

I. ENQUADRAMENTO

O estágio foi realizado em dois locais distintos. A primeira parte foi realizada na Hippiátrica - Equine Medical Center, com o acompanhamento do Dr. Manuel Torrealba e da Dra. Ana Ferreira, no período entre 1 de Fevereiro e 4 de Março de 2013. Já a segunda parte foi realizada com a Dra. Marta Usón Olaso no Monte da Pereira, de 11 de março a 11 de junho de 2013.

O estágio foi bastante abrangente e teve como objetivo principal o acompanhamento das mais diversas atividades da clínica, cirurgia e reprodução equina, dando assim uma perspetiva bastante completa do trabalho que é possível realizar-se com equinos. Durante o mesmo foi acompanhado o funcionamento normal tanto nas clínicas como em ambulatório, de modo à máxima aquisição de conhecimentos e à sua aplicação prática.

Este relatório tem como objetivo descrever as atividades acompanhadas durante o período de estágio, assim como o desenvolvimento de um tema acompanhado durante o mesmo que despertou especial interesse na estagiária, tendo sido selecionada a transferência de embriões em equinos.

II. CASUÍSTICA

1. Estágio em clínica e cirurgia equina

No decorrer deste estágio realizado na Hipiatrica, equine medical center foram acompanhados catorze casos, tendo sido três de patologia cirúrgica, dez de patologia médica e um caso de medicina preventiva.

A clínica possui um escritório e sala de estudo, uma sala destinada à limpeza do material e armazenamento de parte do *stock*, uma divisão de preparação pré-cirúrgica, sala de indução e recuperação de anestesia, sala de cirurgia e três boxes para animais internados - Figuras 1 a 4.



Figura 2 - Sala de cirurgia
Imagens cedidas por Rafael Lopes



Figura 4 - Sala de limpeza e armazenamento
Imagens cedidas por Rafael Lopes

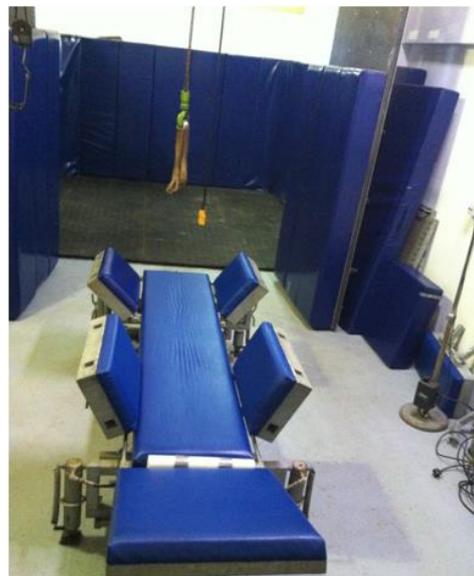


Figura 1 - Sala de indução de anestesia e mesa de cirurgia
Imagens cedidas por Rafael Lopes



Figura 3 - Sala de cirurgia
Imagens cedidas por Rafael Lopes

Conforme se pode observar no Gráfico 1, no domínio da **clínica médica** foram acompanhados um total de dez casos, dos quais cinco foram de dentisteria, quatro de ortopedia e um caso de sistema respiratório superior.

Os casos de dentisteria foram correções de rotina da mesa dentária em animais de desporto.

No caso de sistema respiratório superior foi acompanhada uma endoscopia, por haver suspeita de hemiplegia laríngea. No entanto não foram encontradas alterações.

Nos casos de ortopedia, a estagiária acompanhou:

- um abscesso de casco, onde se assistiu à remoção do último penso - realizado com Animalintex® e metronidazol em pó - e ao exame final de claudicação, não sendo já visível claudicação.
- um caso de claudicação, com infiltração da articulação interfalângica distal, onde se assistiu à remoção do penso e ao exame de claudicação pós-infiltração.
- dois casos de claudicação, onde se assistiu ao exame de claudicação e à infiltração da articulação femorotibio Patelar medial.

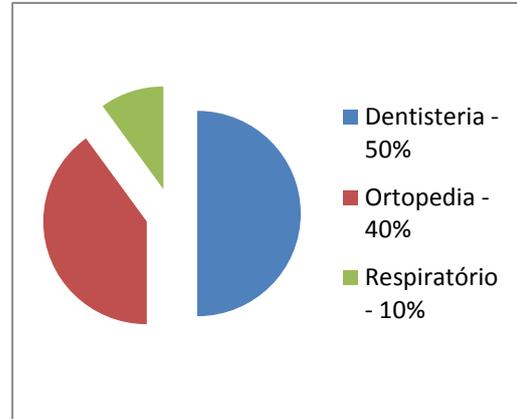


Gráfico 1 - Casuística da patologia médica

No âmbito da **medicina preventiva** foi realizada uma vacinação contra o tétano e a influenza equina. Em Portugal, não existe vacinação obrigatória para os equinos. Existe sim a obrigatoriedade de vacinação contra a influenza equina nos cavalos que competem em provas regidas tanto pela Federação Equestre Portuguesa (FEP) como pela Federação Equestre Internacional (FEI).

