves, e a maior parte das vezes fatal, pelo que o risco não se justifica quando este pode ser prevenido. O programa de vacinação pode iniciar-se em qualquer idade a partir dos 5 meses, a primovacinação consiste em duas doses administradas com 30 dias de intervalo, seguidas pelo reforço vacinal anual.

As infeções parasitárias nos equinos são prejudiciais para o bem-estar animal. Durante o estágio, o principal sinal clínico que nos alertou para uma possível contaminação parasitária foi a perda de peso, contudo, outros sinais clínicos são episódios recorrentes de cólicas e diarreias severas. A desparasitação preventiva é muito importante para prevenir estes quadros clínicos, no entanto, é fundamental evitar a desparasitação em excesso pois esta é uma das principais causas responsáveis pela resistência aos desparasitantes. Nestes casos, procedia-se ao envio das fezes para análise laboratorial de coprologia. O desparasitante usado foi uma preparação comercial oral de Ivermectina mais Praziquantel. A Ivermectina tem ação bastante eficaz contra todos os tipos de nemátodes, com a exceção dos estádios larvares imaturos de ciatostomas, e o Praziquantel tem ação contra ténias.

### **3 - IDENTIFICAÇÃO EQUINA**

A Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) é a autoridade central nacional competente na identificação e registo animal. O Decreto-Lei n.º 142/2006, de 27 de Julho (Diário da República 2006), que criou o Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (SNIRA) estabelece as regras de identificação, registo e circulação. O Decreto-Lei n.º 123/2013, de 28 de agosto (Diário da República 2013) estabelece as regras que constituem o sistema de identificação dos equídeos (equinos, asininos e

muares) nascidos ou introduzidos em Portugal, assegurando a execução e garantindo o cumprimento pelos detentores, das obrigações previstas (DGAV 2014).

O sistema de identificação dos equídeos é composto pelos seguintes elementos: Documento de Identificação de Equídeos (DIE) ou passaporte, único e vitalício. No DIE consta um número universal, único e vitalício, um código alfanumérico de quinze dígitos que compila informações sobre um único equídeo. O método que assegure a ligação inequívoca entre o documento de identificação e o equídeo é o resenho completo (gráfico e descritivo) e identificação eletrónica (*microchip*) (Anexo 5, Certificado de Identificação Equino). Os equídeos nascidos em Portugal devem ser identificados antes de abandonarem o local de nascimento, até 31 de dezembro do ano do nascimento ou no prazo de seis meses a contar da data de nascimento (DGAV 2014).

Tabela 4 - Procedimentos efetuados na área de Identificação Equina.

Procedimentos na Identificação Equina	Nº de procedimentos
Resenho	22
Colocação de <i>Microchip</i>	8

Só é permitida a realização do resenho gráfico e descritivo e colocação do *microchip* aos médicos veterinários. Desta forma, durante o estágio a identificação equina baseou-se neste dois parâmetros (tabela 4). O *microchip* é implantado no terço médio do pescoço no lado esquerdo, sensivelmente três dedos abaixo do bordo crinal, na área do ligamento nugal. O resenho é um método de identificação que consiste na enumeração sucinta de caracteres identificativos. Deve ser rigoroso, pormenorizado e claro, para não induzir em erro e permitir um rápido reconhecimento. O resenho completo pressupõe resenho descritivo (data de nascimento, nome, sexo, criador, proprietário atual, raça, número de identificação eletrónica, tipo de pelagem e descrição das particularidades observadas), e resenho gráfico (desenho de todas as particularidades observadas). O resenho gráfico e descritivo das particularidades (sinais particulares presentes na pelagem que imprimem um caracter próprio ao indivíduo) foi sempre elaborado baseando-se no livro “Identificação de Equinos” de Maria Portas (2003).

#### 4 - SISTEMA LOCOMOTOR

Nos dias que correm, grande parte dos proprietários têm cavalos com aptidão desportiva, pelo que o conhecimento geral da medicina desportiva equina é uma ferramenta de grande importância na clínica veterinária equina. Durante o estágio ocorreram 10 casos relativos ao sistema locomotor, entre os quais, Osteocondrite Dissecante (OCD), tendinites e desmites.

O exame do sistema locomotor deve ser o mais metuculoso possível para assim recolher os elementos necessários à identificação, à localização, à extensão e gravidade da lesão, para no final estabelecer o tratamento e prognóstico adequado. Desta forma, o exame consistia na anamnese, exame visual, exame estático, exame dinâmico e exames complementares (bloqueios anestésicos, exame radiológico e ecografia).

No exame visual procura-se perceber qualquer alteração do comportamento, postura, condição corporal e conformação dos membros. O exame estático baseia-se numa exploração e palpação de todas as estruturas e regiões do membro e dorso, de maneira a localizar qualquer zona com aumento de temperatura, de sensibilidade, de tumefação e a eventual presença de aderências aos tecidos adjacentes. A sensibilidade das estruturas internas do casco é avaliada com a pinça de cascos, exercendo pressão em zonas específicas. No exame dinâmico identifica-se o(s) membro(s) afetados e avalia-se o grau de claudicação, deve ser avaliado a passo e a trote, em linha reta e em círculo, em piso mole e em piso duro. Os sinais para a identificação do(s) membro(s) claudicantes são: o movimento da cabeça e pescoço, a assimetria do movimento da pélvis, assimetria do movimento, as alterações no ângulo de flexão/extensão das articulações, o apoio dos cascos no solo, a descida dos boletos e o uso e simetria dos músculos. A classificação do grau de claudicação utilizado foi a escala da Associação Americana de Clínicos de Equinos (American Association of Equine practitioners - AAEP) (Ross 2011):

- Grau 0: ausência de claudicação
- Grau 1: claudicação suave a trote, difícil de observar e não consistentemente aparente, subtil movimento da cabeça e assimetria da pélvis;
- Grau 2: claudicação ligeira, difícil de observar a passo e trote em linha recta, mas consistentemente evidente em determinadas circunstâncias;
- Grau 3: claudicação moderada, visível no trote, em qualquer circunstância;
- Grau 4: claudicação severa, visível a passo e com extremo movimento da cabeça e assimetria da pélvis, contudo o cavalo ainda consegue trotar;

- Grau 5: supressão de apoio, caracterizada por mínimo apoio em movimento e em repouso

De seguida, quando não era evidente qualquer claudicação ou claudicação ligeira, procedia-se a flexões ativas na tentativa de agravar a claudicação.

Depois de se identificar o membro afetado procedia-se aos bloqueios anestésicos locais (perineurais e/ou intra-articulares) com o objetivo de localizar com exatidão a lesão. Utilizou-se lidocaína a 2%, e previamente o local do bloqueio era desinfetado com clorhexidina e álcool a 90%.

Após localização da lesão procedia-se aos exames complementares de imagiologia (radiografia e ecografia) que permitiam registar e identificar a lesão. Mais tarde, muito úteis na monitorização da recuperação da lesão ao longo do tempo, e consequentemente na eficácia do tratamento.

Tabela 5 - Procedimentos efetuados relativos ao sistema locomotor.

Procedimentos relativos ao sistema locomotor	Nº de procedimentos
Exame de claudicação	10
Exame radiográfico	17
Exame ecográfico	5
Bloqueios perineurais e intra-articulares	6
Infiltrações tendinosas ou articulares	4
Tratamento local com PRP	3

Na tabela 5 estão descritos os exames complementares de diagnóstico e tratamentos realizados no âmbito do sistema locomotor. Analisando a tabela é possível constatar que o procedimento mais frequente no sistema locomotor foi o exame radiográfico. Isto deveu-se, principalmente, ao facto de dois cavalos terem sido diagnosticados com OCD no curvilhão, e sucessivamente a necessidade de radiografar as restantes articulações suscetíveis de ter OCD. A osteocondrose resulta da alteração da ossificação endocondral no complexo articular-epifisário e placa metafisária de crescimento, que sucessivamente causa necrose e forma fissuras ou *flaps* cartilagosos, que se destacam e soltam na articulação, nesta fase é designado o termo OCD. A etiologia é multifatorial: influência genética, fatores nutricionais, influência biomecânica e conformação. Os sinais clínicos não são coincidentes com o desenvolvimento da lesão, pois as lesões de osteocondrose podem-se formar por volta dos 6 meses de idade, e os sinais clínicos só aparecerem mais tarde quando o cavalo

inicia o treino. As articulações (art.) mais frequentemente afetadas são: curvilhões (art. tarsocrural), soldra (art. femoropatelar) e boletos (art. metacarpofalângica e metatarsofalângica). Desta forma, quando se diagnostica OCD numa articulação as restantes também devem ser radiografadas. Aos dois proprietários dos cavalos foi aconselhado o tratamento cirúrgico.

A vida útil dos equinos de desporto pode ficar comprometida com a gravidade das patologias tendinosas, principalmente no que diz respeito ao restabelecimento das funções do tendão envolvido. Neste âmbito, a escolha do tratamento a ser adotado vai depender do tipo de lesão que o animal apresenta, do tempo de repouso e da medicação que deverá ser administrada, entre outros.

Passo apresentar um caso clínico de um cavalo de desporto de saltos de obstáculos para realização de exame de claudicação, já com história de tendinite no tendão flexor digital superficial (TFDS). No exame estático observou-se uma tumefação no membro anterior esquerdo (MAE) na parte posterior da canela na zona dos tendões flexores, no exame dinâmico observou-se claudicação do respetivo membro. Procedeu-se de seguida ao exame ecográfico dos tendões flexores digitais de ambos os membros anteriores. No MAE observou-se uma lesão no TFDS (figura 27) de 10% de superfície localizado entre 2A e 2B (Anexo 6, demonstração das zonas ecográficas da região do carpo e metacarpo).

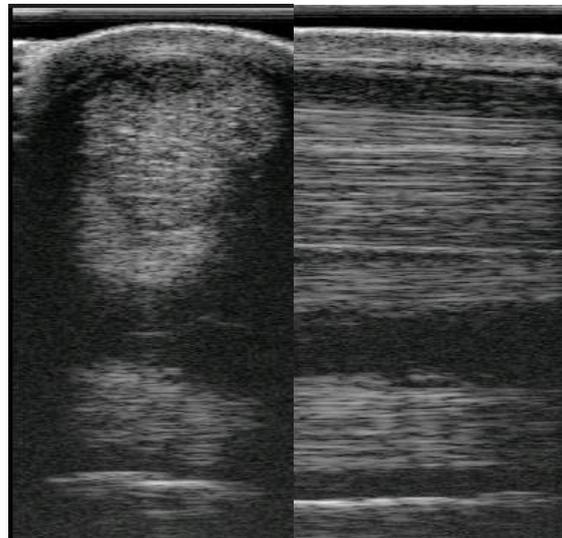


Figura 27 - Exame ecográfico da zona dos tendões flexores digitais do MAE, visualização da lesão no tendão flexor digital superficial, com vista transversal e

superfície localizado entre 2A e 2B (Anexo 6, demonstração das zonas ecográficas da região do carpo e metacarpo). Como se tratava de uma tendinite não recente e de considerável dimensão foi sugerido pela médica veterinária repouso ao cavalo para iniciação de tratamento local com Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Contudo, os proprietários não pretendiam parar o cavalo nesta altura pois iriam decorrer provas. Por conseguinte, os proprietários incitaram a realização de tratamento à base de corticosteroides, desta forma, procedeu-se à injeção intralesional com dexametasona (Cortexone® 2,63 mg/mL). Contudo o uso intralesional de corticosteroides é contraindicado podendo ser prejudicial à cicatrização da lesão. Ross *et al.* (2011) afirma que poderá ter sucesso, em cavalos de corrida, o uso de baixa dose de corticosteroides

em junção com ácido hialurónico (AH). Outros tratamentos utilizados em casos de tendinite incluem o AH e glicosaminoglicanas polisulfatadas (GAGPS). O AH é uma componente da matrix tendinosa, influencia a formação e agregação de colagénio e estimula a fibrinogénese, com produção de colagénio tipo I (Gaughan *et al.* 1991, Ross *et al.* 2011). Gaughan *et al.* (1991) estudaram os efeitos da infiltração da bainha flexora com AH, 8 semanas depois, revelaram melhoria ecográfica da cicatrização do tendão, menor formação de aderências, e histologicamente demonstraram uma redução na infiltração de células inflamatórias, melhoria da estrutura tendinosa e menor hemorragia intratendinosa. Os GAGPS inibem a ativação dos macrófagos e ativam o colagénio e metaloproteinase, apresentam benefícios na fase aguda das lesões tendinosas. (Ross *et al.* 2011).

Ao reavaliar 5 semanas depois, não se observou melhoria considerável clínica e ecograficamente, pelo que se optou por proceder ao tratamento local com PRP. O PRP é um preparado do sangue total que contém diversos fatores de crescimento importantes na proliferação e diferenciação celular, angiogénese, além de síntese e deposição da matriz extracelular na cicatrização tendinosa ou ligamentosa (Maia 2009). É derivado do sangue total e contém 3 a 5 vezes mais plaquetas do que os níveis fisiológicos, que em cavalos podem variar de 100.000 a 350.000 plaquetas/ $\mu$ l. A concentração acima de 300.000 plaquetas/ $\mu$ l é necessária para o efeito terapêutico desejado (Maia 2009).

Durante a cicatrização da lesão, a agregação plaquetária resulta na libertação de substâncias bioativas que promovem o reparo tecidual, regulam a inflamação, e estimulam o recrutamento de células estaminais. As plaquetas contêm altas concentrações de fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento transformador-beta (Transforming Growth Factor beta - TGF- $\beta$ ), fator de crescimento tipo insulina 1 (Insulin-like Growth Factor - IGF-1), fator de crescimento derivado das plaquetas (Platelet Derived Growth Factor - PDGF), fator de crescimento vascular endotelial (Vascular Endotelial Growth Factor - VEGF), fator de crescimento fibroblástico (Fibroblastic Growth Factor - FGF), fator de crescimento epidermal (Epidermal Growth Factor - EGF) e fator de crescimento epidermal derivado de plaquetas (Platelet Derived Epidermal Growth Factor - PDEGF), que são libertados após a ativação plaquetária (Maia 2009, Fortier 2011).

As vantagens de usar PRP incluem a facilidade de uso, administração de péptidos autólogos, libertação de fatores de crescimento e baixo custo. A desvantagem é

a falta de células estaminais na preparação e a variabilidade entre produtos em relação à concentração de plaquetas e conteúdo de leucócitos residual (Fortier 2011).

Existem diversos protocolos descritos de obtenção do PRP na espécie equina: do tubo (manual), *buffy coat* (semiautomática) e por aférese (automática). A preparação da solução de PRP no estágio foi através do processo de centrifugação para concentrar as plaquetas. Desta forma, foi recolhido sangue total pela veia jugular, anteriormente preparada assepticamente com álcool e clorhexidina, em 8 tubos BD Vacutainer® de Citrato de Sódio Tamponado (3,2%). Estes foram seguidamente centrifugados a 120g a 5 min com uma seringa recolheu-se o sobrenadante de todos os tubos, o plasma, que foi depositado em 2 tubos de 5 mL sem anticoagulante e descartou-se a fração sedimentada, as hemácias e leucócitos e procedeu-se à segunda centrifugação. Nesta fase, o plasma é dividido em duas partes, o plasma rico em plaquetas (porção inferior) e plasma pobre em plaquetas (porção superior), e com a seringa recolhe-se cerca de 2 mL do plasma do fundo do tubo, e assim o preparado de PRP está concluído.

A aplicação de PRP só deve ser injetada no tecido lesionado 7 a 10 dias depois da lesão, quando a fase inflamatória da cicatrização da ferida está a retroceder (Fortier 2011). Antes da administração de PRP, limpou-se a zona da lesão com álcool e clorhexidina. A administração intratendinosa de PRP foi por aplicação guiada ecograficamente (figura 28). Deve-se ter suficiente solução de PRP para preencher a lesão (Fortier 2011).

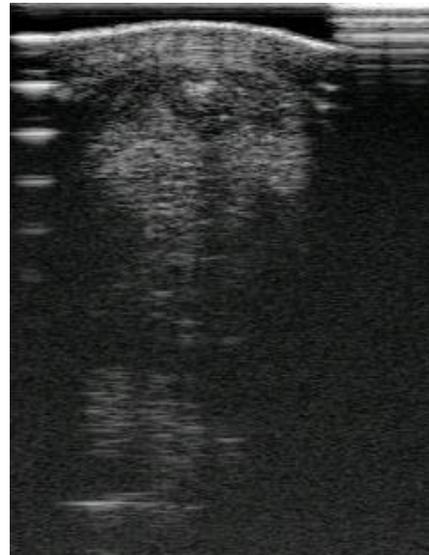


Figura 28 - Administração de PRP intratendinosa guiada por ecografia, por observação da introdução da agulha na zona intralesional.

O tratamento intralesional de PRP foi repetido 3 vezes com intervalos de 2 semanas. Durante este tempo a reabilitação foi fundamental para o sucesso da reparação, restauração da função e prevenção de nova lesão, sendo aconselhado repouso ao cavalo.

## 5 - DENTISTERIA

A representatividade no sistema odontológico consistiu principalmente nos exames dentários de rotina que devem ser realizados periodicamente. Hoje em dia, estes exames são necessários devido à alteração na dieta e padrões alimentares dos cavalos que ocorrem do advento da domesticação e confinamento que sucessivamente alteram o desgaste normal dos dentes (Botelho 2007).

Durante o estágio os sinais clínicos que nos levaram a suspeitas de problemas dentários foram perda de peso, dificuldade em ganhar peso e dificuldade na mastigação, além da queixa de um proprietário à grande sensibilidade do cavalo ao freio/bridão. Além destes sinais clínicos de doença dentária, também se pode observar tendência do equino molhar o feno no bebedouro, excessiva salivação durante a alimentação, halitose, excessivas partículas de grão nas fezes, sinais de cólica devido a alterações digestivas e metabólicas e baixo rendimento desportivo (Botelho 2007).

O exame dentário deve consistir na história clínica, na inspeção externa do equino, na capacidade de mobilidade da cabeça e mandíbula e sua simetria, e na inspeção interna da cavidade oral. Nesta última inspeção deve-se iniciar pela observação da forma e simetria dos incisivos, por exemplo se braquignatismo ou prognatismo, e seguidamente colocação do abre bocas para analisar estruturas mais internas.

O conhecimento da estimativa da idade dos equinos através do exame da dentição poderá ser útil em algumas situações. Realiza-se essencialmente através da observação dos dentes incisivos inferiores. Os parâmetros a avaliar são: erupção dos dentes temporários e permanentes, se estes atingem o nível da arcada, e a alteração da mesa dentária, por observação do esmalte central, estrela dentária e forma da mesa dentária. Também pode ser estimada pelo perfil do ângulo de oclusão das duas arcadas (Silva *et al.* 2003) (Anexo 7).

Antes da colocação do abre bocas, o cavalo era sempre devidamente sedado. Foram realizados dois tipos de sedação, a associação de Butorfanol 0,025mg/kg IV (Butomidor® 10mg/mL) com Detomidina 0,012 mg/kg IV (Domidine® 10 mg/mL) ou Xilazina 0,5-0,75 mg/kg IV.

Na inspeção da cavidade oral foi usado o abre bocas completo, fonte de luz e seringa de lavagem para limpeza e desobstrução e melhor visualização de toda a cavidade. Deve-se avaliar os pré-molares e molares quanto ao tamanho, forma, simetria, presença de pontas, ganchos, tártaro ou cáries, se presença de dentes decíduos ou “dente

de lobo”, e inspeção da mucosa oral e língua quanto à presença de feridas e cicatrizes e da gengiva quanto à presença de lesões periodontais.

Como os dentes dos cavalos sofrem contínua erupção, a malformação da mandíbula e maxila, ou ausência de dentes no maxilar contrário podem resultar numa variedade de distúrbios e complicações dentárias, entre as quais, presença de rampas, ganchos, ondas, pontas excessivas de esmalte e arcadas assimétricas. Por exemplo, as pontas excessivas ocorrem devido ao facto da superfície dos molares superiores ser mais larga que a dos molares inferiores, os dentes não coaptam na perfeição e a mesa dentária não tem desgaste nivelado. As rampas e os ganchos são o resultado do desgaste indevido dos dentes terminais da arcada em animais com braquignatismo e prognatismo.