A influenza equina é uma doença respiratória viral altamente contagiosa e de elevada prevalência mundial. As regras da FEI, seguidas também pela FEP, obrigatórias para todos os equinos que competem são as seguintes (FEI 2005):

- Primovacinação: duas doses com um intervalo entre elas de 21 a 92 dias, seguidas de uma terceira dose após seis meses, com uma tolerância de 21 dias.
- Reforços vacinais: todos os cavalos que pretendem competir devem ter uma vacinação contra a influenza equina nos últimos seis meses e 21 dias, não podendo esta ser nos sete dias precedentes à entrada no concurso. No caso de

entre a terceira dose da primovacinação e o reforço vacinal terem decorridos mais de 365 dias, torna-se necessária uma nova primovacinação.

O tétano é uma doença causada pelas toxinas da bactéria anaeróbica *Clostridium tetani*, que em 80% dos casos se revela fatal. Esta bactéria é encontrada nas fezes e solo por todo o mundo, sendo que a porta de entrada são as feridas. Estes dois fatores fazem com que a vacinação contra esta doença seja recomendada. Sellon & Long (2007) recomendam o seguinte esquema de vacinação contra o tétano:

- Primovacinação
 - ◆ Poldros de éguas vacinadas: primeira dose aos seis meses, segunda dose aos sete meses e uma terceira dose entre os nove e os dez meses de idade.
 - ◆ Poldros de éguas não vacinadas: primeira dose entre os três e quatro meses, segunda dose entre os quatro e os cinco meses e terceira dose entre os seis e os oito meses de idade.
- Reforços vacinais anuais para todos os cavalos. É ainda recomendado para as éguas gestantes um reforço quatro a oito semanas antes da data prevista do parto.

No domínio da **clínica cirúrgica**, o estagiário teve a oportunidade de acompanhar três casos. Dois foram o seguimento pós-cirúrgico em ambulatório de uma cólica e de uma neurectomia, o terceiro foi o seguimento da cirurgia e do internamento de um cavalo com artrite séptica.

No caso de acompanhamento pós-cirúrgico de cólica deve-se verificar o estado geral do animal assim como o estado da sutura. A sobrevivência pós-cirúrgica tem aumentado em pacientes com cólicas de resolução cirúrgica. No entanto, também aumentou a importância das complicações pós-cirúrgicas que não sendo fatais podem por em causa o regresso às funções anteriores do paciente. No pós-cirúrgico as complicações podem levar a uma hospitalização prolongada ou recidiva de cólica por vezes com necessidade de voltar a operar o paciente, com custos acrescidos para o proprietário (French *et al.* 2002; Launois *et al.* 2006).

As complicações mais comuns são a tromboflebite jugular, hemorragia intra-abdominal, peritonite, novo episódio de cólica, íleo paralítico, endotoxemia, diarreia, aderências, infecção/deiscência da sutura com possível hérnia abdominal. Segundo French *et al.* (2002) 32% dos pacientes sofrem de uma ou mais complicações pós-cirúrgicas referidas anteriormente. Segundo os mesmos autores 16% sofrem de infecção incisional, 10% de tromboflebite e 8 a 10% sofrem de hérnia ou necessidade de nova cirurgia. Launois *et al.* (2006) reviram os casos de 100 cavalos sujeitos a resolução cirúrgica de cólica. Obtiveram uma taxa de sobrevivência de 91% 15 dias após a cirurgia (excluindo nove que foram eutanasiados

na mesa de cirurgia) e de 87% após quatro meses, sendo que ao fim de um ano 91% dos proprietários que responderam ao inquérito afirmaram que os animais continuavam vivos. Neste estudo 17% (17/100) dos pacientes apresentaram edema da ferida, 9% íleo paráltico, 8% endotoxemia, 1% peritonite e 1% infecção e hérnia da sutura. De referir ainda que 11 dos pacientes foram sujeitos a duas intervenções cirúrgicas, sendo que três foram eutanasiados e oito recuperaram. Launois *et al.* (2006) questionaram ainda os proprietários relativamente à recuperação da atividade anterior por parte dos cavalos, tendo obtido que dos 34 que responderam 28 (82%) estavam de volta ao desporto (70% recuperaram totalmente em seis meses e 30% só apresentaram recuperação total ao fim de um ano), um (3%) era uma égua de criação e dois (6%) ainda se encontravam em reabilitação. A incidência da tromboflebite parece ter uma relação linear com o volume de plaquetas aquando da admissão do paciente e parece ainda aumentar bastante quando os pacientes apresentam uma frequência cardíaca superior a 60 batimentos cardíacos por minuto, sendo por sua vez a frequência cardíaca relacionada com a endotoxemia (French *et al.* 2002; Launois *et al.* 2006; Dukti & White 2008).

O hemoperitoneu foi associado a hemorragia do mesentério ou do local da enterotomia, por deiscência na sutura. Os animais que sofrem desta complicação apresentam todos os sinais de hemorragia aguda: taquicardia, mucosas pálidas, depressão, fasciculações musculares, cólica e diminuição severa do número de plaquetas (Dukti & White 2008).

A peritonite tem uma taxa de mortalidade associada de 30 a 67%. Os sinais clínicos que se verificam são febre, cólica, perda de peso, diarreia, taquicardia e desidratação. O diagnóstico é feito por abdominocentese. A peritonite pós-cirúrgica tem uma taxa de mortalidade superior (56%) à taxa de mortalidade associada a peritonites sem cirurgia prévia e sem perfuração intestinal (43%). Nova cirurgia pode ser necessária para remover bactérias, material estranho, endotoxinas, detritos celulares, mediadores da inflamação, fibrina, fluido livre e hemoglobina. Normalmente é colocado um dreno de modo a poder-se drenar ou mesmo voltar a lavar posteriormente. As lavagens pelo dreno também vão baixar o risco de formação de aderências (Dukti & White 2008).

A incidência de íleo paráltico como complicação pós-cirúrgica foi associada a obstrução por lipoma pedunculado e mais uma vez com o volume de plaquetas. A explicação apresentada como possível para esta relação com as plaquetas seria um sequestro dos fluidos no intestino delgado, que levam a uma concentração do sangue, que podem provocar esta condição (French *et al.* 2002).

A incidência de diarreia pós-cirúrgica foi relacionada com cirurgia do intestino grosso e crescimento de *Salmonella spp.* e *Clostridium difficile*. Normalmente ocorre no pós-cirúrgico

imediatamente e deve-se alertar o proprietário do paciente para o risco sanitário e para a necessidade de isolar o animal dos outros (Mair 2011).

A incidência de infecção da sutura foi de 5 a 40% e não teve variações significativas em modelos de multivariáveis nem mesmo na escolha de diferentes antibióticos ou na realização ou não de enterotomia. Dukti & White (2008) referem que a aplicação de antibioterapia tópica aquando do encerramento da incisão reduz as taxas de infecção da sutura. Qualquer drenagem pela incisão, exceto uma pequena hemorragia poucas horas imediatamente após a cirurgia, sugere uma deficiente cicatrização dos tecidos, que leva a atrasos na cicatrização e predispõe à formação de hérnias. O uso de ligaduras abdominais tem sido relacionado com diminuição das infeções, mas em caso de infeção é necessário decidir rapidamente entre manter a ligadura ou retirá-la para favorecer a drenagem. O tratamento pode passar pela drenagem adequada, eventual remoção de tecidos desvitalizados, pontos ou agrafos e limpeza tópica. Normalmente o paciente já está a fazer antibioterapia, no entanto pode ser necessário fazer cultura do fluido drenado e um teste de resistência aos antibióticos para se poder ajustar o tratamento. A infeção aumenta o risco de hérnia e como tal o período de exercício restrito deve aumentar pelo menos oito a 10 semanas após a resolução da infeção (French *et al.* 2002; Dukti & White 2008; Klohnen 2009; Mair 2011).