A manutenção dentária consistiu na correção da mesa dentária de rotina, com o recurso de limas manuais ou elétricas, removendo as pontas afiadas e planificando as superfícies oclusas de ambas as arcadas. A lima elétrica requer precauções adicionais no sentido de controlar o tempo de contato com os dentes, uma vez que, a sua ação é bastante rápida e agressiva, podendo resultar numa imagem desigual.

## **6 – LESÕES TRAUMÁTICAS**

Durante o estágio observou-se algumas lesões provocadas por trauma físico. Ao todo, a estagiária participou no exame e tratamento de 9 lesões traumáticas, a maioria deles com ferimentos nos membros. Para cada caso estabeleceu-se uma forma diferente de atuação, segundo a história do trauma, incluindo há quanto tempo foi a lesão, se animal se encontrava vacinado contra tétano, a observação e avaliação pormenorizada da ferida, como o tamanho e a profundidade, quais as estruturas envolvidas, se perto de alguma articulação ou estrutura tendinosa e se o cavalo claudicava.

O clínico deve ter um bom conhecimento dos mecanismos celulares durante a cicatrização para melhor planificação da terapia. As fases de cicatrização consistem em fase inflamatória (libertação de catecolaminas e mediadores inflamatórios, e migração de leucócitos, esta fase dura cerca de 6 horas), fase de desbridamento (mecanismos de fagocitose, inicia-se 12 horas após o trauma), fase de reparação (em que os fibroblastos sintetizam o colagénio, formação de tecido de granulação e fibroso), fase de contração (aproximação do bordos, mais pronunciada nos tecidos moles de boa vascularização), e

fase de maturação (recuperação das características normais pelo alinhamento longitudinal do colagénio ao longo das linhas de tensão) (Várquez 2000).

As primeiras intervenções em qualquer ferida foram muito semelhantes, a sedação, quando necessário, por administração de  $\alpha 2$ -agonistas (xilazina, detomidina) ou combinação de  $\alpha 2$ -agonistas e opioides, que proporcionou conforto ao paciente e melhor avaliação das feridas. A limpeza da ferida e dos bordos da ferida, na tentativa de reduzir a contaminação, com água e clorhexidina diluída. Autores afirmam que a apresentação comercial de iodina povidona (10%) ou clorhexidina (2%) não devem ser utilizadas pois são tóxicos para a migração de leucócitos e proliferação de fibroblastos na ferida, inibindo a cicatrização. Várquez (2000) afirma estar contraindicado o uso de soluções com concentração superior a 0,2% de iodina povidina e 0,005% de clorhexidina. A vantagem das soluções comerciais antisépticas é a sua ação antibacterianas. Desta forma, o autor sugere que a melhor maneira de lavar a ferida é com água à pressão, ou usar NaCl ou lactato de ringer à pressão com uma seringa e agulha. Feridas de maiores dimensões, profundas, mais contaminadas, ou que envolvam estruturas sinoviais beneficiam com um tratamento mais agressivo, que inclui uso de antibacterianos e lavagens sinoviais (Lottlewood e Heidman 2006).

Devemos ter em atenção que as condições de higiene e disponibilidade do proprietário são fatores muito importantes para a evolução da ferida, fatores estes que nem sempre estavam disponíveis.

O tempo foi crucial para o tratamento das feridas, se a ferida aconteceu há pouco tempo temos um maior controlo da evolução da ferida e melhor prognóstico. Como aconteceu no caso de uma égua Lusitana de 6 anos de idade, com trauma no chanfro. A médica veterinária deu assistência a esta égua nos primeiros 30 minutos após o trauma. A ferida abrangia uma grande área do chanfro, apresentava-se pouco contaminada, sem hemorragia excessiva, tinha afluxo sanguíneo local assegurado com uma boa coaptação dos bordos da ferida (figura 29a). Os sinais da ferida agruparam as condições necessárias para o plano terapêutico de cicatrização por 1<sup>a</sup> intenção, ou seja, procedeu-se à sutura dos bordos da ferida. Para tal, procedeu-se à anestesia local dos bordos da ferida com lidocaína (figura 29b), e para o reposicionamento dos bordos foi utilizado fio de sutura não-absorvível, monofilamento, com padrão simples contínuo pois não houve necessidade de exercer pressão excessiva (figura 29c). Passado 1 semana a sutura estava limpa, seca e em ótimas condições (figura 29d).

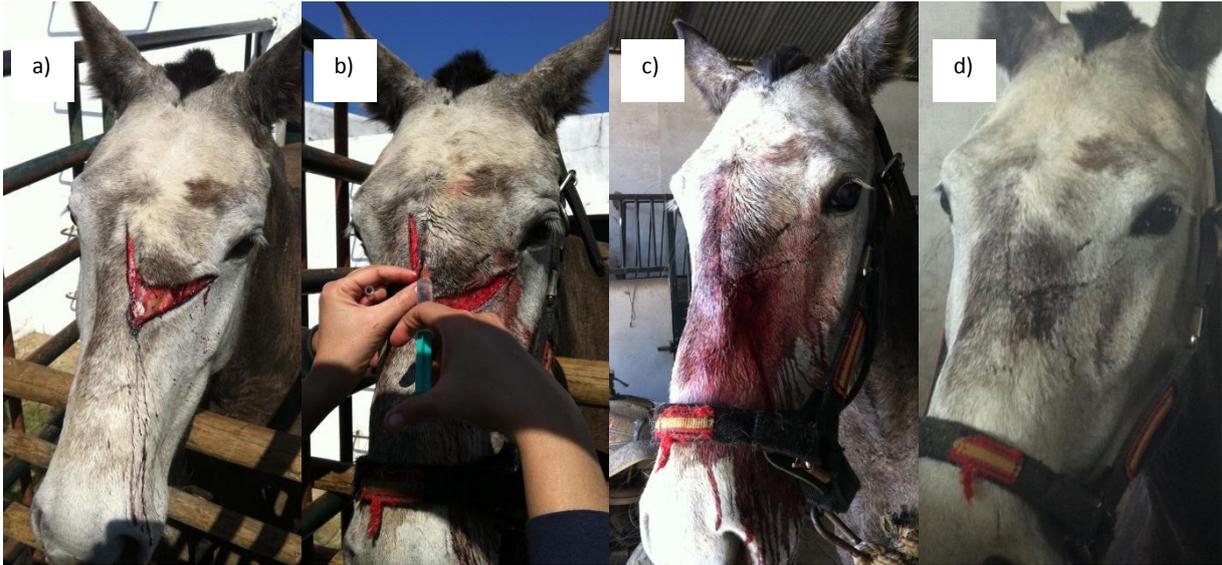


Figura 29 - Égua Lusitana com ferida no chanfro. a) Ferida no chanfro; b) anestesia local com lidocaina; c) no final da sutura; d) evolução 1 semana depois.

Um outro caso clínico, ocorreu numa égua mais velha, de 20 anos de idade, com ferida aberta no membro anterior direito na fase dorsal da canela. A primeira intervenção médica foi no próprio dia do trauma, a lesão encontrava-se pouco contaminada, bordos irregulares e separados, pelo que se optou por cicatrização por 2ª intenção. Após limpeza da ferida, foi aplicado a pomada Nitrofuril, derivado do Nitrofurano, (Furacin® 2mg/g), que tem atividade anti-séptica e desinfetante e ação antibacteriana. Somente um mês depois o proprietário da égua afirma que a ferida não se encontra em boas condições, ao visualizar a ferida observou-se proliferação excessiva de tecido de granulação (figura 30a). Nestes casos, o tratamento de eleição é a excisão cirúrgica, contudo, não foi o tratamento seleccionado. Desta forma, o tratamento consistiu na aplicação de pensos compressivos diários, com algodão embebido em água com sal na tentativa de humedecer a crosta. Iniciou-se tratamento antibacteriano com sulfadiazina 250g e trimetoprim 50g (Maternix cotrisul®) oral BID, durante 6 dias, e anti-inflamatório (flunixin meglumina oral, BID). Onze dias depois, a maior parte do excessivo tecido de granulação desapareceu, e a ferida estava infetada, com presença de pús (figura 30b). Como qualquer ferida crónica é necessário desbridar frequentemente, para remover tecido necrótico e tecido de granulação exuberante e estimular sangramento e inflamação antes da cicatrização por 2ª intenção (Lottlewood e Heidman 2006). Desta vez, na tentativa de eliminar o exsudado aplicou-se um penso absorvível, Aminimalintex®, e a envolver um penso compressivo. O Aminimalintex® tem na sua

constituição tragacanth (6,02g) e ácido bórico (2,08g), que lhe proporciona a capacidade de reduzir a infeção e promover a cicatrização, quando ativado pela água; trata feridas infetadas, abscessos e redução da inflamação, o algodão absorve e detém o pus e secreções infecciosas e protege a ferida, ainda impede a contaminação externa e mantém a humidade e calor para uma cicatrização mais rápida (Vetpro 2008). Estes pensos devem ser mudados todos os dias, até controlo da infeção.

Embora muitas lacerações possam beneficiar da administração de AB de rotina (trimetoprim-sulfadiazina 30mg/kg PO BID ou procaína benzilpenicilina 22.000 IU/kg IM BID), feridas contaminadas ou crónicas podem necessitar de medicação mais agressiva (Lottlewood e Heidman 2006). Desta forma, procedeu-se à administração de um AB sistémico com maior espectro de ação, as cefalosporinas de 4<sup>o</sup> geração, cefquinoma 1mg/kg (Ceffect® 25 mg/mL) 20 mL SID IV durante 5 dias.

Depois de controlada a infeção da ferida (figura 30c), continuou-se a fazer pensos compressivos mas desta vez com aplicação de pomada Omnimatrix®, creme promotor de cicatrização da pele que favorece a re-epitelização e a formação da matriz de colagénio da ferida num ambiente anti-séptico.



Figura 30 - Égua com lesão no membro anterior direito; a) proliferação de tecido de granulação, b) ferida infectada com pús, c) ferida livre de infeção.

É importante destacar que as feridas traumáticas devem proporcionar bastante atenção do médico veterinário devido à sua diversidade e diferente resposta de cicatrização entre cavalos. Principalmente em casos crónicos, a flexibilidade e disponibilidade financeira por parte do proprietário são fundamentais no progresso da ferida devido ao constante gasto de equipamento médico (pensos, ligaduras, algodão, etc.).

## 7 - DERMATOLOGIA

O sistema dermatológico foi muito pouco representativo durante o estágio, houve dois casos, e ambos idênticos. As éguas, de 21 e 4 anos, apresentaram lesões dermatológicas na região do dorso e pescoço, as lesões eram exsudativas com formação de grupos ovóides de pêlos que sobressaem em conjunto (“efeito pincel”), e por baixo observava-se crostas, e áreas ovóides de erosão e ulceração, sem



Figura 31 - Dermatofilose. Observação de crostas e “efeito pincel”.

prurido (figura 31). Suspeitou-se de dermatofilose, uma dermatite infecciosa causada pela *Dermatophylus congolensis* (bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa actinomicete). Os fatores que predisõem para o seu desenvolvimento são: danos na pele (mosquitos, artrópodes, maceração e outras doenças inflamatórias da pele), humidade provocada por chuva intensa, banhos ou suor dos cobertores e arreios, temperatura ambiente, humidade relativamente alta, pobre nutrição e/ou higiene e *stress* (Scott e Miller 2011). Como eram éguas que se encontravam sempre em *paddock*, passaram a ser recolhidas para instalações internas em dias de chuva. Desta forma, a terapia consistiu em manter o cavalo seco e na remoção das crostas e tratamento tópico com banhos de solução iodada em espuma (Betadine®) até observação de melhoria. A égua de 4 anos encontrava-se mais debilitada e edemaciada pelo que se optou pela administrada sistemicamente penicilina 20 mL BID (Depocilin® 300.000UI). Ambas as éguas, em menos de 1 mês apresentaram melhorias significativas.

Os diagnósticos diferenciais incluem: dermatofitose, foliculite por *staphilococcus*, demodicose, pemphigus foliaceus, foliculite eosinofílica estéril. O diagnóstico definitivo é baseado na citologia, biópsia e cultura (Scott e Miller 2011), contudo, como ambas as éguas após o tratamento melhoraram não houve necessidade de realização de qualquer teste adicional.

## 8 - OFTALMOLOGIA

Os dois casos clínicos oftalmológicos que surgiram durante o estágio foram úlceras da córnea. As úlceras da córnea são defeitos do epitélio corneal que podem envolver o estroma (se superficial), membrana de Descemet e endotélio (se profunda). A maior parte das úlceras estão associados a traumas (Willians e Miller 2006).

Os sinais clínicos apresentados pelas éguas foram blefarospasmo, lacrimejamento, fotofobia, dor ocular e defeito da córnea. Para o diagnóstico procedeu-se à aplicação tópica do teste de corante de fluoresceína, este corante irá corar a parte do estroma exposto da córnea. Observou-se, em ambos os casos, uma pequena área corada que representa a úlcera córnea superficial.

O risco de infeções bacterianas e/ou fúngicas é elevado em úlceras da córnea. As bactérias mais comuns são *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* e *Streptococcus* spp., e os fungos são *Aspergillus* e *Fusarium* spp.. Desta forma, o tratamento baseou-se na aplicação tópica de AB, cloranfenicol em pomada tópica (Clorocil® 10 mg/g) 3 vezes ao dia. E procedeu-se à administração sistémica de anti-inflamatórios não esteróides, de flunixinina meglumina 10 mL IV (Finadyne® 50mg/mL). Em poucos dias, observou-se melhoria do quadro clínico e posterior desaparecimento da úlcera ocular. A bibliografia aconselha também o uso tópico de atropina, sendo eficaz para estabilizar a dor decorrente do espasmo do músculo ciliar e dilatar a pupila (Willians e Miller 2006).

### ***III - Reprodução no Cio do Poldro***

#### **1 - INTRODUÇÃO**

A égua é o único animal doméstico de grande porte capaz de iniciar uma nova gestação num curto espaço de tempo após o parto. A reprodução no primeiro cio pós-parto (designado como “cio do poldro”) é uma das práticas da reprodução equina assistida que tem vindo a ser debatida sobre a vantagem da sua utilização, pois existem ideias controversas em relação à sua taxa de sucesso. As vantagens da reprodução no cio do poldro quer seja para inseminação artificial quer seja para monta natural baseiam-se não só na tentativa de evitar o atraso da data de nascimento do próximo ano proporcionando assim o nascimento na época de maiores recursos (primavera), como também devido a aspetos económicos: a produção anual de um poldro, e a data de nascimento oficial dos poldros ser 1 de janeiro, o que leva os proprietários a desejar o nascimento no início do ano. Como tal, este tema tem sido sujeito a extensa pesquisa e investigação científica.

Nas éguas, o primeiro cio pós-parto inicia-se rapidamente logo após o parto, normalmente começa nos 5 a 12 dias seguintes, a maior parte ovula nos primeiros 20 dias (Loy 1980, Nagy *et al.* 1998, Panasophonkul *et al.* 2007, Blanchard *et al.* 2012 e Aoki *et al.* 2013). Como a gestação da égua em média varia de 338 a 340 dias (podendo variar entre 310-374), há a possibilidade de produzir um poldro por ano, se o intervalo parto-conceção não exceder um mês, conseguindo-se assim uma produção anual (Macpherson e Blanchard 2005, Sharma *et al.* 2010, Blanchard *et al.* 2012). Se não se aproveitar este período é impossível assegurar um intervalo entre partos de 365 dias.

As principais desvantagens da reprodução no cio do poldro em relação aos cios subsequentes são: menor taxa de gestação e maior taxa de reabsorção embrionária, devido à falha da involução uterina completa (Loy 1980, Blanchard *et al.* 2004, Macpherson e Blanchard 2005, Sharma *et al.* 2010 e Blanchard *et al.* 2012).

A involução uterina e a atividade folicular são essenciais para o sucesso da reprodução no cio do poldro, a fim de retirar o melhor proveito e êxito, o seu conhecimento é deveras importante. Vários métodos como exames bacteriológicos, citológicos, histopatológicos, palpação e ecografia por via transretal têm vindo a ser usados para avaliar/estudar estes processos.

## 2 - ANATOMIA E HISTOLOGIA DO ÚTERO DA ÉGUA

O útero é composto por dois cornos e corpo uterino e uma cérvix. Ambas as margens uterinas são unidas à parede pélvica e abdominal pelo ligamento largo (Hafez e Hafez 2004a). A porção do ligamento largo que se liga ao útero é designada mesométrio. Este liga-se à superfície dorsal do corno e segue pela fase lateral do corpo e cérvix.

O lúmen do útero é praticamente obliterado pela sua parede colapsada com 12 a 15 pregas longitudinais de endométrio, castanhas avermelhadas com tecido conectivo colagénio (Kainer 2011).

Histologicamente a parede uterina é formada por três camadas, do interior para o exterior: o endométrio, o miométrio e o perimétrio (figura 32).

No endométrio, o revestimento epitelial é epitélio simples colunar (pseudoestratificado durante o estro) com células cubóides, dependendo a fase do ciclo éstrico. A lâmina própria é uma camada profunda, que consiste em tecido conjuntivo vascular laxo, com presença de neutrófilos e linfócitos (Kainer 2011). As glândulas endometriais são estruturas tubulares ramificadas e espiraladas, revestidas por epitélio colunar. Localizam-se na lâmina própria e túnica submucosa e abrem-se na superfície do endométrio. Durante o cio, as glândulas apresentam-se relativamente retas, estas crescem e tornam-se mais espiraladas e complexas à medida que aumenta o nível de progesterona produzido pelo CL em desenvolvimento. E regridem no início da regressão luteínica (Hafez e Hafez 2004b).

O miométrio é constituído por músculo liso e é composto por uma camada circular interna, camada vascular medial, e camada longitudinal externa. O miométrio é muito espesso e é responsável pela variação no tónus uterino da égua durante o estro e o diestro ou início da gestação (Kainer 2011).

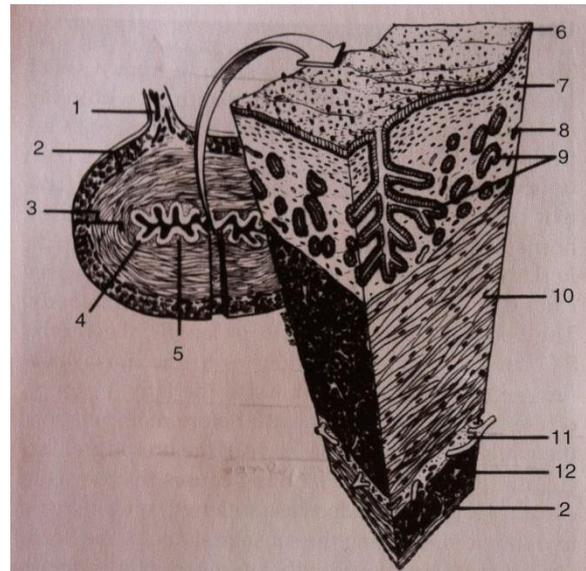


Figura 32 - Corte transversal do corno uterino (Kainer 2011). 1. mesométrio; 2. perimétrio; 3. miométrio; 4. endométrio; 5. tecido colagénio conectivo; 6. superfície epitelial; 7. camada compacta da lâmina própria; 8. camada esponjosa da lâmina própria; 9. Glândulas endometrial; 10. camada circular interna do miométrio; 11. camada média vascular do miométrio; 12. camada externa longitudinal do miométrio.

O perimétrio é a túnica serosa do útero, tem composição típica de tecido conjuntivo laxo, contem um grande número de vasos linfáticos e é contínua com o ligamento largo do útero.

Com a progressão da gestação, há alargamento do corno, em seguida alargamento do corpo, e finalmente do corno contralateral acompanhando o crescimento do feto. Mas o miométrio permanece quiescente, impedindo a expulsão prematura do feto (Hafez e Hafez 2004a). O endométrio torna-se mais espesso e mais vascularizado durante a formação do saco vitelínio placentar, e em seguida, propaga-se e forma-se a placenta difusa, epitéliocorial e microcotiledonar da égua (Kainer 2011).

O contacto normal da superfície materna à membrana alantocóricionica tem uma distribuição uniforme de microvilosidades que se assemelham a uma superfície de veludo vermelho. As microvilosidades do córion formam microcotilédones que se ligam às criptas maternas. Por sua vez, o microplacentoma da placenta é composto pelo cotilédones fetais e carúnculas maternas. As criptas e microcarúnculas das éguas estão localizadas no endométrio (Kainer 2011).

### **3 - INVOLUÇÃO UTERINA**

A involução uterina consiste num complexo de eventos que permitem a restauração do útero após o parto. É de destacar que nos equinos é um processo bastante eficiente e rápido, permitindo a égua parir um poldro de 50kg e estar preparada para receber um novo embrião após duas semanas. A combinação da placenta microcotiledonar e o potencial da fertilidade do cio do poldro torna possível a égua produzir um poldro por ano.

Os diversos fatores relacionados com o sucesso da involução uterina são: remodelação tecidual (alteração da superfície endometrial), contração uterina, redução do tamanho uterino, expulsão de fluidos e restabelecimento do ambiente luminal favorável a uma nova conceção (Griffin e Ginther 1991, Macpherson e Blanchard 2005).

A involução uterina considera-se funcional no 7º dia pós-parto e, em torno do 14º dia o endométrio tem aparência histológica de um útero normal pré-gravítico (Gygax *et al.* 1979, Stanton 2011).

As membranas fetais, normalmente, são expelidas aproximadamente 60 minutos depois do parto. Num parto normal, as vilosidades da membrana epitéliocorial da

placenta separam-se ordenadamente das criptas maternas levando a uma remodelação mínima endometrial após a expulsão da placenta (Gygax *et al.* 1979 e Stanton 2011).

Logo após o parto a superfície do endométrio contem microcarúnculas ordenadas presentes na camada compacta da lâmina basal, e a camada esponjosa da lâmina basal está edematosa e contem glândulas endometriais dilatadas (Gomez *et al.* 1995 e Jischa *et al.* 2008). No 1º dia pós-parto iniciam-se rapidamente alterações degenerativas das microcarúnculas e glândulas endometriais (Gomez *et al.* 1995). Através de biópsias uterina, Jischa *et al.* (2008) detetaram no dia 1 pós-parto largo número de neutrófilos na camada compacta da lâmina basal, e sua ausência no dia 9, indicativo de um processo agudo na tentativa de eliminar os restos células e bactérias ascendentes no útero durante o parto. Nesta altura, as microcarúnculas iniciam o processo de apoptose.

Steiger (2002) afirma que no dia 3 pós-parto à evidência de elevada expressão citoqueratina nas células epiteliais das microcarúnculas, a descamação destas inicia-se pela periferia. Em partos normais, a lâmina própria do endométrio está espessada depois do parto devido à hipoxia celular causada pela isquemia das microcarúnculas. Nesta altura, inicia-se a proliferação de macrófagos e alguns siderófagos na periferia das microcarúnculas. Na 2ª semana, há evidente proliferação celular, e os linfócitos tornam-se as células inflamatórias predominantes. Por volta do dia 6, os corpos apoptóticos (fragmentos celulares das microcarúnculas) são fagocitados, e as células epiteliais das microcarúnculas desaparecem (Steiger 2002). Gygax *et al.* (1979) afirmam que, histologicamente, as microcarúnculas estão completamente reabsorvidas no 7º dia pós-parto, e Steiger *et al.* (2002) afirmaram que a involução das microcarúnculas só está completa ao 9º dia pós-parto.

No dia 16, ainda permanecem linfócitos e macrófagos na camada esponjosa e compacta da lâmina própria (Jischa *et al.* 2008). Siderófagos e células mononucleadas estão presentes em grande quantidade no pós-parto, e frequentemente persistem até 7 meses ou mais (Stanton 2011). Assim, siderófagos endometriais não são considerados patológicos no pós-parto (Macpherson e Blanchard 2005). Gygax *et al.* (1979) afirmaram que até ao 32º dia podem-se notar processos inflamatórios uterinos.

As glândulas endometriais, proeminentes na gestação, são bastante dilatadas no 1º dia pós-parto (Jischa *et al.* 2008). No dia 3 apresentam ligeira expressão citoqueratina, no dia 6 tem involução completa (com forma alongada), e no dia 9 inicia

a proliferação, semelhante ao que acontece no estro, com reaparecimento moderado a alto da expressão citoqueratina (Steiger *et al.* 2002).

O endométrio aparece, histologicamente, normal ao 14º dia pós-parto com presença de siderócitos e alterações inflamatórias esporádicas. Jischa *et al.* (2008) afirmam que as alterações histológica ocorrem antes da 1º ovulação.

Os recetores de progesterona e estrogénio são mínimos no dia 1, indicando que o endométrio pode não ser capaz de responder as hormonas esteróides. Poucos dias depois, há aumento destes recetores, e desta forma, o endométrio tem capacidade de responder ao estrogénio durante o estro, e à progesterona na fase luteal.

Steiger *et al.* (2002) estudaram a diferença da involução uterina seguida de partos normais ou com problemas no periparto (retenção das membranas fetais, distócia e nascimento prematuro). Observaram que no dia 9 ainda havia assimetria dos cornos uterinos em 57,1% das éguas com distócias e 42,9% das éguas com retenção de placenta. Conclui que, os métodos clínicos não são suficientes para avaliar a involução uterina, e as biópsias uterinas são importantes para determinar as condições endócrinas. A biópsia deve ser realizada em éguas com problemas no periparto, para juntamente com o exame clinico avaliar a probabilidade de sucesso de inseminação no cio do poldro.

### 3.1 Alterações morfológicas durante a involução uterina

O exame ecográfico do útero por via transretal é um dos métodos de diagnóstico mais simples e práticos para avaliar as alterações uterinas severas que ocorrem durante a involução.

Presume-se que o aumento da contração uterina contribui para a redução do tamanho uterino e evacuação do conteúdo intrauterino pós-parto, contudo o grau de importância é desconhecida (Stanton 2011). Griffin e Ginther (1991) estudaram as alterações uterinas, por palpação e ecografia por via transretal, a partir do

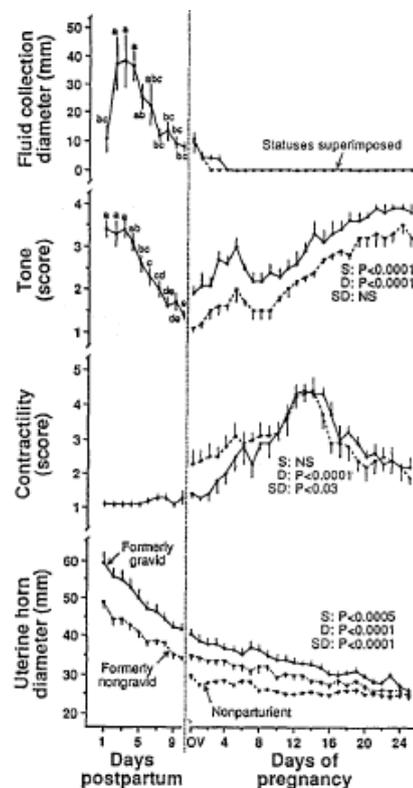


Gráfico 1 – Medição do tónus, contração e diâmetro do corno uterino e acumulação do fluido no período pós-parto (Griffin e Ginther 1991)

1º dia pós-parto até aos primeiros dias da gestação seguinte, e detetaram mínima atividade contractilidade no corpo uterina entre o 1º dia pós-parto e a primeira ovulação (gráfico 1), desta forma, concluíram que a contração uterina tem uma mínima relação com a involução uterina e evacuação do conteúdo uterino. Contudo, questionaram a possibilidade de existir episódios abruptos de contração não registados.

Um outro parâmetro a avaliar é o padrão de ecogenicidade e regularidade, estes diminuem ao longo dos dias após o parto (figura 33). Deve-se ter em conta que ar no útero poderá ser normal, devido à dilatação da cérvix após o parto. A intensidade destes padrões assume o atraso da involução uterina (Griffin e Ginther 1991).

No início do período pós-parto ocorre uma rápida redução do comprimento e diâmetro uterino. Doze horas após a expulsão do feto, o corno gestante apresenta apenas 1,5 vezes o tamanho do não-gestante (Blanchard e Varner 1993 referido por Carvalho *et al.* 2001). A velocidade de involução uterina é superior entre o 1º e 10º dia pós-parto (1,8 mm/dia) diminuindo de seguida (0,4 mm/dia) (gráfico 1) (Griffin e Ginther 1991). O diâmetro uterino alcança o tamanho pré-gravítico em média 23 dias após o parto (McKinnon *et al.* 1988). Griffin e Ginther (1991) detetaram 27 dias para o corno não gravítico e 31 para o corno gravítico (figura 33).

O fluido intrauterino aumenta consideravelmente entre o dia 1 e 2 pós-parto, isto sugere que a acumulação de fluido não provém do fluido residual da placenta mas do desenvolvimento associado à involução (Griffin e Ginther 1991). Depois diminui progressivamente com a diminuição do tónus e tamanho uterino. As características ecogénicas do fluido pós-parto variam com a celularidade e conteúdo mucoso, o aumento da ecogenicidade deste está associado com o aumento de células inflamatórias e restos celulares. Mckinnon *et al.* (1988) reportam que a ecogenicidade do fluido diminui com a progressão normal da involução, enquanto Griffin e Ginther (1991)

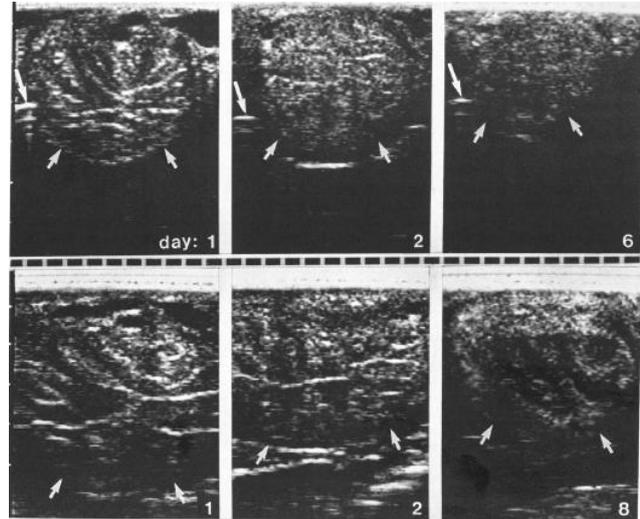


Figura 33 - Imagem ecográfica do corno uterino não gravítico (imagens a cima) e do corno uterino não gravítico (imagens a baixo). O número em baixo há direita corresponde ao dia após o parto. As setas curtas correspondem a fase ventral do corno uterino, notar a diminuição do tamanho no corno gravítico. Observa-se um padrão mais ecogénico no dia 1 e diminuição para o dia 2. No dia 8 a água já está a iniciar o primeiro cio pós-parto (Griffin e Ginther 1991).

reportam que o fluido intrauterino é minimamente ecogénico com pequenas alterações de ecogenicidade ao longo do tempo. O conteúdo intrauterino deve diminuir por volta do 5º dia, ser mínimos ao 10º dia e indetectáveis no 15º dia pós-parto (Griffin e Ginther 1991). Éguas confinadas durante o período pós-parto podem preservar o fluido intrauterino mais tempo do que éguas exercitadas (Macpherson e Blanchard 2005).

Os conteúdos luminais (lóquios) são descarregados do útero pela cérvix durante a involução uterina. O fechamento da cérvix é dependente da progesterona, esta é só segregada após a formação do corpo lúteo, ou seja, depois da primeira ovulação pós-parto. A descarga loquial é detetada na vulva como um exsudado entre o 3º e 6º dia pós-parto. A cor dos lóquios inicialmente vermelhos do sangue passa a castanho mucoso, mas por vezes, a amarelado quando são mucopurulentos. O lóquio normal é inodoro, e é facilmente distinguível de alterações fétidas uterinas de éguas com metrites agudas (Stanton 2011).

O exercício provavelmente contribui para a involução uterina, o diâmetro do corno gravítico diminui mais rapidamente em éguas no pasto do que em éguas estabuladas (Macpherson e Blanchard 2005).

Éguas mais velhas têm involução uterina pós-parto mais demorada do que éguas mais jovens (Morel *et al.* 2009). Também tende a ser mais rápida nas éguas que exibem cio logo após o parto do que nas éguas que apresentam falha na atividade ovárica e entram em anestro de lactação, porque os estrogénios aumentam a atividade miometrial e sucessivamente este está aumentado durante o estro (Gygax *et al.* 1979).

O útero é geralmente contaminado por bactérias, particularmente quando há assistência ao parto. O útero é desenhado para eliminar as bactérias através de contrações associadas que movem os restos celulares caudalmente até à cérvix. As espécies de bactérias encontradas na cultura no cio do poldro incluem: *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Corynebacterium* spp., *Pasteurella* spp., *Bacillus* spp., *Proteus* spp. (Stanton 2011). As bactérias mais frequentemente isoladas no útero são *Streptococcus* β-hemolítico e *E.coli.*, embora infeções mistas também sejam comuns (Baranski *et al.* 2003 e Stanton 2011).

As culturas uterinas podem revelar resultados citológicos positivos da inflamação ou serem indicativas de contaminação sem patologia específica. Cerca de 20 a 30% das culturas feitas no cio do poldro são positivas. Baranski (2003) teve uma alta

taxa (66,2%) de culturas positivas mas afirma ter usado éguas com más condições ambientais e baixa resistência sistémica.

### **3.2 Controlo hormonal do cio do poldro e involução uterina**

Acredita-se que a atividade hormonal interfere com a involução uterina, mais propriamente na contractilidade, contudo ainda não está bem explicada (Blanchard e Macpherson 2011).

As hormonas esteróides e as gonadotrofinas no cio do poldro têm secreção semelhante em comparação a outros ciclos éstricos (Macpherson e Blanchard 2005). Loy (1980) afirmou que hormonas ováricas não são necessárias ou têm somente um efeito mínimo na involução uterina. Facto que confirma esta afirmação é que a concentração de estradiol e progesterona são baixas entre o parto e o cio do poldro e por outro lado, as éguas ovariectomizadas não têm alterações histológicas, bacteriológicas e morfológicas na involução uterina (Griffin e Ginther 1991).

Gunduz *et al.* (2008a) detetaram por análises diárias que no dia do parto, a média da concentração de progesterona é de 2,8 ng/mL, e depois diminui para menos de 1ng/mL nos 4 dias seguintes. Os níveis de progesterona permanecem na média de 1ng/mL ou menos até á ovulação, aumentando posteriormente no final do cio do poldro (Stanton 2011).

Os estrogénios no cio do poldro comportam-se de maneira semelhante aos cios subsequentes. Gunduz *et al.* (2008a) estudaram a concentração de estradiol logo após o parto e detetaram que a concentração de estradiol diminui do primeiro (420pg/mL) até ao 4º dia pós-parto (<300pg/mL). Há aumento de estradio-17 $\beta$  a partir do 5º dia pós-parto (7pg/mL) coincidindo com o início do cio do poldro, ou seja, crescimento folicular. Alcança o pico 2 dias antes da ovulação (10pg/mL) e depois diminui gradualmente (Panasophonkul *et al.* 2007 e Abo El-Maaty e Gabr 2010). Os recetores de estrogénio e de progesterona nas células do epitélio glandular diminuem do 3º ao 6º dia pós-parto, e aumentam do 6º ao 9º (Steiger *et al.* 2001). A proliferação celular durante a 2ª semana e o aumento da expressão dos recetores de estrogénio permitem ao endométrio responder ao estrogénio durante o cio do poldro, e subsequentemente no diestro o endométrio é capaz de responder à progesterona (Jischa *et al.* 2008).

Desconhece-se se a oxitocina e a prostaglandina desempenham algum papel fundamental na contração e involução uterina no cio do poldro. A concentração de

oxitocina apresenta oscilações depois do parto, e nenhuma relação tem sido encontrada entre a concentração metabólica de prostaglandina periférica e a involução uterina (Stanton 2011). Gunduz *et al.* (2008b) pela administração exógena de oxitocina e PGF<sub>2α</sub> não obtiveram diferença na involução uterina comparada com éguas não tratadas.

## **4 - CARACTERÍSTICAS DO CIO DO POLDRO**

### **4.1 Intervalo Parto - Cio do poldro**

Como visto anteriormente, o cio do poldro inicia 5 a 12 dias após o parto, e a maior parte ovula dentro de 20 dias pós-parto. Contudo a média do dia da ovulação (considerando o dia do parto dia 0) varia consideravelmente entre autores. Num estudo com éguas “Quarto de Milhas” mantidas em pasto, a média do dia da ovulação pós-parto foi de 13 dias, com 50% das éguas a ovularem entre o 11º e 16º dia pós-parto (Blanchard *et al.*, 2004). Winter *et al.* (2007), no Brasil, reportaram uma média de 14,2 dias, em éguas “Criollo”. Em éguas árabes, Gunduz *et al.* (2008a), obtiveram 14 dias pós-parto. Panasophonkul *et al.* (2007), com éguas nativas da Tailândia obtiveram 13,4 dias. Em estudos usando populações mistas, Loy (1980) 10,2 dias, Fiala *et al.* (2004) 10 dias e Carvalho *et al.* (2001) 16,15 dias. Outros autores, para estudarem o cio do poldro, basearam-se no intervalo parto-cobrição. Ishii *et al.* (2001) reportaram que das éguas que ovularam entre 8 e 21 dias pós-parto a média da última cobrição foi no 14º dia. Aoki *et al.* (2013) tiveram uma média de 10,6 dias de intervalo parto-acasalamento.

Esta diferença pode ser devida a fatores como diminuição da condição corporal durante o período de lactação e fotoperíodo que influenciam a atividade endócrina e sucessivamente a atividade ovárica no pós-parto (Nagy *et al.* 1998, Panasophonkul *et al.* 2007). O aumento gradual da condição corporal pode afetar a atividade ovárica durante o início do período pós-parto (Henneke *et al.* 1984 referido por Winter *et al.* 2007). Nagy *et al.* (1998) afirmam haver ligeira tendência para maior intervalo parto-ovulação em éguas que alteram a sua condição corporal.

O número de partos anteriores da égua (égua primípara ou múltípara) é um fator debatido pelos autores sobre a sua influência na atividade ovárica no cio do poldro. Devemos ter em conta que o fator idade está sempre relacionado a este, ou seja, éguas primíparas normalmente são mais jovens que éguas múltíparas. Nagy *et al.* (1998) e Sharma *et al.* (2010) afirmaram que éguas primíparas têm maior intervalo parto-

ovulação do que as éguas múltíparas. Os resultados do estudo de Sharma *et al.* (2010) demonstraram que houve um maior número de éguas primíparas (15,7%) que não entraram em cio dentro de 21 dias pós-parto do que éguas múltíparas (6,12%). O autor explica esta diferença pelo facto das éguas primíparas estarem mais stressadas a proteger o seu poldro do que as éguas múltíparas (Sharma *et al.* 2010). Pelo contrário, Fiala *et al.* (2004) afirma que éguas mais jovens (menos de 10 anos) ovulam frequentemente antes dos 10 dias.

Sharma *et al.* (2010) afirmaram que a atividade ovárica do cio do poldro não é afetada pelo ano de nascimento do poldro, nem pelo manejo básico no seu estudo da atividade ovárica no cio do poldro em condições subtropicais.

#### **4.2 Sazonalidade / Anestro pós-parto**

As éguas são poliéstricas sazonais, o fotoperíodo é o fator externo mais importante na sincronização da atividade reprodutiva dos equinos. A máxima atividade ovárica ocorre durante dias longos (primavera-verão) e mínima atividade durante dias curtos (Nagy *et al.* 2000). Desta forma, a data do parto (no início ou final da época reprodutiva) tem forte influência na atividade ovárica no pós-parto e comportamento sexual (Nagy *et al.* 1998).