A ocorrência de hérnia intestinal através da sutura verificou-se ser quatro vezes superior em pacientes com infeção da sutura, sendo então apontada como a maior causa de herniação. As outras causas apontadas são a deiscência da sutura ou na parede abdominal e o retorno precoce ao exercício. A força da parede abdominal só recupera bastantes meses depois da cirurgia. Os cavalos devem ser restritos à boxe por um período de seis a oito semanas, devendo andar diariamente a passo à mão. Deve-se então reavaliar a sutura e colocar o cavalo a pasto por mais seis semanas. Ao final destes três meses já se considera o risco de hérnia reduzido e o paciente pode então voltar gradualmente ao exercício. Foram descritos dois tipos de hérnias, as tradicionais com um saco herniário redutível e as hérnias por estrangulamento de algumas camadas da incisão. Nem sempre a resolução passa pela cirurgia. O uso temporário de um cinto de hérnia pode reduzir bastante o tamanho da mesma. No caso de se optar pela correção cirúrgica é necessário esperar que os sinais de infeção e inflamação desapareçam (dois a três meses). Foi ainda relatada a deiscência da sutura como muito rara, menos de 3%, e como acontecendo normalmente nos três a oito dias após a cirurgia, quando normalmente os pacientes ainda se encontram internados. A incidência da deiscência aumenta quando o hematócrito aumenta nas primeiras 12 horas pós-cirúrgicas e aumenta ainda com o prolongamento do tempo da cirurgia. As ligaduras ou os cintos abdominais não previnem a evisceração, pelo que é necessário corrigir cirurgicamente (French *et al.* 2002; Dukti & White 2008; Mair 2011).

A recidiva de cólica após cirurgia não é considerada uma verdadeira complicação pós-cirúrgica, mas leva a aumento de mortalidade, morbidade e custos associados. Foi maior em pacientes que foram sujeitos a mais que uma cirurgia ou que apresentavam inicialmente torsão do cólon (French *et al.* 2002).

No outro caso acompanhado em ambulatório tinha-se realizado uma neurectomia e na visita de acompanhamento pós-cirúrgico administrou-se triamcinolona por via subcutânea no local da cirurgia - para prevenir a formação de aderências e neuromas.

O caso seguido durante o internamento foi um caso de ortopedia, de artrite séptica társica bilateral, num cavalo adulto. O termo "artrite séptica" descreve a entrada de agentes patogénicos no espaço sinovial de uma articulação dando origem a inflamação e infeção graves. Quer as células como os mediadores inflamatórios são atraídos para este local para ajudar a eliminar as bactérias. Este processo altera a homeostase "normal" no espaço sinovial, observando-se um aumento da produção de fibrina e da pressão sinovial. A cartilagem articular sofre alterações degenerativas devido à degradação enzimática e a uma nutrição inadequada, aumentando a produção de metabolitos e enzimas dentro do espaço sinovial, perpetuando a inflamação e a destruição dos tecidos da cavidade sinovial. À medida que aumenta a duração da inflamação e as lesões se tornam crónicas, os danos causados podem tornar-se irreversíveis, resultando numa doença com risco de vida ou numa claudicação permanente. Assim, qualquer laceração cuja localização se encontre em estreita proximidade com uma articulação ou bainha de tendão deve ser considerada uma emergência (Meijer *et al.* 2000; Schumacher 2008; Murray 2012; Smith 2013).

Clinicamente, os principais sinais clínicos são: claudicação, cuja gravidade depende da duração da infeção, da patogenicidade da bactéria presente e da pressão dentro da estrutura (sendo esta menor em caso de laceração com a estrutura aberta e com drenagem para o exterior), calor, dor em resposta à flexão ou a pressão localizada e edema. O aumento da temperatura corporal poderá ser observado em algumas ocasiões (Bertone 1999; Meijer *et al.* 2000; Wilderjans 2008; Murray 2012).

Como métodos de diagnóstico podem-se realizar exames radiográficos (onde se pode observar um corpo estranho, ar dentro da estrutura sinovial ou envolvimento ósseo); ecografia cujo método apresenta a vantagem de se interpretar as imagens com relativa facilidade e a sua obtenção em "tempo real"; colheita e análise do líquido sinovial; avaliação de comunicação sinovial através da distensão articular com Lactato de Ringer; radiografia de contraste e cintigrafia. É de salientar a importância da colheita e da análise do líquido sinovial. A análise deverá ser tanto macroscópica, como laboratorial pois permite-nos avaliar a gravidade da inflamação, a patogenicidade da bactéria presente e estabelecer o protocolo terapêutico mais

adequado com base na cultura bacteriana e num teste de sensibilidade a antibióticos. No entanto Wilderjans (2008) refere 27 a 45% de falsos negativos nos cultivos bacterianos de fluido intra-articular. O líquido sinovial séptico normalmente apresenta valores para as proteínas totais acima dos 20g/l e acima de $10 \times 10^9/l$ na contagem total de células nucleadas, sendo os neutrófilos as células inflamatórias predominantes. Para além disso, a comparação entre a concentração de lactato no sangue e no líquido sinovial pode ajudar a diferenciar efusões sépticas de não sépticas. Em caso de artrite séptica observa-se que a concentração de lactato do líquido sinovial é mais elevada do que a do sangue periférico (Wilderjans 2008; Adkins 2012; Murray 2012; Tennent-Brown 2012; Smith 2013)