O anestro pós-parto (também designado como “anestro de lactação”) ocorre quando as éguas não demonstram o cio do poldro. Neste período, as éguas podem estar sem atividade ovárica, ou apresentam folículos persistentes não-ovulatórios. A maior parte dos estudos, reportam que a maioria das éguas que têm um prolongado anestro pós-parto são as éguas que pariram no início da temporada (janeiro-março) (Loy 1980). Blanchard *et al.* (2004) afirmam que a incidência do anestro pós-parto (isto é, não ocorre ovulação até ao 30º dia pós-parto) é de 18,4% com incidência maior em éguas a parirem no início da temporada. Destas éguas 27% pariram em dezembro-janeiro, 23% em fevereiro, 14% em março, e 2,6% em abril. Nenhuma das éguas com parto em maio teve anestro pós-parto. A média da duração do anestro pós-parto também é maior em éguas que pariram em dezembro-janeiro (67 dias), do que em fevereiro (52 dias), março (45 dias) e abril (43 dias) (Blanchard *et al.* 2004). Nagy *et al.* (1998) reportaram que a primeira ovulação pós-parto ocorre em média 25,4 dias pós-parto em éguas que pariram antes de 21 de março, e 13,5 dias pós-parto em éguas que pariram depois de 21 de março. Conclui assim, que a diferente atividade ovárica no pós-parto no início da

temporada, está provavelmente relacionada com alterações sazonais. Num estudo sob condições subtropicais, obtiveram maior percentagem de éguas paridas em abril (97,37%) a demonstrarem atividade ovárica dentro de 21 dias, comparada com éguas paridas no mês de janeiro (83,61%) e fevereiro (88,49%) (Sharma *et al.* 2010). Éguas submetidas a luz artificial durante a última fase da gestação têm menores atrasos no ciclo éstrico pós-parto e menor incidência de anestro pós-parto (Hodge *et al.* (1982) referido por Macpherson e Blanchard 2005).

Sharma *et al.* (2010) estudaram a atividade folicular do cio do poldro em éguas Puro-sangue Inglês sob condições subtropicais, e concluíram que a atividade ovárica e ovulação pós-parto podem estar afetadas pelo clima subtropical em comparação com o clima temperado. As diferenças, acima mencionadas, reportadas entre raças provavelmente ocorrem devido às diversas condições ambientais mais do que pelas raças em si (Sharma *et al.* 2010).

## **5 - FERTILIDADE ASSOCIADA AO CIO DO POLDRO**

A taxa de gestação das éguas que se reproduzem no cio do poldro é em média de 10-20% mais baixa que em éguas reproduzidas nos cios seguintes (Ishii *et al.* 2001, Blanchard e Macpherson 2011 e Blanchard *et al.* 2012) a principal causa baseia-se no atraso da involução uterina e ambiente uterino inapropriado. Contudo, enquanto há autores que defendem haver diferente taxa de gestação do cio do poldro aos cios subsequentes, outros há, que não obtiveram nenhuma diferença significativa.

Os estudos de Fiala *et al.* (2004) reportam maiores taxas de gestação no 2º cio pós-parto comparativamente às observadas no cio do poldro (63,7% e 52,6% respetivamente). Por outro lado nos estudos de Loy (1980), Camillo *et al.* (1997) e Blanchard *et al.* (2004) reportam semelhantes taxas de gestação entre o cio do poldro e 2ºcio pós-parto.

Das éguas reproduzidas por monta natural: Aoki *et al.* (2013) obtiveram uma taxa de gestação no cio do poldro de 46,6%, Gunduz *et al.* (2008a), em éguas árabes obtiveram 66,7% e Ishii *et al.* (2001) obtiveram 60,2% de sucesso, e observou ainda que a taxa aumenta com aumento do intervalo parto-cobrição, e obteve piores resultados quando acasalavam 6 a 7 dias após o parto.

### 5.1 Fatores que afetam a fertilidade do cio do poldro

Existem vários fatores responsáveis pela baixa fertilidade do cio do poldro que devem ser avaliados e examinados, pois estes fatores são prós e contras que levam o clínico a optar pela reprodução do cio do poldro ou esperar pelos cios subsequentes. Os fatores mais relevantes são: tempo de involução uterina, intervalo parto-ovulação, idade das éguas, fluido intrauterino, condição corporal e principalmente a história clínica do parto, incluindo a expulsão dos invólucros fetais.

Alguns autores afirmam que baixa taxa de gestação no cio do poldro é mais provável quando a ovulação ocorre no início do período pós-parto (Loy 1980, Blanchard e Macpherson 2011 e Blanchard *et al.* 2012). Loy (1980) reporta maior taxa de gestação se a ovulação ocorrer depois dos 10 dias pós-parto e Blanchard *et al.* (2012) afirmam haver maior taxa de fertilidade com o aumento do período pós-parto, reportando que obteve melhor taxa depois do 22º dia.

A temporização dos eventos que ocorrem durante o período pós-ovulatório suporta este conceito. Se a ovulação e fertilização ocorrerem no 10º dia pós-parto, o embrião mover-se-á para o oviduto e entra no útero 5 a 6 dias depois da fertilização (Blanchard e Macpherson 2011), e chega ao lúmen do útero no 15º a 16º dia quando a involução do útero histologicamente está completa (Gygax *et al.* 1979), o fluido uterino já não é detetado ecograficamente (McKinnon *et al.* 1988) e a atividade secretória do útero é restaurada nesta fase (Macpherson e Blanchard 2005). Desta forma, o útero está preparado para aceitar o embrião. Pelo contrário, éguas que ovulam antes dos 10 dias, na altura em que o embrião entra no útero o endométrio não estará histologicamente normal ou preparado para nutrir o embrião. Assim, éguas que ovulam depois dos 10 dias têm maiores taxas de fertilidade (Blanchard e Macpherson 2011). Por outro lado, Blanchard *et al.* (2004) não obtiveram nenhuma relação entre o dia pós-parto e a fertilidade.

A taxa de fertilidade diminui com o aumento da idade das éguas (Carnevale e Ginther 1992, Blanchard *et al.* 2004 e Sharma *et al.* 2010), assim, à partida podemos afirmar, que a idade também é um dos fatores que afeta a taxa de gestação do cio do poldro. Blanchard *et al.* (2012) demonstraram que éguas com menos de 13 anos têm maior taxa de gestação, e esta diminui em éguas com mais de 18 anos. As causas responsáveis por este acontecimento são: o envelhecimento ovárico e uterino, acumulação de fluido intrauterino e maior reabsorção embrionária (Morel *et al.* 2009 e

Sharma *et al.* 2010). Devemos considerar que normalmente as éguas mais velhas são éguas que pariram mais vezes e portanto necessitam de maior tempo para a involução uterina pós-parto. Por outro lado, são éguas que têm maior incidência de fluido intrauterino, endometrites, quistos uterinos, inflamações crônicas e alterações hormonais, estas últimas por sua vez causam alterações fibróticas e menos glândulas endometriais (Carnevale e Ginther 1991). Contudo, há estudos que afirmam que a idade não afeta significativamente a taxa de fertilidade (Fiala *et al.* 2004).

A acumulação de fluido intrauterino durante a ovulação do cio do poldro tem efeito negativo na taxa de gestação de éguas reproduzidas durante este cio (McKinnon *et al.* 1988 e Blanchard *et al.* 2004). A presença de qualquer fluido na altura da inseminação tanto em éguas lactantes como em não lactantes reduz a taxa de gestação comparada com éguas sem fluido intrauterino. A presença de fluido intrauterino no cio do poldro é um bom indicador clínico que indica a não completa involução uterina e assim o útero ainda não está pronto para estabelecer uma nova concepção (Blanchard *et al.* 2004). Contudo, Malschitzky *et al.* (2002) afirmam o contrário, a presença de fluido intrauterino no cio do poldro não afeta a taxa de gestação.

As endometrites subclínicas também são responsáveis pelo fracasso da gestação no cio do poldro (Baranski *et al.* 2003).

Em condições subtropicais, a raça Puro-sangue Inglês obteve uma taxa de gestação de 53,76% no dia 16 pós-ovulação, este autor conclui que a performance reprodutiva no cio do poldro não é afetada pelos climas subtropicais (Sharma *et al.* 2010).

A má nutrição tem um impacto negativo na reprodução equina. No manejo de éguas reprodutoras deve-se ter em conta que a necessidade nutricional aumenta gradualmente com o desenvolvimento fetal e o final da gestação, e ainda é maior depois do parto devido ao início da lactação. A taxa de gestação é mais baixa em éguas que parem emaciadas do que éguas com boa condição corporal (Henneke *et al.* 1984 referido por Winter *et al.* 2007). Nagy *et al.* (1998) não encontraram nenhum efeito significativo na alteração da condição corporal, e concluiu que o manejo da condição corporal não é dos fatores mais importantes para a atividade ovárica no pós-parto. Num estudo recente, Aoki *et al.* (2013) não reportaram diferença significativa na condição corporal, sugerindo que o balanço energético total não afeta grandemente a fertilidade do cio do poldro. Porém este autor deparou-se com o fato de que os níveis de

triglicéridos, ureia e fosfato inorgânico no período pós-parto foram mais baixos em éguas que não ficaram gestantes, reproduzidas no cio do poldro após monta natural, demonstrando desequilíbrio nutricionais e metabólicos afetam a fertilidade no cio do poldro. Contudo, os mecanismos que levam estes fatores nutricionais a diminuir a performance reprodutiva mantem-se desconhecida.

Problemas no periparto (distócia, retenção placentária, nascimento prematuro) demonstram promoverem atraso na involução uterina e atraso do cio do poldro (Steiger *et al.* 2002). Éguas com distúrbios no periparto têm aumento de fluxo de neutrófilos, atraso na regeneração epitelial luminal e glandular e alteração dos recetores hormonais no endométrio em comparação com éguas que pariram normalmente (Steiger *et al.* 2001 e Macpherson e Blanchard 2005). Nas distócias a alteração da involução das microcarúnculas, devido à fadiga miometrial e hipóxia epitelial, pode contribuir para a diminuição da taxa de concepção (Steiger *et al.* 2001). O prolongado tempo de retenção das membranas fetais e *stress* causado por baixas temperaturas do inverno são fatores que promovem diminuição da taxa de gestação no cio do poldro. Estes dois fatores estão muitas vezes relacionados entre si durante os meses de janeiro e fevereiro, sugerindo assim que a temperatura baixa é um fator que leva a retenção das membranas fetais (Ishii *et al.* 2001). Desta forma, a história clínica no período do periparto influencia a decisão da reprodução no cio do poldro.

Abo El-Maaty *et al.* (2012) estudaram a importância do *stress* oxidativo na fertilidade do cio do poldro e concluiu que no cio do poldro as éguas estão sujeitas a *stress* oxidativo nos dias 8 e 9 pós-parto. Este *stress* é expressado pela diminuição de ácido ascórbico e zinco e aumento de peroxidase lipídica, mas éguas com suficiente capacidade antioxidante podem superar este *stress* e engravidar. Assim, o autor afirma, que algumas éguas necessitam de ser suplementadas (ácido ascórbico e zinco) durante o cio do poldro com antioxidantes para melhorar a sua imunidade e superar o desequilíbrio oxidante/antioxidante. Vickers *et al.* (2009) reportaram que éguas suplementadas com minerais (Zn, Mg e Cu) desenvolvem mais folículos e têm maior taxa de involução uterina.

## **6 - TAXA DE FERTILIDADE PARA DIFERENTES TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO (monta natural vs inseminação artificial) E TIPO DE SÉMEN (sémen refrigerado vs congelado)**

Quando se fala de taxa de gestação o garanhão não pode ser esquecido, pois a qualidade do sémen e tipo de inseminação também afeta a eficácia reprodutiva das fêmeas. Autores afirmam haver variedade na taxa de fertilidade em relação ao tipo de sémen utilizado. Mas, poucos estudos existem que relacionam o tipo de sémen e técnica de inseminação na taxa de fertilidade do cio do poldro. Squires *et al.* (2006a) reportaram que a taxa de gestação por ciclo foi maior com sémen fresco (60%), e semelhante com sémen refrigerado (44%) ou congelado (46%). Sieme *et al.* (2004a) investigaram a taxa de gestação em éguas inseminadas no cio do poldro em relação ao tipo de sémen (fresco ou congelado), a técnica de inseminação (inseminação no corpo uterino, profunda (intracorneal) e por histeroscopia) e características do sémen (dose, volume e concentração). Neste estudo, verificaram diminuição do número éguas gestantes reproduzidas no cio do poldro quando inseminadas com sémen fresco ou congelado em relação aos cios subsequentes (fresco 50% e 64,4%, respetivamente, e congelado 20% e 56,4%, respetivamente). Os autores concluíram que o tipo de sémen é um fator responsável na alteração da taxa de fertilidade nestas éguas, pois observa-se maior descida da percentagem quando inseminadas com sémen congelado. Contudo, nenhum efeito interativo esteve presente entre o cio do poldro e as características do sémen (dose, volume e concentração) e as técnicas de inseminação

A taxa de gestação das éguas reproduzidas por monta natural no cio do poldro é mais baixa (66%) do que por inseminação artificial (83%) (Blanchard *et al.* 2004). Mas, mantem-se desconhecida a razão pela qual a técnica de inseminação artificial melhora a taxa de fertilidade em relação à monta natural. Blanchard *et al.* (2004) afirmam que a reduzida contaminação por inseminação artificial não poderá ser a causa da melhora da taxa, porque descobriu que repetidas cobrições, que por si aumentam a contaminação uterina, não têm efeito adverso na gestação (Blanchard *et al.* 2004). Mais tarde, afirmou, que o reforço da monta até aumenta a taxa de gestação (Blanchard *et al.* 2012). Blanchard *et al.* (2004) recomendam para futuros estudos comparar a fertilidade do cio do poldro em relação ao número de EPZs e volume de ejaculado, podendo ser a causa da diferença da fertilidade entre monta natural e IA.

## 7 - REABSORÇÃO EMBRIONÁRIA NO CIO DO POLDRO

A fixação da vesícula embrionária ocorre em média no 16º dia pós-ovulação. Os mecanismos subjacentes à fixação envolvem a diminuição da mobilidade embrionária dentro do útero, que está afetada pelo seu próprio crescimento, aumento do tónus uterino e redução da contração uterina devida a redução da prostaglandina por parte do embrião (Sharma *et al.* 2009).

Um dos impactos negativos da reprodução no cio do poldro é a reabsorção embrionária precoce. Muitos fatores contribuem para tal: genéticos, ambientais e/ou endócrino (Newcombe 2000). É difícil diferenciar os efeitos do ambiente uterino pós-parto e outros efeitos como a lactação, nutrição e/ou idade. O *stress* é um dos fatores que causa reabsorção embrionária, pode ser devido à privação de água, hipertermia em infecções bacterianas agudas e cólicas severas ou prolongadas (Newcombe 2000). Fatores que alteram o ambiente uterino, como o atraso da involução uterino depois de distócias, a reprodução no cio do poldro, os quistos endometriais, a retenção de fluido uterino e as endometrites subclínicas são responsáveis pela perda de gestação (Newcombe 2000).

O aumento da perda de gestação tem sido mais observado em éguas reproduzidas no cio do poldro do que em cios subsequentes ou éguas não lactantes (Blanchard *et al.* 2012). Meyers *et al.* (1991) reportaram que éguas inseminadas no cio do poldro têm 1,9 vezes maior probabilidade de mortalidade embrionária precoce do que éguas que não são inseminadas neste cio. Um estudo recente reportou que há aumento da perda de gestação em éguas que se reproduzem antes do dia 13 pós-parto, o que sugere que o trato reprodutivo está menos preparado em manter a gestação (Blanchard *et al.* 2012). Em contrapartida, o estudo retrospectivo sobre o cio do poldro de Blanchard *et al.* (2004) não obtiveram diferenças significativas na percentagem de perda de gestação nas éguas inseminadas no cio do poldro (11,6%) ou no final do período pós-parto (9%). Sharma *et al.* (2010) obtiveram reabsorção embrionária de 9% e 6,21% de éguas reproduzidas no cio do poldro e no final do período pós-parto, respetivamente e não obtiveram diferenças significativas na perda de gestação nas diferentes fases desta. Morris e Allen (2002) reportaram que 2/3 da perda de gestação em éguas lactantes Puro-sangue Inglês ocorreram entre 15 e 35 dias de gestação. Blanchard *et al.* (2004) investigaram a fase da gestação de maior percentagem de perdas, reproduzidas no cio do poldro: 42% de reabsorção embrionária (16-41 dias),

10% de perda fetal precoce (42-85 dias), 31% de perda fetal mediana (86-200) e 17% de perda fetal tardia (201-até ao final).

Blanchard *et al.* (2012) afirmaram que 40% das éguas que perderam a gestação iniciaram a gestação entre fevereiro e abril, e somente 9% nas que iniciaram depois de 30 de abril.

Em gestações consecutivas e reproduzidas no cio do poldro, Morel *et al.* (2009) concluíram que 79,2% das vezes localizavam-se no corno contralateral ao gravítico anteriormente. O embrião no corno não-gravítico tem maior probabilidade de sobreviver do que se localizado no corno gravítico. Sharma *et al.* (2009) afirmam haver maior perda na fase embrionária e é ainda mais frequente quando se fixa no corno gravítico. O melhor ambiente uterino para o desenvolvimento embrionário assim como a maior probabilidade de se fixar no corno contralateral pode ser explicada pela dificuldade de movimentação do embrião no corno não-gravítico, logo maior probabilidade de fixação neste corno (Morel *et al.* 2009 e Sharma *et al.* 2009). Não há diferença entre a fixação no corno contralateral ou ipsilateral da gestação anterior na taxa de perda fetal, sugerindo que os efeitos da gestação anterior não são tão importantes quando a gestação ultrapassa os 42 dias, isto suporta a ideia que a alta taxa de reabsorção embrionária é devida há incapacidade temporal e atraso na recuperação do corno ipsilateral da última gestação (Sharma *et al.* 2009).

A taxa de reabsorção embrionária é maior em éguas mais velhas (Carnevale e Ginther 1991, Sharma *et al.* 2010). Blanchard *et al.* (2012) verificaram menor reabsorção embrionária no cio do poldro em éguas com menos de 10 anos, e maior perda em éguas com mais de 18 anos.

## **8 - TÉCNICAS PARA MELHORAR A TAXA DE FERTILIDADE DO CIO DO POLDRO**

Novos tratamentos têm sido testados para acelerar a involução uterina ou atrasar o dia da ovulação, a fim de melhorar a taxa de gestação do cio do poldro. Estes baseiam-se na estimulação da contração uterina, remoção do fluido intrauterino e terapia hormonal.

Um método simples é garantir que a égua se exercite para ajudar na evacuação do fluido uterino. Foi descoberto que há atraso na involução uterina de éguas mantidas em boxes durante o período pós-parto quando comparadas com éguas em pastagem.

Assim, éguas que estão estabilizadas devido a poldros doentes devem ser avaliadas para prevenir metrites (Macpherson e Blanchard 2005).

Tem sido estudada a utilização de lavagens uterinas (com solução salina fisiológica morna) para melhorar a taxa de gestação. Contudo, não se tem observado diferença entre involução uterina, reparo endometrial, cultura e citologia uterina entre éguas tratadas ou não. Concluindo-se assim que, nenhuma vantagem pode ser esperada na lavagem uterina em éguas que pariram normalmente (Macpherson e Blanchard 2005). Esta é benéfica em casos de acumulação de fluido intrauterino próximo da ovulação ou pouco depois da fecundação, e demonstra promover melhor taxa de gestação comparada com éguas com acumulação de fluido intrauterino e não tratadas. Éguas tratadas a fim de reduzir a acumulação de fluido intrauterino presente no cio do poldro com lavagem uterina e administração de Oxitocina não tem melhor taxa de gestação do que éguas sem fluido intrauterino (Malschitzky *et al.* 2002 e Blanchard *et al.* 2004). Malschitzky *et al.* (2002) acrescentam ainda que, lavagem uterina realizada 36-48 horas depois da inseminação no cio do poldro não melhora a taxa de gestação, mas se realizadas 6-12 horas após a inseminação reduz a incidência de morte embrionária precoce (taxa de gestação aos 42 dias 49% e 63%, em éguas não tratadas e éguas tratadas, respetivamente).

Como já dito anteriormente, Loy (1980) descobriu que éguas que ovulam depois dos 10 dias pós-parto têm melhor taxa de gestação, assim novas pesquisas têm-se focado na tentativa de atrasar a primeira ovulação pós-parto com esteroides exógenos, permitindo dar tempo á involução uterina e ao reparo endometrial, sem perder os benefícios associados da reprodução no cio do poldro, e melhorar a sua fertilidade. Este atraso dará tempo adicional à égua antes da reprodução em vez de esperar pelo segundo cio pós-parto. Mckinnon *et al.* (1988) estudaram a eficácia do altrenogest (0,044mg/kg oral), sintético da progesterona, na primeira ovulação pós-parto. A ovulação foi atrasada nas éguas tratadas e a taxa de gestação foi mais alta em éguas que ovularam depois do dia 15 pós-parto (82%) comparadas com éguas que ovularam antes do 15º dia (50%). A administração de estradiol no período pós-parto não acelera a involução uterina, não aumenta a duração do estro nem atrasa a ovulação, e também não melhora a taxa de gestação no cio do poldro (Arrott *et al.* 1994). A combinação de progesterona e estradiol tem sido estudado a fim de atrasar a ovulação pós-parto, porque o desenvolvimento folicular e ovulação são suprimidos pelo efeito feedback negativo da combinação de

esteroides. Loy (1980) estudou a combinação de progesterona e estradiol no cio do poldro e provou que a ovulação é atrasada com esta terapia, mas a taxa de gestação não melhora em éguas tratadas. Mais tarde, Bruemmer *et al.* (2002) estudaram a eficácia da administração de progesterona e estradiol, mas somente, administrou-se 2 vezes (1h e 24 horas depois do parto) ou 1 vez 12 horas após o parto, para atrasar a ovulação depois do 10º dia pós-parto. Não obtiveram resultados significativos, afirmando apenas que poderá ser útil em atrasar a ovulação pós-parto além dos 10 dias, mas que mais estudos serão necessários, também não obtiveram diferença significativa na involução uterina. Ainda propõem que a terapia de 1 ou 2 dias de esteroides deve ter mais vantagens se aplicada em éguas que pariram no final da época reprodutiva, porque normalmente estão mais propensas a ovularem antes dos 10 dias pós-parto.

Tratamentos hormonais, também têm sido usados, para aumentar as contrações uterinas. Gunduz *et al.* (2008b) avaliaram o efeito da oxitocina 30 units. IM mais cloprostenol (análogo da PGF<sub>2α</sub>) 250 mg IM administrados 12 horas depois do parto, e continuando todas as 12 horas durante 3 dias, e não obtiveram efeito na diminuição do diâmetro uterino, tempo da ovulação do cio do poldro, taxa de gestação ou reabsorção embrionária precoce comparando com éguas não tratadas.

Poucos estudos existem sobre os efeitos da Deslorelin e hCG no cio do poldro. Blanchard *et al.* (2002) concluíram que a resposta ovárica e a taxa de fertilidade é semelhante em éguas tratadas com Deslorelin no cio do poldro, cios subsequentes ou éguas não-lactantes. Afirma, também, que éguas tratadas com Deslorelin no cio do poldro atrasam o retorno do cio subsequente, prolongando o intervalo interéstrico caso as éguas não fique gestante, em comparação com as éguas tratadas com hCG. O atraso do retorno ao cio provavelmente é devido à baixa regulação de gonadotropinas pituitárias pelo agonista GnRH com associada supressão de crescimento folicular. Resumindo, o autor recomenda o uso de hCG para a indução da ovulação no cio do poldro.

Éguas com partos normais têm mecanismos eficientes para involução uterina, não sendo necessário qualquer ajuda terapêutica. Contudo estas terapias podem ser úteis após partos complicados ou em éguas de idade (Blanchard e Macpherson 2011).

O uso de antibióticos depois da fertilização de éguas no cio do poldro mantem-se controversa. O tratamento com antibiótico e oxitocina no pós-parto têm maior taxa de gestação comparativamente com éguas tratadas só com oxitocina ou éguas não tratadas

(Blanchard e Macpherson 2011). A antibioterapia, a fim de tratar acumulação de fluido intrauterino após reprodução no cio do poldro, deve ser eficaz contra a maioria das bactérias que são tipicamente encontrados no útero pós-parto (isto é, *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos e coliformes como *E.coli* e *Enterobacter* spp.) (Blanchard e Macpherson 2011).

## ***IV - Taxa de Gestação do Cio do Poldro***

### ***Estudo retrospectivo***

#### **1 - OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de gestação do cio do poldro, baseando-se nos registos da Dra. Marta Usón de 2009 a 2014. Para atingir este objetivo o estudo baseou-se nos seguintes pontos:

- Estudar o intervalo parto-ovulação tendo em conta o mês do parto e idade;
- Comparar a taxa de gestação e reabsorção embrionária do cio do poldro, do 2ºcio pós-parto e das éguas que não pariram nesse ano ou que não foram reproduzidas no período pós-parto;
- Avaliar fatores que afetam a taxa de gestação do cio do poldro: dia da primeira ovulação, idade, data do parto e tipo de sémen;
- Avaliar fatores que afetam a reabsorção embrionária no cio do poldro: idade, dia da ovulação e data do parto.

#### **2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **Dados analisados:**

Para o estudo de dados recolheu-se a maior informação possível dos registos cedidos gentilmente pela Dra. Marta Úson, a fim de responder a todos os objetivos do trabalho. O estudo foi baseado nos dados de 2009 a 2014.

O estudo inteiro é composto de 560 éguas, das quais 133 foram usadas para estudar a atividade ovárica no cio do poldro, mas desta, somente 106 foram inseminadas neste cio. Sessenta e sete éguas foram inseminadas no 2ºcio pós-parto e as restantes 407 foram inseminadas nos cios subsequente ou são éguas que não pariram esse ano. Este último grupo de éguas será referido no resto do trabalho como “população geral”.

Os dados recolhidos de cada égua foram: idade, data do parto, dia da ovulação, tipo de sémen utilizado e diagnósticos de gestação aos 14 e 30 dias pós-ovulação.

A idade das éguas variou entre 3 e 26 anos, com uma média de 11 anos. Ao longo do estudo, subdividiu-se a idade em dois grupos: éguas jovens com 10 anos ou menos, e éguas velhas com mais de 10 anos de idade.

Subdividiu-se as éguas que pariram no início da temporada reprodutiva (de janeiro a março) das que pariram na restante época (de abril a junho).

O estudo da atividade ovárica baseou-se no intervalo parto-ovulação, ou seja, o intervalo de dias entre o parto e a 1ª ovulação pós-parto. Foi considerado anestro pós-parto quando as éguas não ovulavam até ao 30º dia pós-parto.

Os dois tipos de sémen no estudo foram: congelado e refrigerado.

A taxa de gestação e reabsorção embrionária foram baseados nos diagnósticos de gestação aos 14 e 30 dias.

### **Maneio das éguas:**

Grande parte das éguas viviam o distrito de Évora, as mais distantes deslocaram-se para a clínica, e uma pequena percentagem foram atendidas nas instalações dos proprietários. O maneio era bastante diversificado, visto pertencerem a diferentes proprietários, contudo, grande parte encontrava-se em campo ou *paddock*. Habitualmente eram alimentadas a pastagem e feno, e algumas suplementadas com ração. Consequentemente a condição corporal também variou consideravelmente de égua para égua.

### **Maneio reprodutivo no cio do poldro:**

Na tentativa de melhorar o êxito da fertilidade do cio do poldro, todas as éguas foram submetidas a um procedimento padrão, contudo considerando que cada égua é um caso, nenhum protocolo único pôde ser empregue, por razões clínicas ou por disponibilidade do proprietário.

Quando a finalidade era a inseminação das éguas no cio do poldro, procedia-se ao exame ginecológico da égua 7 a 8 dias após o parto, e equacionava-se a reprodução neste cio. Se a égua já tinha ovulado administrava-se dinoprost trometamina, análogo da PGF<sub>2α</sub>, 1 mL IM (Dinolytic® 5mg/mL) 5 dias depois, para acelerar o retorno do 2ºcio. Se a égua ainda não tinha ovulado, procedia-se ao controlo folicular a fim de inseminar na altura ideal. Nesta altura, considerou-se o tipo de sémen, refrigerado ou congelado. Se o proprietário optou por sémen refrigerado procedeu-se à inseminação convencional (no corpo uterino) independentemente do dia em que ovulou. Se o proprietário optou por sémen congelado procedeu-se à técnica de inseminação profunda

(no corno uterino) só se esta ovulou depois do 10º dia pós-parto (salvo em algumas exceções).

#### **Análise estatística:**

O processamento dos dados e execução gráfica foi elaborado através o programa Microsoft Excel 2010. A análise estatística foi realizada no programa SPSS Statistics 22. Para comparar as médias do intervalo parto-ovulação seguiu-se o teste estatístico one-way ANOVA, foi considerado diferente significativa quando  $p < 0,05$ . A comparação das percentagens de taxa de gestação e reabsorção embrionária para os fatores idade, mês do parto e tipo de sêmen foi utilizado o teste Qui-quadrado, foi considerado diferente significativa quando  $p < 0,05$ . Para comparar as diferentes percentagens de taxa de gestação e reabsorção embrionária ao longo dos intervalos parto-ovulação foi utilizado o teste ANOVA seguido do Post-Hoc LSD e foi considerado diferente significativa quando  $p < 0,05$ .

### **3 - RESULTADOS**

#### **Intervalo parto-ovulação tendo em conta o mês do parto e idade**

O dia da 1ª ovulação foi, em média, aos  $13,4 \pm 1,5$  dias pós-parto, contudo se não considerarmos as éguas que entraram em anestro pós-parto obtém-se a média de  $11,8 \pm 0,62$  dias. No gráfico 2 estão representadas as éguas que ovularam antes do dia 28 pós-parto, após este dia houve mais 5 éguas em anestro pós-parto, com intervalo parto-ovulação bastante distinto, e serão retratadas adiante. Pela análise do gráfico 2 observa-se aumento do número de éguas a ovularem até ao 10º dia pós-parto, e depois este valor diminui. Observa-se também que a maior parte das éguas ovularam entre o 9º e 13º dia, e 90,98% das éguas ovularam antes do dia 20 pós-parto. A partir do dia 18 pós-parto a número de éguas a ovularem é bastante baixa, variando entre 0 e 1 égua.

A incidência de anestro pós-parto foi de 3,75% (correspondendo a 5 éguas), com maior incidência de éguas a parirem no início da temporada. Destas 5 éguas 3 pariram em fevereiro, 2 em março e 1 em abril, e nenhuma nos restantes meses, com o intervalo parto-ovulação representado no gráfico 3.

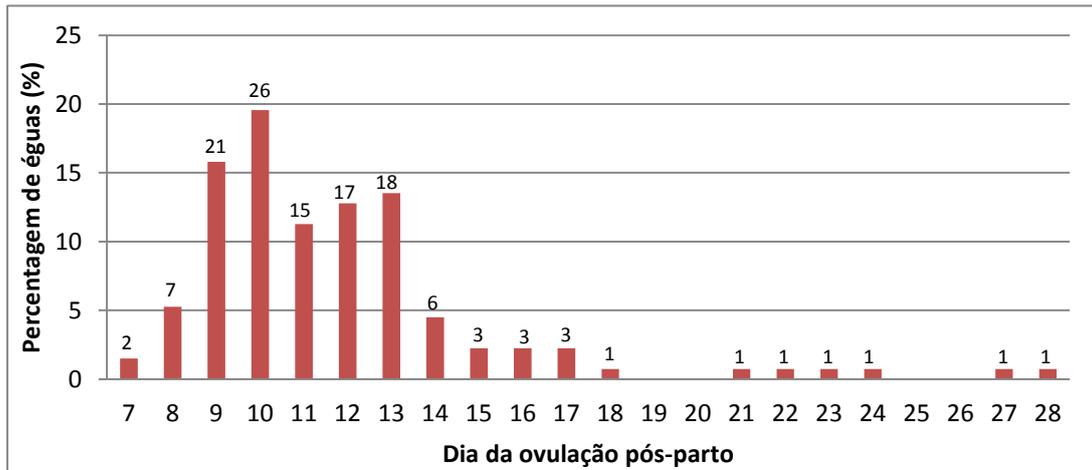


Gráfico 2- Percentagem de éguas que ovularam em cada dia pós-parto, do dia 7 ao 28 pós-parto. O número em cima de cada barra corresponde ao número total de éguas a ovularem nesse dia.

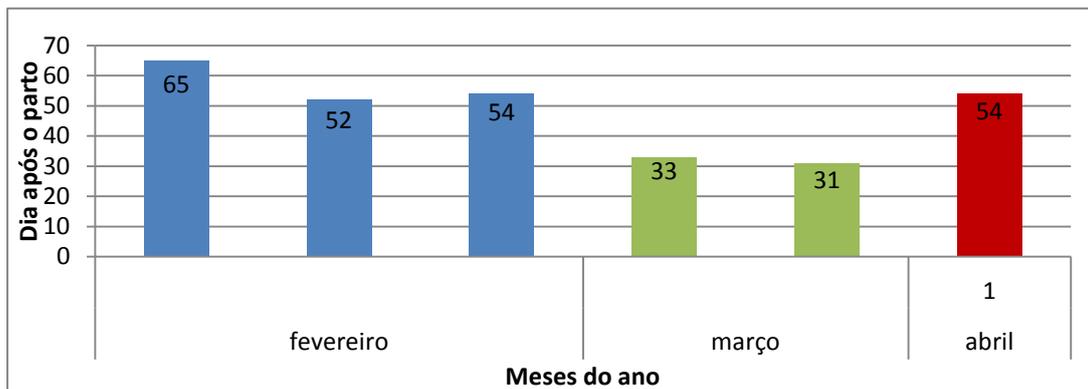


Gráfico 3 - Representa o intervalo parto-ovulação das éguas que entraram em inatividade ovárica após o parto (anestro pós-parto) e respetivo mês da ocorrência do parto. Cada barra corresponde a uma égua.

A média do dia da ovulação pós-parto variou significativamente em relação à data do parto ( $p < 0,01$ ), no início da temporada (de janeiro a março) foi de  $16,4 \pm 4,2$  dias, enquanto nos restantes meses da época reprodutiva (de abril a junho) foi de  $12 \pm 0,93$  dias.

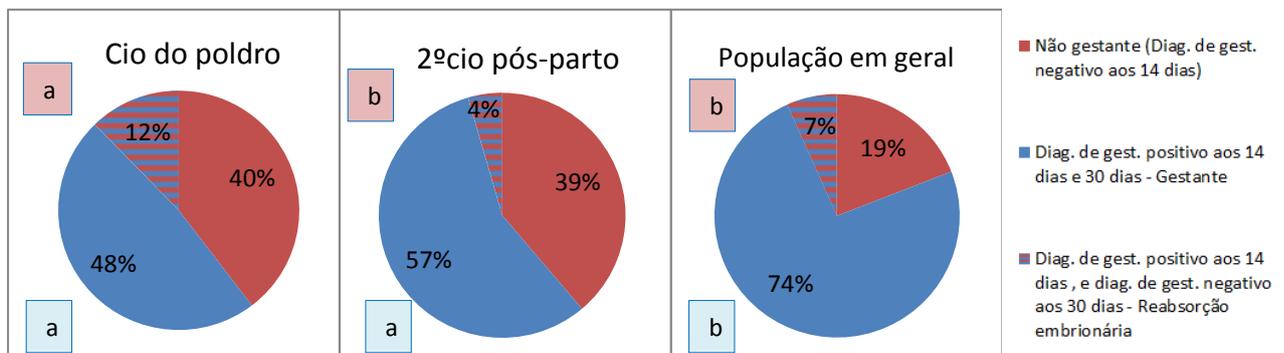
Em relação à idade observou-se um ligeiro aumento não significativo ( $p > 0,05$ ) do número de dias do intervalo parto-ovulação das éguas velhas ( $14,7 \pm 2,96$  dias) em relação as éguas jovens ( $12,2 \pm 1,13$  dias).

**Taxa de gestação e reabsorção embrionária do cio do poldro, do 2ºcio pós-parto e das éguas que não pariram ou que não foram reproduzidas no período pós-parto**

A taxa de gestação após o 1º diagnóstico de gestação (14 dias) no cio do poldro foi idêntica há taxa de gestação do 2ºcio pós-parto (60% e 61%, respetivamente  $p>0,05$ ). Contudo, pela análise do gráfico 4, observa-se que a taxa de reabsorção embrionária no cio do poldro foi de 11% em comparação com 4% no 2º cio pós-parto (significativamente diferente  $p<0,05$ ). Pelo que no final, o 2º cio pós-parto teve uma taxa de gestação (depois dos 30 dias de gestação) ligeiramente maior que o cio do poldro (57% comparado com 48%), mas não significativamente ( $p>0,05$ ).

A média do intervalo parto à 2ªovulação foi de 29,5 dias.

Também pela análise do gráfico 4, podemos observar que a taxa de gestação da população em geral (74%) é significativamente superior à taxa de gestação no cio do poldro (48%) ( $p>0,001$ ). Em relação há reabsorção embrionária observa-se uma percentagem significativamente maior no cio do poldro (12%) do que na população em geral (7%) ( $p<0,01$ ). A reabsorção embrionária foi semelhante entre o 2º cio pós-parto e a população em geral (4% e 7%, respetivamente ( $p>0,05$ )).



**Gráfico 4 - Taxa de gestação e reabsorção embrionária no cio do poldro, 2ºcio pós-parto e população em geral.** Letras diferentes representam conjuntos de dados estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do Post Hoc Test LSD com valor de  $p<0,05$ ; as letras a vermelho são referentes à reabsorção embrionária, e as letras a azul são referentes à taxa de gestação (depois dos 30 dias)

**Fatores que afetam a taxa de gestação do cio do poldro: dia da primeira ovulação, idade, data do parto e tipo de sêmen**

O gráfico 5 demonstra o número de éguas que ficarão ou não gestantes no primeiro diagnóstico de gestação (14 dias). Podemos observar que as duas éguas inseminadas no dia 7 e 8 não ficaram gestantes, e todas as éguas inseminadas depois do dia 17 ficaram gestantes. Observa-se ligeiro aumento do número de éguas gestantes das não gestantes a partir do dia 10 pós-parto. Para uma melhor observação da percentagem de éguas gestantes em relação ao dia da ovulação pós-parto, agrupou-se os dias de 3 em 3, e desta forma, pela análise do gráfico 6, podemos observar um aumento progressivo da taxa de gestação em relação ao dia da ovulação pós-parto. Com melhora significativa a partir do intervalo parto-ovulação 13 a 15 dias.

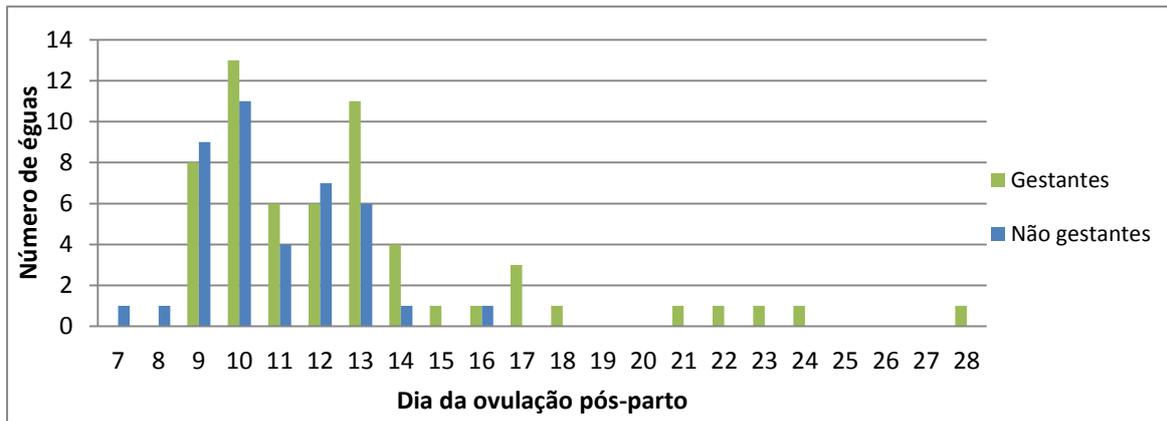


Gráfico 5 - Nº de éguas gestantes ou não em relação ao dia da 1ª ovulação pós-parto, em relação ao 1º diagnóstico de gestação (14 dias).