Os objetivos para o tratamento eficaz da artrite séptica compreendem a remoção de material estranho, o desbridamento de tecidos contaminados, infetados e desvitalizados, a eliminação de microrganismos e metabolitos, a promoção da cicatrização tecidual e restauração de um ambiente sinovial normal. O propósito final do tratamento cirúrgico deverá ser a conversão da cavidade sinovial contaminada/infetada para um estado contaminado mas limpo, permitindo assim que os mecanismos de defesa imunológica e a antibioterapia consigam eliminar os restantes microrganismos. Este objetivo é mais facilmente alcançado cirurgicamente através de artroscopia. Assim, recomenda-se a lavagem articular, desbridamento do aglomerado fibrinocelular intra-sinovial (que promove o desenvolvimento bacteriano e age como uma barreira para difusão da membrana sinovial; por isso, compromete ainda mais nutrição e limita o acesso para a circulação intrassinovial de agentes antimicrobianos). Deve-se incluir também antibioterapia tanto intra-articular como sistémica (com início o mais breve possível), administração de anti-inflamatórios não-esteroides e monitorizar diariamente a evolução do paciente (Bertone 1999; Meijer et al 2000; Wilderjans 2008; Smith 2013).

A antibioterapia sistémica é recomendada em todos os casos por um período prolongado de pelo menos 3 semanas. Em equinos, penicilinas, trimetoprim/sulfadiazina e cefalosporinas têm sido referidas como sendo clinicamente eficazes, uma vez que penetram na cavidade sinovial, em concentrações terapêuticas (Meijer *et al.* 2000).

A administração intra-articular de antibióticos geralmente segue-se à lavagem artroscópica. Uma vantagem da administração intra-articular é a obtenção de concentrações superiores à concentração inibitória mínima. Quando o antibiótico é administrado no local da infeção, em concentrações superiores à concentração inibitória mínima, a eficácia é melhor. Quando disponível, a escolha dos antibióticos deve ser baseada na cultura bacteriana e no teste de sensibilidade a antibióticos. A escolha da antibioterapia é um ponto crítico no tratamento da artrite séptica, só podendo ser utilizados intra-articularmente antibióticos não irritantes para a articulação: gentamicina, amicacina, penicilina sódica, cefazolina e ceftiofur. Murray (2012) refere que a amicacina é preferível à gentamicina por provocar menos inflamação articular e ter

um espectro de ação mais amplo. É ainda recomendada a administração intra-articular pós-cirúrgica de antibióticos em cavalos que claudiquem visivelmente no dia a seguir à cirurgia (Wilderjans 2008; Murray 2012).

Segundo os autores Meijer et al. (2000), o prognóstico de artrite séptica em cavalos adultos é moderado a bom. Muitos fatores afetam o prognóstico, tais como o número de articulações envolvidas, a extensão das lesões ósseas e o tempo decorrido desde o início da infecção. As principais causas do insucesso do tratamento são a incapacidade para eliminar o agente causador e a falha na resposta à terapêutica, por vezes por resistência ao antibiótico utilizado (Lescun 2011; Meijer *et al.* 2000).

O caso acompanhado durante o estágio foi de uma égua de seis anos, Português de Desporto, com aptidão desportiva e 560Kg. A quando da avaliação clínica a égua apresentava claudicação de quatro em cinco nos dois membros posteriores, sendo que a claudicação do membro esquerdo era mais marcada, distensão de ambos os tarsos e lacerações na zona articular com saída de líquido aparentemente sinovial. O exame clínico é o apresentado na Tabela 1.

Os exames complementares pré-cirúrgicos realizados foram: radiografias, hematócrito (32.8%, sendo os valores de referência de 32.0% a 42.0%) e mensuração das proteínas totais (7.2g/dL, sendo os valores de referência de 5.5g/dL a 6.5g/dL). O diagnóstico confirmou-se pela distensão articular com Lactato de Ringer (LR), verificando-se a saída do mesmo pelas lacerações.