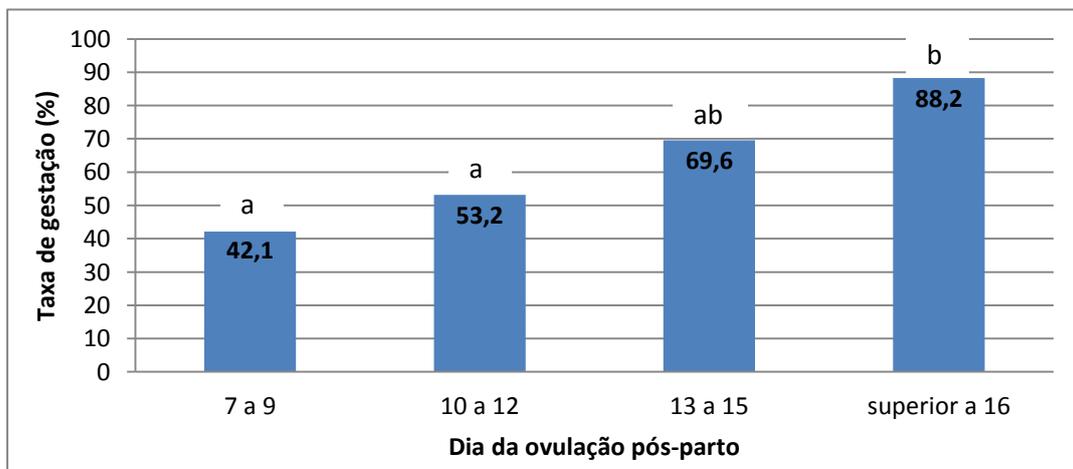


Gráfico 6 - Taxa de gestação em relação ao dia da 1ª ovulação pós-parto, em relação ao 1º diagnóstico de gestação (14 dias). Letras diferentes representam conjuntos de dados estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do Post Hoc Test LSD com valor de  $p < 0.05$

Após o 1º diagnóstico de gestação (aos 14 dias) a idade não demonstrou ter influência na taxa de gestação do cio do poldro, as éguas velhas obtiveram 58,3% de sucesso e as éguas novas 61,4% ( $p>0,05$ ). Mas, depois do 2º diagnóstico de gestação (aos 30 dias), além de não significativamente diferente, verificou-se uma tendência para maior taxa de gestação nas éguas mais novas (56,1%) em relação as éguas mais velhas (37,5%) ( $p>0,05$ ). Ao relacionar o fator idade com o dia da ovulação (gráfico 7) pode-se observar, como esperado, que em ambas as idades há progressão da percentagem de gestação em relação ao dia da ovulação pós-parto. As éguas com menos de 10 anos melhoram significativamente a taxa de gestação do cio do poldro logo depois do 10º dia pós-parto, já as éguas com mais de 10 anos, só se observa melhora significativa após o intervalo 13 a 15 dias pós-parto.

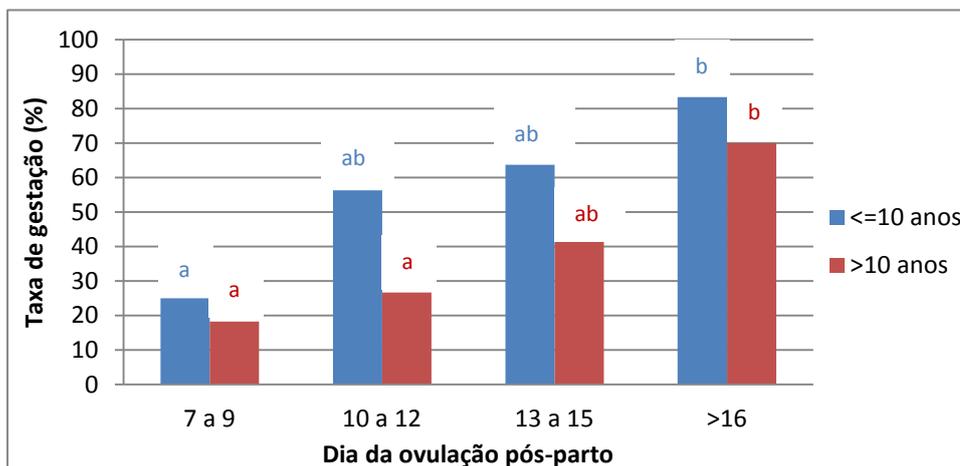


Gráfico 7 - Taxa de gestação (diagnósticos de gestação aos 14 e 30 dias), relacionando o dia da ovulação com a idade. Éguas velhas mais de 10 anos, éguas novas menos igual a 10 anos. Letras diferentes representam conjuntos de dados estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do Post Hoc Test LSD com valor de  $p<0,05$ .

A data do parto, antes ou depois de março, não teve diferença significativa na taxa de gestação aos 14 dias (67,9% e 57,7%, respetivamente ( $p>0,05$ )), nem aos 30 dias (53,6% e 46,2%, respetivamente ( $p>0,05$ )).

O tipo de sémen, refrigerado ou congelado, obteve percentagens de gestação semelhantes tanto na população em geral (82,6% e 78,4, respetivamente ( $p>0,05$ )) como em éguas reproduzidas no cio do poldro (60% e 61,1% respetivamente ( $p>0,05$ )). Para entender melhor se há diferença entre inseminar com sémen refrigerado ou congelado dependendo do dia da ovulação observa-se o gráfico 8. Quando inseminação com sémen refrigerado observa-se melhor significativa após o 13º dia pós-parto. Com sémen

congelado a taxa de gestação foi significativamente semelhante em todos os intervalos, para melhor estudar desta relação era necessário um maior número de amostras. Contudo, observa-se uma redução na percentagem no intervalo de 7 a 9 pós-parto. Quando ovulam entre o dia 7 e 9 pós-parto a percentagem é maior quando inseminadas com sémen refrigerado do que com sémen congelado (46,7% e 25%, respetivamente), mas não significativamente diferente.

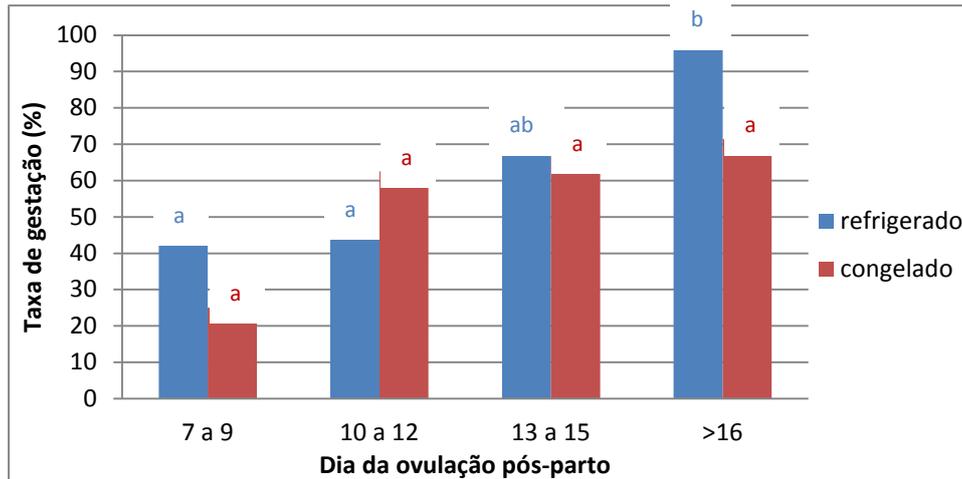


Gráfico 8 - Representa a relação do tipo de sémen (refrigerado ou congelado) com o dia da ovulação pós-parto e sucessiva taxa de gestação (diagnóstico de gestação aos 14 dias). Letras diferentes representam conjuntos de dados estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do Post Hoc Test LSD com valor de  $p < 0,05$ .

### Fatores que afetam a reabsorção embrionária no cio do poldro: idade, dia da ovulação e data do parto

Ao observar a relação do dia da ovulação com a taxa de reabsorção embrionária observou-se que entre o dia 7 e 9 pós-parto há maior diferença significativa na reabsorção embrionária (50%) em relação ao intervalo parto-ovulação 10 a 12 dias (12%) e superior a 16 dias (13,3%), com uma relação no 2º diagnóstico de gestação (aos 30 dias) de 4 negativos em 8 éguas, no intervalo 7 a 9, e entre o dia 10 e 12 pós-parto a incidência da reabsorção embrionária desceu logo rapidamente, com uma relação de 3 negativos em 25 éguas (gráfico 9).

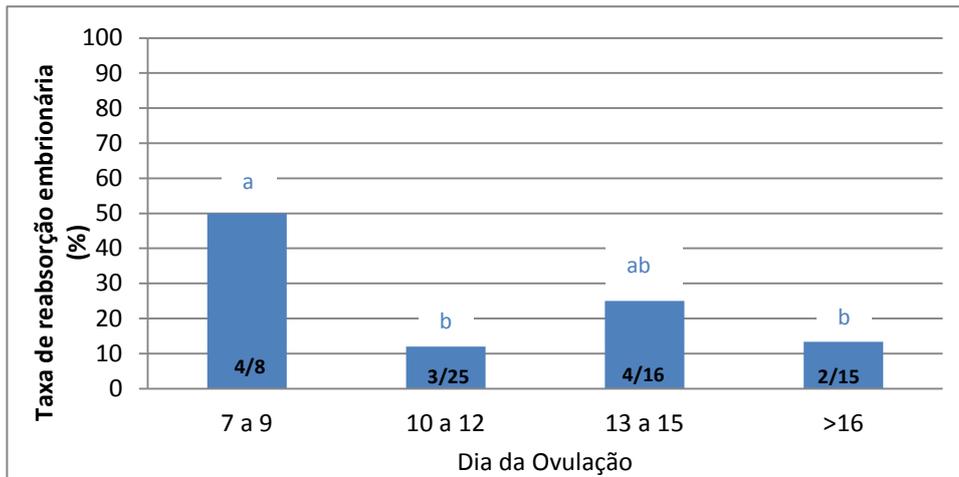


Gráfico 9 - Número de éguas que sofreram reabsorção embrionária (Diagnóstico de gestação aos 30 dias) em relação ao dia da ovulação pós-parto. Os números nas barras gráficas significam o número de éguas que sofreram reabsorção embrionária em relação ao número de éguas gestantes aos 14 dias. Letras diferentes representam conjuntos de dados estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do Post Hoc Test LSD com valor de  $p < 0,05$ .

E relação ao fator idade observou-se maior taxa significativa de reabsorção embrionária em éguas mais velhas (35,7%) em relação às éguas mais jovens (8,6%) ( $p < 0,01$ ).

Por fim, neste estudo, observou-se que houve igual taxa de reabsorção a embrionária nas éguas que pariram anteriormente no início ou final da época reprodutiva (21,1% e 20%, respetivamente ( $p > 0,05$ )).

## 4 - DISCUSSÃO

### Intervalo parto-ovulação tendo em conta o mês do parto e idade

Neste estudo, o dia da ovulação pós-parto, no geral, coincide com a maior parte dos estudos mencionados anteriormente, pois a maior parte das éguas ovula dentro de 20 dias pós-parto (Loy 1980, Nagy *et al.* 1998, Panasophonkul *et al.* 2007, Blanchard *et al.* 2012 e Aoki *et al.* 2013). Como visto anteriormente a média varia consideravelmente entre autores, neste estudo de dados, a média do dia da ovulação do cio do poldro ( $13,4 \pm 1,15$  dias) coincidiu com os estudos anteriores de Blanchard *et al.* (2004) e Panasophonkul (2007). Contudo, a maior parte das éguas ovularam (entre o 9º e 13º dia) um pouco antes do que demonstrou Blanchard *et al.* (2004) no seu estudo (11º e 16º dia). A progressão dos dias da ovulação no cio do poldro demonstrou ter um padrão relativamente regular, com o pico no 10º dia pós-parto.

A variação da média do dia da ovulação pós-parto pode ser devido à diferença do manejo das éguas que irá influenciar a condição corporal (Nagy *et al.* 1998 e Panasophonkul *et al.* 2007), do *stress*/tranquilidade, da idade das éguas e do fotoperíodo, fator de grande importância no início da atividade ovárica nas éguas (Nagy *et al.* 2000 e Sharma *et al.* 2010).

No presente trabalho, o fator idade não afetou significativamente a atividade ovárica no cio do poldro, mas as éguas mais velhas (mais de 10 anos de idade) têm tendência a ovular mais tarde que as éguas jovens (menos ou igual a 10 anos), concordando com o estudo de Fiala *et al.* (2004). Desconhece-se se as éguas eram primíparas ou múltíparas, contudo, se considerarmos que normalmente éguas primíparas são mais jovens e as éguas múltíparas são mais velhas, os dados não são concordantes com os resultados de Nagy *et al.* (1998) e Sharma (2010), que afirmam que éguas primíparas têm maior intervalo parto-ovulação do que as éguas múltíparas.

Um estudo recente (Altermatt *et al.* 2012) relacionou a vascularidade folicular e seu crescimento em relação à idade da égua e concluiu que a vascularidade folicular é maior em éguas mais velhas comparadas com éguas mais jovens, com diminuição do efeito da administração de LH. O crescimento folicular não está associado com a vascularidade, mas o folículo pré-ovulatório tende a crescer mais lentamente em éguas mais velhas do que em éguas mais jovens (Altermatt *et al.* 2012). Esta relação poderá ser a causa das éguas mais velhas terem tendência a ovularem mais tarde do que as mais novas. Um outro fator que poderá estar relacionado é a involução uterina, pois éguas mais velhas têm involução uterina pós-parto mais prolongada do que éguas mais jovens (Morel *et al.* 2009).

A influência da data do parto na atividade ovárica neste trabalho foi concordante com os resultados apresentados por Nagy *et al.* (1998), pois demonstrou ter influência na atividade ovárica pós-parto, através de dois parâmetros. Primeiro detetou-se que a baixa percentagem de éguas que sofreram anestro pós-parto (3,75%) quase todas pariram no início da temporada (fevereiro-março). Os resultados foram semelhantes ao artigo de Blanchard *et al.* (2004), com a diferença que este autor obteve uma incidência de anestro pós-parto superior (18,4%). Segundo, através da média do intervalo do parto à 1ª ovulação nos meses de janeiro-março e nos meses de abril-junho, no qual se obteve maior diferença significativa nas éguas paridas no início da temporada ( $16,4 \pm 4,2$  dias) em relação aos restantes meses da época reprodutiva ( $12 \pm 1,13$  dias). Mais uma vez,

estes valores estão de acordo com a conclusão da bibliografia analisada (Nagy *et al.* 1998 e Sharma *et al.* 2010). Como os meses no início da temporada, são, geralmente, meses mais frios e com menor duração de luz diária, e os restantes meses da temporada reprodutiva são mais quentes e têm maior duração de luz diária, podemos afirmar que as alterações sazonais influenciam a atividade ovárica no pós-parto. Desta forma, o fotoperíodo que tem grande influência nas alterações endócrinas pode ter interação com a atividade ovárica do cio do poldro.

**Taxa de gestação e reabsorção embrionária do cio do poldro, do 2ºcio pós-parto e das éguas que não pariram ou que não foram reproduzidas no período pós-parto:**

Nos nossos estudos, observou-se diferença significativa na taxa de gestação entre éguas inseminadas no cio do poldro (48%) e as inseminadas em cios subsequentes ou éguas não-lactantes (74%), apresentando uma diferença de 26%. Em relação à bibliografia que afirma que a taxa de gestação das éguas que se reproduzem no cio do poldro é em média de 10-20% mais baixa que em éguas reproduzidas nos cios seguintes (Ishii *et al.* 2001 e Blanchard e Macpherson 2011), os dados obtidos são somente ligeiramente superiores. Esta pequena diferença pode ser simplesmente pelo fato do presente estudo também ter éguas inseminadas com sémen congelado no cio do poldro, e nos estudos indicados são quase todos por monta natural e/ou IA com sémen refrigerado. Também devemos ter em conta que no cio do poldro há só uma tentativa de inseminação, enquanto na população em geral uma razoável percentagem de éguas são inseminadas mais do que uma vez.

A principal causa desta diferença entre os cios baseia-se na involução uterina e ambiente uterino inapropriado para receber um novo embrião. Camillo *et al.* (1997) concluíram que as diferenças entre registos podem ser devido a patologias no trato reprodutivo, ou sémen de baixa qualidade, baixa fertilidade do garanhão ou o uso de sémen congelado.

Mesmo que a taxa de gestação no cio do poldro seja baixa, alguns proprietários preferem reproduzir a égua logo no período pós-parto, para assim haver duas oportunidades de inseminação nos primeiros 30 dias, e a possibilidade de manter a produção anual de um poldro.

Entre o 1º e 2º cio pós-parto não se obteve diferença na taxa de gestação (48% e 57% respetivamente), estando de acordo com os resultados de Camillo *et al.* (1997)

(72% e 78%), Loy (1980) (84% e 87%) e Blanchard *et al.* (2004) (72% e 76%, respetivamente). Contudo, o 2º cio obteve estatisticamente melhor reabsorção embrionária em relação ao cio do poldro, o que pode sugerir que após a inseminação o útero tem melhor capacidade para adquirir ambiente propício ao desenvolvimento do embrião. A diferença entre a reabsorção embrionária no cio do poldro e no final do período pós-parto foi semelhante aos resultados obtidos por Blanchard *et al.* 2004 (11,6% e 9%, respetivamente) e Sharma *et al.* 2010 (9% e 6,21%).

Alguns dos fatores que aumentam a incidência de reabsorção embrionária são: a alteração do ambiente uterino, o atraso da involução uterina, a retenção de fluido uterino (Newcombe 2000), *stress* e endometrites subclínicas. Este são principalmente observados durante a reprodução no cio do poldro pelo que seria de esperar uma maior percentagem de taxa de reabsorção embrionária no cio do poldro do que na população geral. Neste trabalho demonstrou-se uma maior diferença significativa na taxa de reabsorção embrionária (12%) do que na população em geral (7%), demonstrando-se semelhante com a afirmação de Meyers *et al.* (1991) “égua inseminada no cio do poldro têm 1,9 vezes maior probabilidade de sofrer mortalidade embrionária”.

Por fim podemos afirmar que um dos impactos negativos da reprodução no cio do poldro é a reabsorção embrionária precoce. Normalmente éguas que reproduzem fora do período pós-parto ou éguas não-lactantes têm melhor ambiente para o desenvolvimento embrionário e sua mais fácil fixação no endométrio.

### **Fatores que afetam a taxa de gestação do cio do poldro: dia da primeira ovulação, idade, data do parto e tipo de sêmen**

Os dados relativos à fertilidade do cio do poldro em relação ao dia da ovulação pós-parto não deixam dúvidas da veracidade da afirmação de Blanchard *et al.* (2012) “maior fertilidade com o aumento do período pós-parto”, pois no gráfico 6 observa-se um aumento progressivo da taxa de gestação em relação ao dia da ovulação pós-parto.

Observando a taxa de gestação em cada dia pós-parto, podemos concluir maior taxa de gestação se a ovulação ocorrer depois do 13º dia pós-parto. Pois a partir deste intervalo parto ovulação (13-15 dias) observa-se melhora significativa da taxa de gestação (69,6%). E a partir do 16º dia obteve-se a melhor taxa. Este resultado demonstrou ter sido precoce em relação ao reportado por Blanchard *et al.* (2012) que afirma que obteve melhor taxa depois do 22º dia pós-parto. Contudo devemos ter em

conta com o número reduzido da amostra de éguas, principalmente, a ovularem depois do dia 15 pós-parto neste trabalho em relação ao artigo de Blanchard *et al.* (2012), o que torna difícil a comparação.

Esta diferença da taxa de gestação em relação ao dia da ovulação pós-parto é explicada pelo decorrer da involução uterina morfológica e histologicamente. A involução uterina considera-se funcional no 7º dia pós-parto e, em torno do 14º dia o endométrio tem a aparência histológica de um útero normal pré-gravítico (Gygax *et al.* 1979 e Stanton 2011). Assim, é normal a taxa de gestação aumentar depois do dia 13 pós-parto. Por outro lado, visto que o embrião se move para o oviduto e entra no útero 5 a 6 dias depois da fertilização (Blanchard e Macpherson 2011), se inseminarmos no 10º dia pós-parto o útero também poderá ter tempo para completar a involução uterina e estar funcional para nutrir um novo embrião. Caso contrário, há involução uterina incompleta, não adquirindo ambiente propício para o desenvolvimento embrionário. A acumulação de fluido intrauterino tem efeito negativo na taxa de gestação no cio do poldro (Blanchard *et al.* 2004). Normalmente o fluido deve diminuir por volta do 5º dia, e ser mínimo no dia 10 pós-parto e indetetável no 15º dia pós-parto (Griffin e Ginther 1991), contudo por vezes prolonga-se, e isto pode justificar a diferença da taxa de gestação entre o intervalo 10º a 12º e 13º a 15º dias pós-parto.

O fator idade na taxa de gestação foi concordante com o que a bibliografia afirma (Carnevale 1992, Blanchard *et al.* 2004 e Sharma *et al.* 2010), diminui com o aumento da idade das éguas (37,4% nas éguas velhas para 56,1% nas éguas jovens). Neste estudo podemos concluir que a principal causa da diversidade da taxa de gestação entre éguas velhas e novas, foi a reabsorção embrionária, porque no 1º diagnóstico de gestação (aos 14 dias) não demonstrou diferença aparente entre éguas velhas e novas (58,3% e 61,4%, respetivamente). Esta relação ocorre porque normalmente as éguas mais velhas têm maior incidência de patologias uterinas, como endometrites subclínicas, quistos uterinos (que podem dificultar a movimentação e fixação da vesícula embrionária) e inflamações crónicas (Carnevale e Ginther 1991), maior incidência de acumulação de fluido intrauterino (Sharma *et al.* 2010), e maior tempo para a involução uterina (Blanchard *et al.* 2004) que sucessivamente pode levar também ao aumento da reabsorção embrionária (Morel *et al.* 2009).

Ao relacionar o fator idade com o dia da ovulação (gráfico 7) pode-se observar que as éguas mais novas tiveram sempre taxa de gestação maior independentemente do

dia da ovulação. As éguas mais novas demonstram significativamente melhor taxa de gestação após os 10 dias pós-parto. Já nas éguas mais velhas aconselha-se inseminar só após o 13º dia, pois só nesta altura se observa melhora significativa.

A data do parto, ao contrário do que se verificou na atividade ovárica do cio do poldro, não influencia a taxa de gestação neste cio. Seria de esperar uma tendência do aumento da taxa de gestação nas éguas paridas no início da temporada visto ter-se verificado aumento significativo no intervalo parto-ovulação, e desta forma, maior tempo para a involução uterina. Esta diferença não significativa pode-se dever ao número reduzido de amostras das éguas paridas no início da temporada em relação aos meses consecutivos.

Contrariamente ao relatado por Sieme *et al.* (2004a), o tipo de sémen não demonstrou ser um fator relevante na diminuição da taxa de gestação no cio do poldro, contudo Sieme *et al.* estudaram a relação entre sémen fresco e congelado. Este fato pode ser devido a dois fatores: pequeno número de éguas na amostra inseminadas com sémen congelado no início do período pós-parto, pois, como afirmado nos materiais e métodos as éguas inseminadas com sémen congelado à partida procedia-se só à IA depois do dia 10 pós-parto; e devido a uma maior seleção das éguas quando inseminadas com sémen congelado.

Quando inseminação com sémen refrigerado, pela análise do gráfico 8, é indicativo inseminar só depois do 13º dia pós-parto, quando se verifica melhora significativa.

Examinando mais especificamente o intervalo parto-ovulação 7 a 9, verifica-se uma ligeira diminuição na taxa de gestação precoce quando inseminação com sémen congelado, apesar de não ser significativamente diferente, visto só termos uma amostra de 4 éguas e apenas uma, com 7 anos de idade, ficou gestante. Este resultado poderá ser devido há conjugação de 2 fatores: incompleta involução uterina e baixo volume de sémen quando se insemina com sémen congelado, que além de serem por inseminação profunda no corno uterino, têm um volume muito menor (cerca de 6 palhetas de 0,5 mL, variação conforme a qualidade do sémen) comparado ao sémen refrigerado (em média 20 mL), há uma maior dificuldade de progressão do sémen, num ambiente uterino que ainda não atingiu o tamanho apropriado. São necessários 27 dias para o corno não gravítico e 31 para o corno gravítico alcançarem o tamanho pré-gravítico, embora a maior taxa de involução do tamanho uterino ocorra nos primeiros 10 dias pós-parto

(Griffin e Ginther 1991). No entanto, para estudar a veracidade desta afirmação teríamos de ter maior número de amostras.

Obviamente, mais estudos comparando diferentes métodos de reprodução e tipos de sémen são necessários para determinar o efeito da fertilidade alcançada no início e no final do período pós-parto.

### **Fatores que afetam a reabsorção embrionária no cio do poldro: idade, dia da ovulação e data do parto**

Blanchard *et al.* (2012) detetaram maior perda de gestação antes dos 13 dias pós-parto. Neste estudo, a elevada taxa de reabsorção embrionária no cio do poldro observa-se uns dias antes, principalmente quando a ovulação ocorre antes do 10º dia. Depois do 10º dia pós-parto a percentagem não variou. Isto sugere, que o trato reprodutivo está menos preparado para o desenvolvimento embrionário e sucessivamente a possibilidade em manter a gestação, sugerindo incapacidade temporal e atraso da involução uterina (Sharma *et al.* 2009). Também devemos considerar que por volta do dia 10 pós-parto há maior probabilidade de ocorrência de inflamação uterina e endometrites que contribuem para maior reabsorção embrionária.

Por fim, e como já discutido anteriormente, a maior taxa de reabsorção embrionária ocorreu em éguas mais velhas (35,7%) do que em éguas jovens (8,6%). Concordando assim com os estudos de Carnevale e Ginther (1991), Sharma *et al.* 2010 e Blanchard *et al.* (2012). As éguas mais velhas têm maior índice de danos uterinos, que sucessivamente prejudicam a contractilidade e tónus uterino e aumentam a probabilidade de inflamações e acumulação de fluido intrauterino (Carnevale e Ginther 1991). Desta forma é aconselhado em éguas mais velhas proceder a citologias ou biópsias intrauterinas e colheita de fluido intrauterino, antes da inseminação.

## 5 - CONCLUSÃO

Mesmo que a taxa de gestação do cio do poldro seja menor, alguns proprietários ainda preferem inseminar a sua égua no cio do poldro, pelo que a fertilidade do cio do poldro é um tema bastante debatido entre médicos veterinários e de bastante pesquisa científica a fim de melhorar cada vez mais a sua eficácia.

A reprodução no cio do poldro mostrou-se eficiente em bastantes casos, contudo deve-se ter conhecimento que nem todas as éguas são aceitáveis para se reproduzirem durante o cio do poldro. Desta forma, é importante saber selecionar corretamente as éguas a reproduzir no período pós-parto, e obter o melhor proveito da sua utilização, por redução do intervalo de tempo parto-conceção, e sucessivamente a capacidade de reproduzir anualmente um poldro, e este nascer no início da temporada reprodutiva.

Dos dois fatores avaliados na influência da atividade ovárica do cio do poldro (idade e data de parto) concluiu-se que a alteração sazonal da data do parto foi o fator que demonstrou ter maior influência na atividade ovárica do cio do poldro, pois teve muita influência no intervalo parto-conceção. Ao contrário do esperado, o aumento do intervalo parto-ovulação afetado pela data do parto, não afetou estatisticamente a taxa gestação nem a reabsorção embrionária.

Concluiu-se que há menor taxa de gestação e maior reabsorção embrionária no cio do poldro do que na população em geral. Existem vários fatores responsáveis pela baixa fertilidade do cio do poldro que devem ser avaliados e examinados, pois estes fatores são prós e contras que levam o clínico a optar pela reprodução do cio do poldro ou esperar pelos cios subsequentes.

Pela análise geral dos resultados, concluímos que há maior taxa de gestação se a ovulação ocorrer depois do 13º dia pós-parto. Também se depreende que se a égua tiver mais de 10 anos não se deve inseminar antes do 13º dia pós-parto, já as éguas mais novas puderam ser inseminadas logo aos 10 dias; e que se se inseminar com sémen congelado sugere-se nunca inseminar antes do dia 10 pós-parto (alem de estatisticamente concluído). Desta forma, se a ovulação ocorrer antes do dia 13 pós-parto, ou a égua apresentar sinais clínicos de incompleta involução uterina (por exemplo, fluido intrauterino), deverá ponderar-se a inseminação da égua só no 2ºcio, administrando prostaglandina (5 dias depois da primeira ovulação) para acelerar o surgimento deste cio e, desta forma, proporcionar maior tempo para involução uterina e

ainda ter a possibilidade de reproduzir num intervalo parto-concepção inferior a 30 dias, mantendo a produção anual de um poldro.

Os fatores que podem estar correlacionados com a baixa taxa de gestação e reabsorção embrionária são: atraso da involução uterina, presença de fluido intrauterino e tamanho uterino no dia da ovulação, condição corporal, maior probabilidade de inflamação uterina pós-parto e endometrites. Para ajudar na decisão, é bastante importante ter em consideração a história clínica do parto (distócias, retenção das membranas fetais, poldro prematuro, etc.).

Como conclusão geral, o procedimento de reprodução no cio do poldro, deve ser muito bem equacionado para se aproveitarem as vantagens desta característica reprodutiva.

## V - Bibliografia

Abo El-Maaty AM e Gabr FI (2010) Relation between leptin and estradiol levels in Egyptian lactating Arab mares during foaling heat. *Animal Reproduction Science*, 117:95-98

AboEl-Maaty AM, Shata FYH, Mahmoud BEM e Gabr FI (2012) Oxidant/antioxidant status during foal heat in Arab mares and their relation to ovarian hormones. *Asian Pacifico f Reproduction*, 1(3):198-202

Altermatt JL, Marolf AJ, Wrigley RH e Carnevale EM (2012) Effects of FSH and LH on ovarian and follicular blood flow, follicular growth and oocyte developmental competence in young and old mares. *Animal Reproduction Science*, 133:191–197

Aoki T, Inoue Y, Murase H, Asai Y, Nambo YM e Ishii M (2013) Relationship Between Fertility at Foal Heat and Blood Biochemistry Parameters Monitored During the Peripartum Period in Thoroughbred Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*,33:1064-1067

Arrott C, Macpherson M, Blanchard T, Varner D, Thompson J, Simpson B, Bruemmer J, Vogelang S, Fernandez M, Fleet T e Burns P (1994) Biodegradable estradiol microspheres do not affect uterine involution or characteristics of postpartum estrus in mares, *Theriogenology*,42(2);371–384

Aurich C (2011) Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*,124:220–228

Barbacini S (1999) Incidence os embryo loss in mares inseminated befora or after ovulation. *Equine veterinary education*, 11(5):251-254

Baranski W, Janowski T, Ras A, Podhaliez-Dziegielewska M e Strzzek R (2003) Relationship between bacteriological & cytological examination of the mares uterus during foal heat & fertility rate. *Bulletin Vet Inst Pulway*,47:427–33

Beg MA e Bergfelt DR (2011) Folliculogenesis *In: Equine Reproduction 2ºed* Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.2010-19

Beltaire KA, Cheong SH e Silva MAC (2012) Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999–2011). *Equine Veterinary Journal*,44:84–87

Bergfelt DR e Adams GP (2011) Pregnancy *In: Equine Reproduction 2ºed* Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.2065-2079

Bergfelt DR, e (2006) Regression and resurgence of the CL following PGF2a treatment 3 days after ovulation in mares. *Theriogenology*,65:1605–1619

Blanchard TL e Varner DD (1993) Uterine involution and postpartum breeding. In: McKinnon, A.O., Voss, J.L. (Eds.) *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger,pp.622-625

Blanchard TL, Brinsko SP e Rigby SL (2002) Effects of deslorelin or HCG administration on reproductive performance in first postpartum estrus mares. *Theriogenology*, 58:165-69

Blanchard TL, Macpherson ML (2011) Breeding Mares on Foal Heat In: *Equine Reproduction* 2<sup>o</sup>ed Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.2294-2301

Blanchard TL, Thompson JA, Brinsko SP, Stich KL, Varner DD e Rigby SL (2004) Mating mares on foal heat: a five-year retrospective study. *Proceedings 50th Annual Meeting American Association of Equine Practitioners*:525–30

Blanchard TL, Thompson JA, Love CC, Brinsko SP, Ramsey J, O’Meara A e Varner DD (2012) Influence of day of postpartum breeding on pregnancy rate, pregnancy loss rate, and foaling rate in Thoroughbred mares. *Theriogenology*,77:1290-1296

Bortot DC (2013) Aspectos da reprodução Equina: inseminação artificial e transferência de embrião: revisão de literatura. *Revista científica de medicina veterinária*,ISSN:1679-7353,anoXI(21)

Botelho DLM, Cesar JAW e Filadelpho AL (2007) Odontologia Equina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*- ISSN 1679-7353

Brinsko SP (2006) Insemination doses: How low can we go?. *Theriogenology*,66:543-550

Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Scgumacher J, Love CC, Hinrichs K e Hartman D, Mosby (2011) Sémén collection and artificial insemination with fresh semen In: *Manual of equine reproduction* (3<sup>o</sup>ed) Elsevier, pp.160-175

Bruemmer JE, Brady HA e Blanchard TL (2002) Uterine involution, day and variance of first postpartum ovulation in mares treated with progesterone and estradiol-17b for 1 or 2 days postpartum. *Theriogenology*,57:989–95

Camevale EM e Ginther OJ (1991) Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*,37:1101-15

Camillo F, Marmorini P, Romagnoli S, Vannonzzi, I. e Bagliacca M (1997) Fertility at the first *post partum* oestrous compared with fertility at the following oestrous cycles in foaling mares and with fertility of nonfoaling mares. *Journal of Equine Veterinary Science*,17:612-616

Carnevale EM e Olsen LM (2011) Normal anatomy *In: Equine Reproduction* 2<sup>ed</sup> Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.2003-2008

Carvalho GR, Fonseca FA, Silva Filho JM, Ruas JRM e Borges AM (2001) Avaliação da Utilização do “Cio do Potro” na Coleta de Embriões. *Ver. Bras. zootec*, 30: 1445-50

Conboy HS (2011) Management of stallions in artificial insemination *In: Equine Reproduction* 2<sup>ed</sup> Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.1198-1207

Diária da Republica - 1.<sup>a</sup> SERIE, Nº 144, de 27.07.2006, Pág. 5357

Diária da Republica - 1.<sup>a</sup> SERIE, Nº 165, de 28.08.2013, Pág. 5198

DGAV (2014) Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) Manual de Identificação e registo de equídeos, [http://www.dgv.min-agricultura.pt/xeov21/attachfileu.jsp?look\\_parentBoui=10003122&att\\_display=n&att\\_download=y](http://www.dgv.min-agricultura.pt/xeov21/attachfileu.jsp?look_parentBoui=10003122&att_display=n&att_download=y), acedido a 28/08/2014

FEI (2013) Veterinary regulations 13<sup>o</sup>edition 2013, effective 1 January 2014. Fédération Equestre internationale (FEI) <http://www.fei.org/fei/regulations/veterinary>, acedido a 27/08/2014

Ferris RA, Hatzel JN, Lindholm ARG, Scofield DB e McCue PM (2012) Efficacy of Deslorelin Acetate (SucroMate) on Induction of Ovulation in American Quarter Horse Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*,32:285-288

Fiala SM, Pimentel CA, Hammes AM, Sardinha S, Flores W e Ribeiro DB (2004) Factors affecting postpartum reproductive performance in Thoroughbred mares. *Hovemeyer Foundation Monograph*,14:16-18

Fortier L (2011) The soft tissues: Clinical use of stem cells, Marrow components, and other growth factors *In: Lameness in the Horse* (2<sup>ed</sup>) Ross MW e Dyson SJ, Elsevier Saunders, pp.761-763

Gastal EL, Gastal MO e Ginther OJ (2006) Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to

changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Society for Reproduction and Fertility* ISSN 1470–1626

Gaughan EM, Nixon AJ, Krook LP, Yeager AE, Mann KA, Mohammed H e Bartel DL (1991) Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses. *Am J Vet Res*,52(5):764-73

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO e Beg MA (2007) Incidence, Endocrinology, Vascularity, and Morphology of Hemorrhagic Anovulatory Follicles in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(3):130-139

Ginther OJ, Gastal EL, Rodrigues BL, Gastal MO e Beg MA (2008) Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Periovulatory Hormones: What's New? *Theriogenology*, 69:583–590

Gomes RG, Oliveira RL, Schutzer CGC, Barreiros TRR e Seneda MM (2014) Effect of Deslorelin and/or Human Chorionic Gonadotropin on Inducing Ovulation in Mares During the Transition Period Versus Ovulatory Season. *Journal of Equine Veterinary Science*, (article in press)

Gomez CC, Flores JM, Sanchez J, Rodriguez A e Sanchez MA (1995) Histological changes in the uterus during the postpartum in the mare. *Anat Histol Embryol*,4:19–23

Griffin PG eGinther OJ. (1991) Uterine morphology and function in postpartum mares. *Journal of Equine Veterinary Science*,11:330–9

Gunduz MC, Kasikci G e Ekiz B (2008a) Follicular and steroid hormone changes in Arabian mares in the postpartum period. *Animal Reproduction Science*, 109: 200-5

Gunduz MC, Kasikci G e Kaya HH (2008b) The effect of oxytocin and PGF<sub>2α</sub> on the uterine involution and pregnancy rates in postpartum Arabian mares. *Animal Reproduction Science*, 104: 257-63

Gygax AP, Ganjam VK e Kenney RM (1979) Clinical microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*, 27:571–8.

Hafez B e Hafez ESE (2004a) Anatomia da reprodução Feminina In: *Reproduction in farm animals* (7ªed) Hafez ESE. Philadelphia, pp13-29

Hafez ESE e Hafez B (2004b) Equinos In: *Reproduction in Farm Animals*, (7ªed) Hafez ESE, Philadelphia, pp. 193-218

Hartman DL (2011) Embryo transfer *In: Equine Reproduction* 2ºed Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.2871-2879

Henneke DR, Potter GD, Kreider JL (1984) Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*;21:897-909.

Hodge SL, Kreider JL, Potter GD, Harms PG e Fleeger JL (1982) Influence of photoperiod on the pregnant and post partum mare. *Am. J. vet. Res.*,10:1752-1755.

Ishii M, Shimamura T, Utsumi A, Jitsukawa T, Endo M, Fukuda T e Yamanoi T (2001) Reproductive Performance and factors that decrease pregnancy rate in heavy draft horses bred at the foal heat. *Journal of Equine Veterinary Science*,21(3):131-13

Jacob JC, Gastal EL, Carvalho GR, Beg MA e Ginther OJ (2009) Follicle Deviation in Ovulatory Follicular Waves with One or Two Dominant Follicles in Mares. *Reprod Dom Anim*,44:248-254

Jischa S, Walter I, Nowotny N, Palm F, Budik S, Kolodziejek J e Aurich C. (2008) Uterine involution and endometrial function in postpartum pony mares. *Am J Vet Res*,69:1526-34.