Tabela 1 - Exame de estado geral

FC	51 bpm
FR	21 rpm
Mucosas	Rosadas e húmidas
TRC	< 2 seg
Tº	38.7°C
Auscultação Abdominal	Normal nos quatro quadrantes
Pulso Digital	Negativo
Vacina contra o tétano	Sim

Optou-se então pelo tratamento cirúrgico. Avaliou-se artroscopicamente, obteve-se um líquido articular sanguinolento (Figura 8), procedeu-se então à lavagem articular com LR e administração intra-articular de amicacina - Figuras 5 a 10. A amicacina é um aminoglicosídeo que inibe a síntese proteica bacteriana, tendo efeito bactericida (Ramsey 2009).

O protocolo anestésico utilizado foi:

- **Sedação:** Xilazina 20% (1.1mg/Kg - 3.08mL EV) e Butorfanol (0.01mg/Kg - 0.56mL EV)
- **Indução:** Ketamina (2.2mg/Kg - 12.32mL EV) e Diazepam (0.05mg/Kg - 5.6mL EV)
- **Manutenção:** Guaifenesina (GG5% - 500mL EV) e Isoflurano (Inalatório)
- **Recuperação:** Romifidina (0.005mg/Kg - 0.28mL EV)



**Figura 5 - Equino em decúbito dorsal, durante a cirurgia
Imagem gentilmente cedida pela Hippiatrica – Equine Medical Center**



**Figura 6 - Material cirúrgico e posição do cirurgião
Imagem gentilmente cedida pela Hippiatrica – Equine Medical Center**

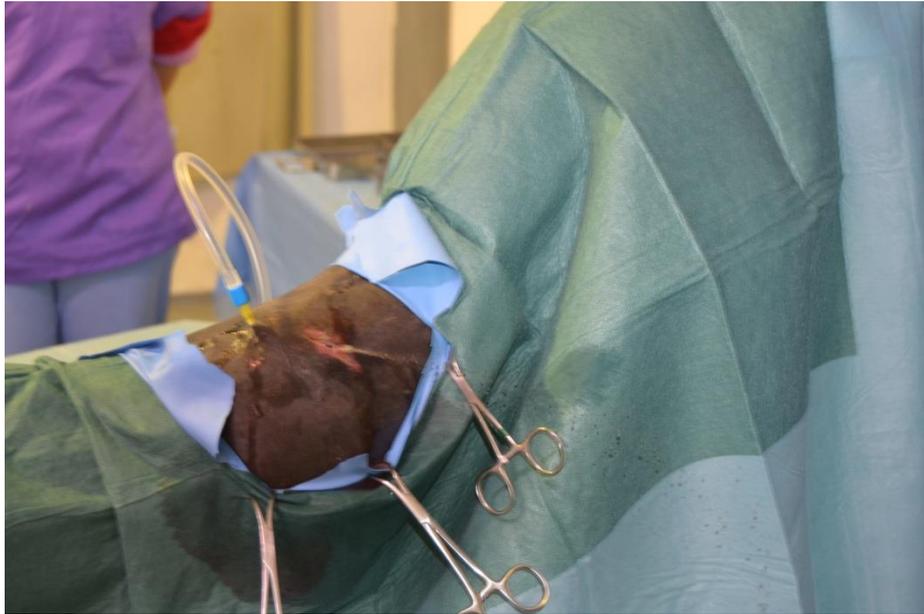
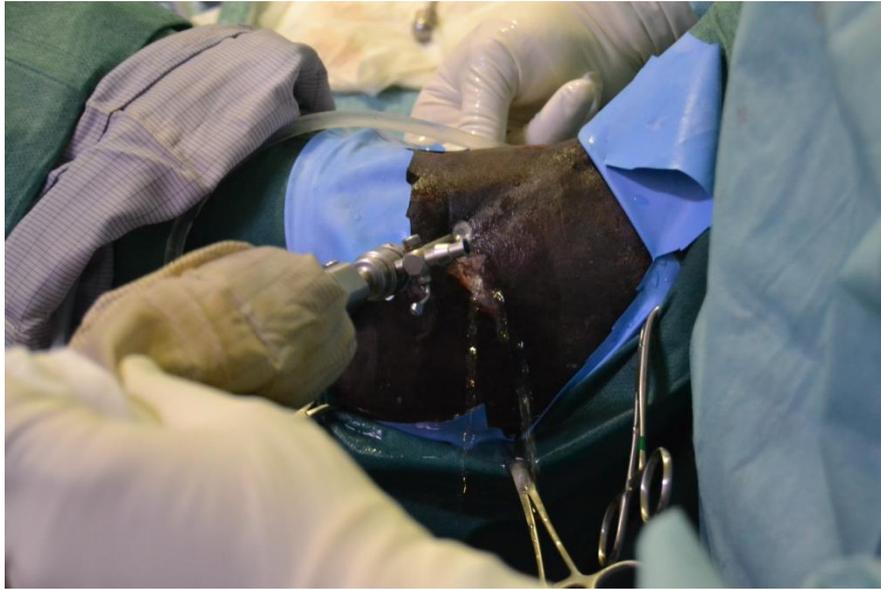