Kainer AR (2011) Internal Reproductive Anatomy *In: Equine Reproduction* 2ºed Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.1583-96

LeBlanc MM (2011) Oxytocin *In: Equine Reproduction* 2ºed Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.1830-1835

LeBlanc MM e Mckinnon AO (2011) Breeding the problema mare *In: Equine Reproduction* 2ºed Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.2621-2642

Ley WB, Bowen JM, Sponenberg DP e Lessard PN (1989) Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: Effects upon endometrial histological features and biopsy classification. *Theriogenology*, 32(2):293-276

Liu JKM e Troedsson MHT (2008) The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology*,70:415-420

Lottlewood JD e Heidman P (2006) The skin *In: Equine Manual*, Higgins AJ e Snyder JR, Elsevier Saunders, pp.353-363

Loy RG (1980) Characteristics of postpartum reproduction in the mare. *Vet Clin North Am Large Anim Prac*,2:345-59

Macpherson ML e Blanchard TL (2005) Tutorial Article - Breeding mares on foal-heat. *Equine Vet. Educ.*,17: 44-52

Madill S, Troedsson MHT, Santschi EM e Malone ED (2002) Dose-response effect on intramuscular oxytocin treatment on myometrial contraction of reproductive normal mares during estrus. *Theriogenology*,58:479:481

Maia L, Souza MV, Júnior JIR, Oliveira AC, Alves GES, Benjamin LA, Silva YFRS, Zandim BM e Moreira JCL (2009) Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Induced Tendinopathy in Horses: Histologic Evaluation. *Journal of Equine Veterinary Science*,29(8):618-626

Malschitzky E, Schilela A, Mattos ALG, Garbade P, Gregory RM e Mattos RC (2002) Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and of different management techniques on the postpartum fertility of Thoroughbred mares. *Theriogenology*,58:495–8

McCue PM (2011) Transferência de embriões em equinos: avaliação do embrião. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*,9(3):80–83

McCue PM e Ferris RA (2011) The abnormal estrous cycle *In: Equine Reproduction* 2<sup>ed</sup> McKinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.1754-1768

McKinnon AO, Squires EL, Harrison LA, Blach EL e Shideler RK (1980) Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed postpartum ovulatory cycles. *J Am Vet Med Assoc*,192:350–3

Meyers PJ, Bonnett BN, McKee SL (1991) Quantifying the occurrence of early embryonic mortality on three equine breeding farms. *Can Vet J*, 33:665-72

Minitube (2014) Animal reproduction technology Equine, *Minitube*, Catalogue reproduction technology equine. [http://www.minitube.de/DE\\_eng/Media/Library/Catalogues](http://www.minitube.de/DE_eng/Media/Library/Catalogues), acessado a 05/09/2014

Morel MCGD, Newcombe JR e Hinchliffe J (2009) The relationship between consecutive pregnancies in Thoroughbred mares. Does the location of one pregnancy affect the location of the next, is this affected by mare age and foal heat to Conception interval or related to pregnancy success. *Theriogenology*,71:1072–8.

Morel MCGD, Newcombe JR e Lauber M (2012) Manual reduction of multiple embryos in the mare: The effect on subsequent pregnancy outcome. *The Veterinary Journal*,192:322-325

Nagy P, Guillaume D e Daels P (2000) Seasonality in mares. *Animal Reproduction science*,60-61:245-262

Nagy P, Huszenicza G, Juhasz J, Kulcsar M, Solti L, Reiczigel J e Abavary K (1998) Factors influencing ovarian activity and sexual behavior of *post partum* mares under farm conditions. *Theriogenology*,50, 1109-1119

Newcombe JR (2000) Embryonic loss and abnormalities of early pregnancy. *Equine Veterinary Educatio*,12:88-101

Newcombe JR, Paccamonti D e Cuervo-Arango J (2011) Reducing the examination interval to detect ovulation below 12h does not improve pregnancy rates after postovulatory insemination with frozen/thawed semen in mares. *Animal Reproduction Science*,123:60-63

Panasophonkul S, Lohachit C e Sirivaidyapongh S (2007) Postpartum Ovarian Activity and Serum Estradiol-17beta Level in Thai Crossbred Native Mares. *Reprod Dom Anim*,42:6-10

Portas M (2003) Identificação de Equinos. Resenho, Merial, Serviço Nacional de coudélico, pp-26-27

Ross MW (2011) The lameness examination: Movement *In: Lameness in the Horse* (2<sup>o</sup>ed) Ross MW e Dyson SJ, Elsevier Saunders, pp.64-79

Ross MW, Genovese RL, Dyson SJ e Jorgensen JS (2011) Superficial digital flexor tendonitis *In: Lameness in the Horse* (2<sup>o</sup>ed) Ross MW e Dyson SJ, Elsevier Saunders, pp.707-726

Samper JC (2001) Management and fertility of mares breed with frozen semen. *Animal Reproduction Science*,68:219–228

Scott QW e Miller WH (2011) Equine Dermatology (2<sup>o</sup>ed), Elsevier Saunders, pp.152-159

Sharma S, Morel MCGD e Dhaliwal GS (2010) Factors affecting the incidence of postpartum oestrus, ovarian activity and reproductive performance in Thoroughbred mares bred at foal heat under Indian subtropical conditions. *Theriogenology*,74:90-99

Sharma S, Morel MCGD, Dhaliwal GS e Dadarwal D (2009) The Pattern of Embryonic Fixation and its Relationship to Pregnancy Loss in Thoroughbred Mares. *Reprod. Dom. Anim*,45:e61-e67

Siddiqui MA, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA e Ginther OJ. (2009) Effect of HCG in the presence of HCG antibodies on the follicle, hormone concentrations, and oocyte in mares. *Reprod Domest Anim*;44:474-9.

Sieme H, Bonk A, Hamann H, Klug E e Katila T (2004) Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*,62:915-928

Sieme H, Katila T e Klug E (2004) Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology*,61:769-784

Silva MAC e Alvarenga MA (2011) Fungal endometritis *In: Equine Reproduction 2ºed* Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.2643-2651

Silva MF, Gomes T, Dias AS, Marques JA, Jorge LM, Faísca JC, Pires GA e Caldeira RM (2003) Estimativa da idade dos equinos através do exame dentário. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*,98:103-110

Squires E, Barbacini S, Matthews P, Byers W. Schwenzer K, Steiner J e Loomis P (2006) Retrospective study of factors affecting fertility of fresh, cooled and frozen semen. *Equine Vet Educ*,18:96-99

Staempfli SA (2011) Prostaglandins *In: Equine Reproduction 2ºed* Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.1797-1803

Stanton ME (2011) Uterine Involution *In: Equine Reproduction 2ºed* Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.2291-93

Steiger K, Dersten F, Aupperle H, Schoon, D e Schoon, HA (2001) Puerperal involution in the mare - a comparison of clinical signs and pathology. *Pferdeheilkunde*,17:627-632

Steiger K, Kersten F, Aupperle H, Schoon D e Schoon, HA (2002) Puerperal involution in the mare - morphological studies in correlation with the course of birth. *Theriogenology*,58:783-786

Stout TAE (2008) Fungal endometritis in the mare. *Pferdeheilkunde*, 24(1):83-87

Vanderwall DK (2011) Early embryonic loss *In: Equine Reproduction 2ºed* Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.2119-2122

Várquez MAV (2000) Las heridas en las urgências equinas. Consulta de difusión Veterinaria,68:67-73

Vetpro (2008) Animalintex© *Veterinary Professional Services Ltd* <http://www.vetpro.co.nz/Products/Robinson+Range/Animalintex/How+to+use+Animalintex.html>, acedido a 20/08/2014

Vickers JG, Warren LK, Silva LA, Sharp DC e Larson CA (2009) Replacement of Sulfate Trace Minerals with Amino Acid Complexes in Mare Diets and its Effects on Early Postpartum Reproductive Performance. *Abstracts*,29(5):391-2

Williams DL e Miller TR (2006) Ophthalmology *In: Equine Manual*, Higgins AJ e Snyder JR, Elsevier Saunders, pp.1174-1178

Winter GHZ, Rubin MIB, Corte FD, e Silva CAM (2007) Gestational length and first postpartum ovulation of Criollo mares on a stud farm in Southern Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science*,27:531-534

Woodie JB (2012) Vulva, Vestibule, vagine and cervix *In: Equine Surgery* (4ªed) Auer JA e Stick JA, Elsevier Saunders, pp:866-882

Zent WW e Steiner JV (2011) Vaginal examination *In: Equine Reproduction* 2ºed Mckinnon AO, Squires EL, Wendy EV, Varner DD, Wiley-Blackwell, pp.190

V - ANEXOS

**Anexo 1:** Desenvolvimento folicular e alterações hormonais durante o ciclo éstrico da égua.

Day of cycle	Stage of the cycle	Hormone concentration in the peripheral circulation	Occurrence within the (later) dominant follicle
7	Development of the follicular wave	• FSH ↑	• Emergence • Growth (all follicles of the wave)
13	Follicle deviation	• FSH ↓ • Oestradiol-17β ↑ • Inhibin ↑	• Continued growth (3 mm per day) • Activation of deviation mechanisms: • Sensitivity to FSH ↑ • Free IGF-1 ↑ • Inhibin ↑ • Oestradiol ↑
17	Beginning of the preovulatory phase	• LH ↑ • Oestradiol-17β ↑	• Continued growth (3 mm per day)
19	Preovulatory phase	• LH → • Oestradiol-17β ↑	• Stagnation of growth • Maturation (characteristic pattern in the expression of different factors, e.g. PGE ↑, PGF <sub>2α</sub> ↑, prostaglandin dehydrogenase ↑)
21	Ovulation	• LH ↑ • Progesterone ↑	• Granulosa cells → luteinization • Progesterone ↑ • Vascularization ↑

Tabela 1 - Desenvolvimento folicular durante o ciclo éstrico: tamanho dos folicúlos, concentração hormonal na circulação periférica e desenvolvimento do folicúlo dominante (Aurich 2011)

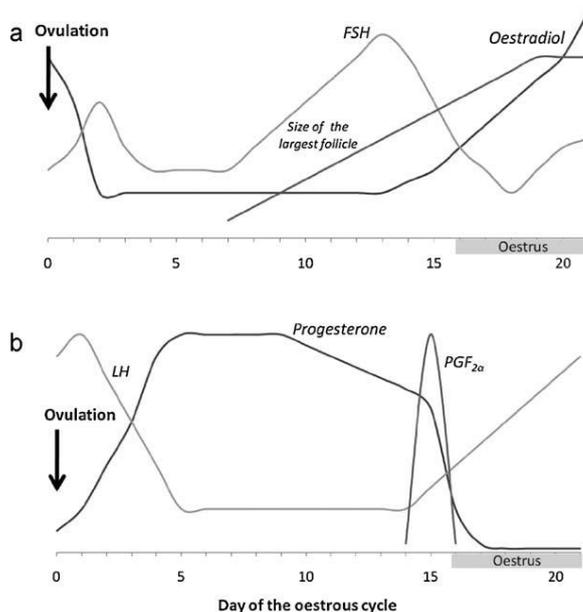
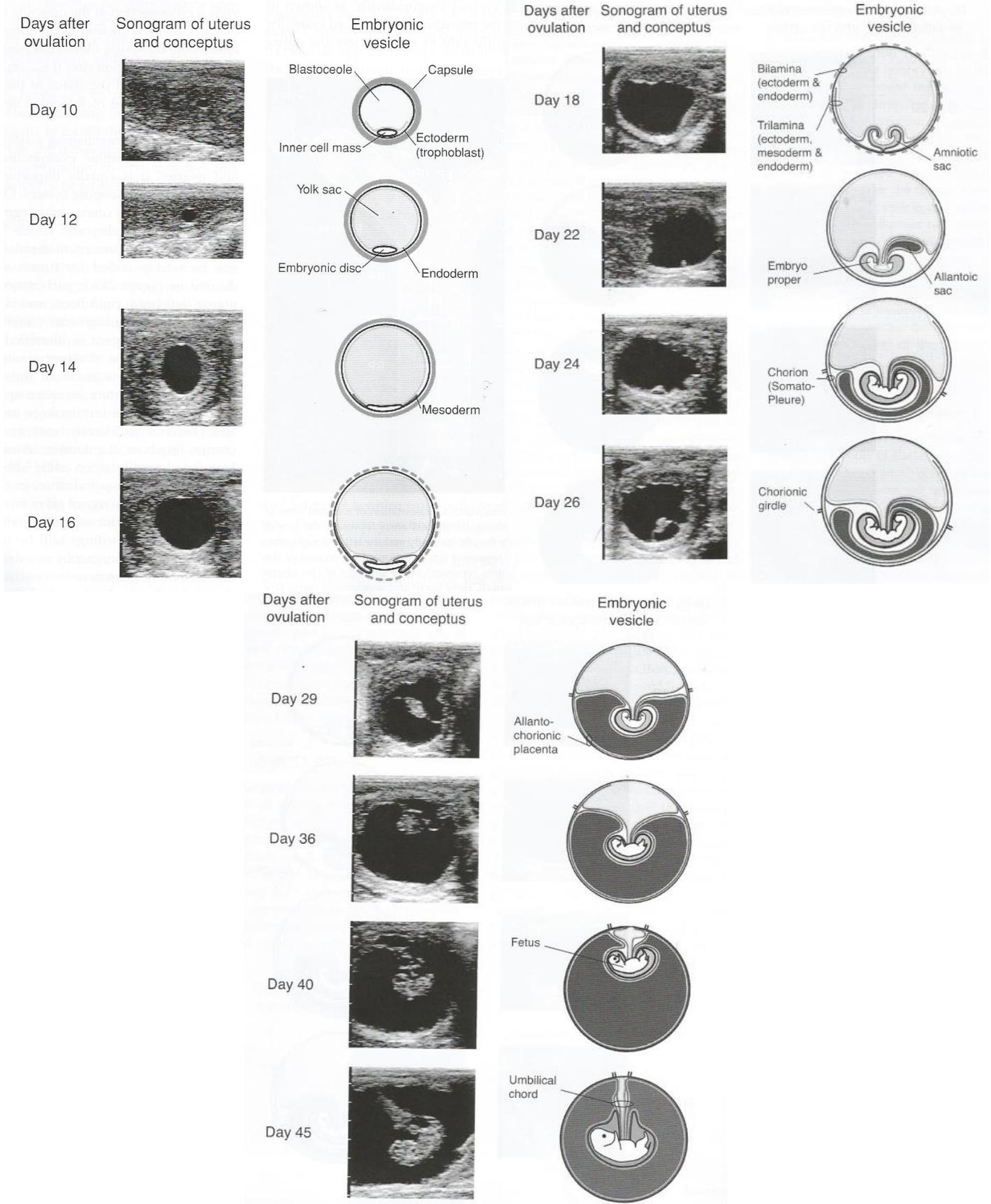
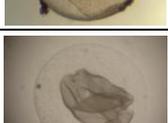


Gráfico 1- Gráfico representação das alterações hormonais durante o ciclo éstrico. a) Concentração de FSH e estradiol na circulação periférica e tamanho folicular; b) Concentração de LH, progesterona e PGF<sub>2α</sub> na circulação periférica (Aurich 2011)

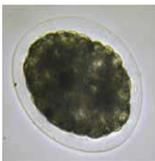
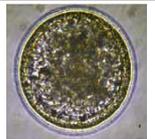
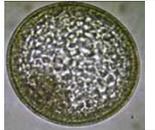
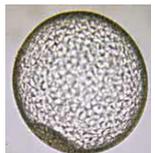
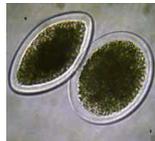
**Anexo 2:** Diagrama representativo da embriologia da concepção e respetivas imagens ecografias em relação ao dia da gestação relativo à ovulação (Bergfelt e Adams 2011)



**Anexo 3:** Classificação do embrião de 1 a 4 segundo a sua qualidade e descrição (McCue 2011) e na última coloca imagens de blastocistos por grau de qualidade (Camargo *et al.* 2013)

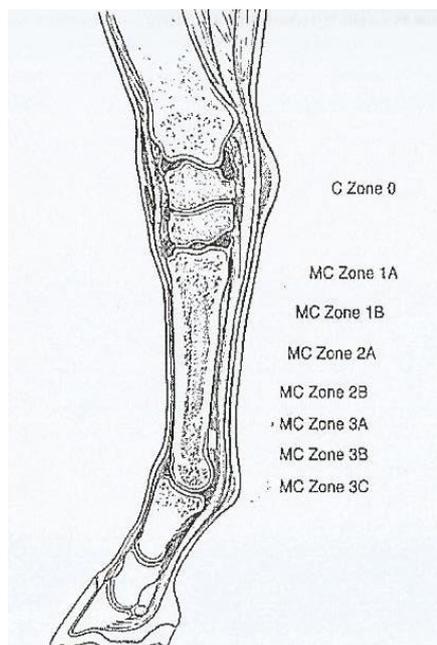
Grau	Comentário	Descrição	Observação à lupa
1	Excelente	Sem anomalias visíveis; formato esférico; células de tamanho, cor e textura uniformes; tamanho e fase de desenvolvimento adequados para a idade pós-ovulação	
2	Bom	Imperfeições mínimas, como alguns blastômeros extrusados; pequenas irregularidades de formato, tamanho, cor ou textura; pouca separação entre a camada trofoblástica e a zona pelúcida ou cápsula	
3	Mau	Nível moderado de imperfeições, como grande percentual de blastômeros extrusados ou degenerados; colapso parcial da blastocele ou afastamento moderado do trofoblasto da zona pelúcida ou cápsula	
4	Degenerado	Problemas graves de fácil identificação, como alto percentual de blastômeros extrusados, colapso total da blastocele, rutura da zona pelúcida ou degeneração completa e morte do embrião.	

**Anexo 4:** Fases de desenvolvimento do embrião e respetivas imagens

Estágio	Tamanho (µm)	Descrição	Observação à lupa
Mórula	150 a 200	Massa sólida de blastômeros; zona pelúcida espessa; blastômeros inicialmente grandes e passíveis de identificação individual, depois agregados compactos de blastômeros menores; borda externa dos blastômeros de aparência “serrilhada”; possibilidade de identificação do espaço perivitelínico entre os blastômeros e a zona pelúcida; rolamento à manipulação	
Blastocisto inicial	150 a 250	Zona pelúcida espessa; início da formação da blastocele entre os blastômeros; mínimo espaço perivitelínico, tamanho semelhante ao da mórula	
Blastocisto	150 a 300	Blastocele circundada por uma camada de células trofoblásticas; massa celular interna distinta; cápsula evidente entre a camada de trofoblastos e a zona pelúcida; zona pelúcida fina	
Blastocisto expandido	300 a > 1.000	Blastocele grande circundada por uma camada fina de células trofoblásticas; células trofoblásticas pequenas e de aparência uniforme; massa celular interna distinta insinuada no interior da blastocele; zona pelúcida ainda presente ou já desaparecida; cápsula aderida ao embrião ou levemente destacada; diâmetro do embrião variável de acordo com a idade	
Ovócito não fertilizado	125 a 150	Zona pelúcida espessa; formato oval; plano, não rola à manipulação; membrana celular e citoplasma podem se apresentar degenerados ou fragmentados	



**Anexo 6:** Demonstração das zonas ecográficas da região do carpo e metacarpo (Ross 2011)



**Anexo 7:** Tabelas da estimativa da idade dos cavalos pela observação dos incisivos temporários e definitivos inferiores (Silva et al. 2003)

**Tabela 1 - Incisivos temporários e definitivos inferiores, idades de erupção e em que atingem o nível da arcada**

	Incisivos Temporários	Incisivos Definitivos	
	Erupção	Erupção	Atingem o nível da arcada
Pinças	1ª semana	2,5 anos	3 anos
Médios	4/6 semanas	3,5 anos	4 anos
Cantos	6/9 semanas	4,5 anos	5 anos

**Tabela 2 - Incisivos definitivos inferiores - Idades de rasamento, nivelamento, aparecimento da estrela dentária e alteração da sua forma e posição na mesa dentária**

	Rasamento	Aparecimento da estrela dentária	Nivelamento	Estrela dentária central	Estrela dentária arredondada
Pinças	6/7 anos	7/8 anos	12/15 anos	10/13 anos	10/15 anos
Médios	7/8 anos	8/9 anos	13/15 anos	10/15 anos	11/15 anos
Cantos	8/9 anos	9/10 anos	13/15 anos	10/15 anos	11/15 anos

**Tabela 3 - Incisivos definitivos inferiores - idades de alteração da forma da mesa dentária**

	Mesa dentária redonda	Mesa dentária triangular	Mesa dentária oval
Pinças	8/12 anos	13/18 anos	>18
Médios	9/13 anos	15/19 anos	>19
Cantos	11/14 anos	17/20 anos	>20