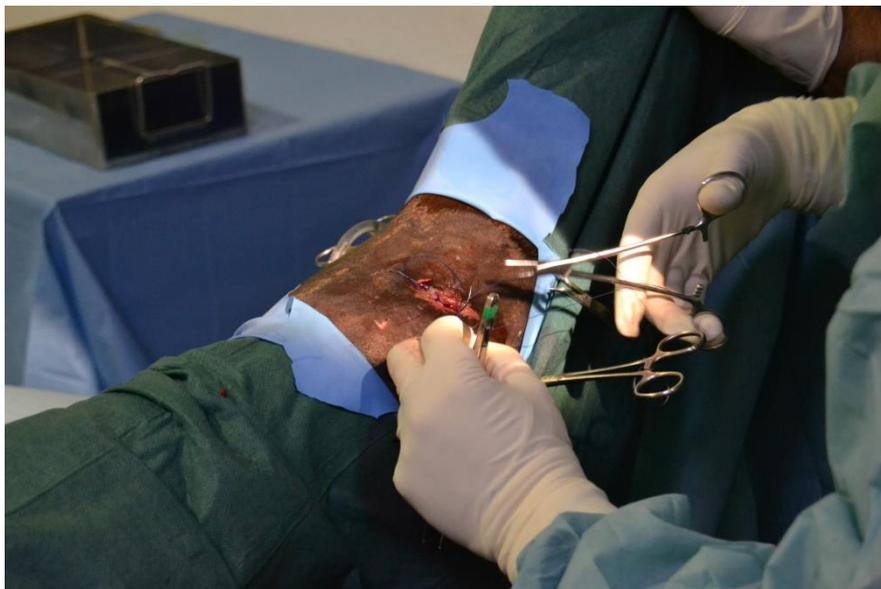
Figura 7 - Distensão articular com LR e saída do mesmo pela laceração
Imagem gentilmente cedida pela Hippiatria – Equine Medical Center



Figura 8 - Líquido articular recolhido.
Imagem gentilmente cedida pela Hippiatria – Equine Medical Center



**Figura 9 - Artrosopia com o LR a extravasar pela laceração
Imagem gentilmente cedida pela Hippiatrica – Equine Medical Center**



**Figura 10 - Sutura da laceração no final da cirurgia
Imagem gentilmente cedida pela Hippiatrica – Equine Medical Center**

Algumas das complicações mais comuns associadas à anestesia geral dos equinos são as miopatias e as neuropatias. Para estas alterações contribuem não só o protocolo anestésico utilizado, como a técnica de posicionamento e a duração da cirurgia e ainda as técnicas utilizadas no recobro. A sobrecarga dos nervos, grupos musculares e tendões juntamente com a hipotensão, hipoxia e a isquemia subsequente podem levar a estes quadros clínicos de miopatias e neuropatias. A paciente apresentou dificuldade pós-cirúrgica em sustentar o peso nos posteriores e manter o equilíbrio. Demonstrava ataxia, longos períodos de decúbito, articulações distais fletidas e fasciculações musculares. Estes sinais levaram à suspeita de miosite ou paralisia do nervo femoral. Foram então realizadas algumas análises bioquímicas e hemograma, tendo-se verificado um aumento da creatina fosfoquinase (CK) e dos neutrófilos e uma diminuição dos linfócitos. O aumento da creatinina demonstra que há lesão muscular aguda, o aumento dos neutrófilos pode ser associado à artrite e a diminuição dos linfócitos pode ser interpretada como sinal de infeção aguda (Muir 2011).

Visto que as complicações verificadas foram devido à isquemia dos tecidos, foi de extrema importância tentar manter o decúbito esternal e alterar o decúbito lateral, de modo a minimizar a sobrecarga e subsequente agravamento da isquemia e das lesões já referidas.

A medicação administrada no pós-cirúrgico foi:

- Cefquinoma 1mg/Kg - SID- 5 Dias (IM)
- Gentamicina 6.6mg/Kg - SID- 5 Dias (IM)
- Fenilbutazona 2.2mg/Kg - BID- 5Dias (IV)
- Flunixin meglumina 1.1mg/Kg - BID- 5 Dias (IV)
- Acepromazina 0.05mg/Kg - BID- 5 Dias (IM)
- Vit. do complexo B; electrólitos; aminoácidos; dextrose 2mL/Kg - SID- 3 Dias (IV)
- Selénio; Vit B12 20mL - SID- 7 Dias (IM)
- DMSO 8% 1g/Kg - BID- 3 Dias (IV)
- Trimetoprim- Sulfonamida 30mg/Kg BID-10 Dias (PO) após o 5º Dia pós-cirúrgico
- Lactato Ringer

É de extrema importância a utilização de antibioterapia de largo espectro e por um longo período, tendo sido então escolhidas a gentamicina e a cefquinona aquando do internamento da paciente e posteriormente trimetoprim-sulfonamida oral para ser realizado pelos proprietários, perfazendo um período total de 15 dias de tratamento antibacteriano. Foram utilizados dois anti-inflamatórios com diferentes modos de ação para ajudar a recuperação e manter o conforto da paciente. A fenilbutazona e a flunixin meglumina são anti-inflamatórios não esteróides (AINE). O dimetilsulfóxido (DMSO) é também um anti-inflamatório, que sequestra radicais livres sendo assim útil no tratamento de danos de reperfusão sanguínea. A acepromazina foi utilizada com o intuito de promover a tranquilização e pelo seu efeito de

vasodilatação periférica para combater a miopatia verificada. As vitaminas do complexo B ajudam na regeneração tanto muscular como nervosa. O selênio e a vitamina E tem um efeito sinérgico com o DMSO, sendo frequentemente utilizadas em tratamento de doenças hepáticas e musculares.

O restante tempo do estágio foi aproveitado com trabalho administrativo (inventário e emissão de faturas) e estudo tanto individual como em grupo com os restantes estagiários.

2. Estágio em clínica e reprodução equina

Este estágio realizado com a Dra. Marta Usón, no Monte da Pereira, abrangeu a assistência médica equina geral, com especial foco na reprodução equina. O acompanhamento reprodutivo foi realizado tanto em éguas como em garanhões.

No caso das éguas foram feitos exames de avaliação do trato reprodutivo; tratamentos reprodutivos intrauterinos e/ou sistémicos; controlo folicular; sincronização éstrica; inseminação artificial (IA) com sémen fresco, refrigerado e congelado; transferências de embrião (TE); diagnóstico de gestação; avaliação da vitalidade do feto; esmagamento de gémeos; entre outros serviços prestados.

No caso dos garanhões foi possível realizar avaliação reprodutiva dos mesmos, assim como recolhas de sémen para utilização em fresco, para refrigerar ou para congelar. É um centro de recolha de sémen oficial (CRS), pelo que é possível comercializar o sémen na União Europeia.

Entre países europeus só é permitida a comercialização de sémen proveniente de CRS oficiais, que satisfaçam as condições impostas no Regulamento número 176/2010 da União Europeia. Este regulamento estabelece os requerimentos sanitários para as trocas intracomunitárias de sémen e as condições para a aprovação e supervisão dos CRS. O Capítulo I estabelece as condições para os CRS, sendo os seguintes os pontos principais:

- devem estar sob a permanente supervisão de um centro veterinário autorizado pelas autoridades competentes;
- ter pelo menos:
 - estúbulos e áreas de exercício fisicamente separadas das áreas de colheita, processamento e armazenamento do sémen;
 - separação física de outros estúbulos externos;
 - instalações de colheita de sémen, que podem ser interiores, com piso aderente para prevenir/minimizar acidentes, mas fáceis de limpar e desinfetar;
 - uma divisão separada para a limpeza, desinfeção e esterilização do material;
 - uma divisão para o processamento do sémen, separada da divisão da colheita do sémen e da divisão da limpeza;
 - uma divisão para o armazenamento do sémen;sendo que estas instalações não têm que se encontrar todas no mesmo local
- ser construídas de modo a evitar o contato com vida externa;
- ser construídas de modo a que todo o CRS exceto os escritórios e a área de exercício sejam de limpeza e desinfeção fácil.

Segundo o mesmo Regulamento, estes CRS devem ainda ser supervisionados para garantir que:

- seja prevenida a entrada a pessoas não autorizadas e que as visitas autorizadas cumpram as regras estabelecidas pelo veterinário responsável;
- só pessoal competente é contratado, que tenham recebido formação e treino adequado em desinfeção e técnicas de higienização para prevenir a disseminação de doenças;
- sejam mantidas bases de dados atualizadas de:
 - raça, data de nascimento e identificação de todos os animais presentes CRS;
 - todo o movimento de animais que entram e saem do CRS;
 - registo sanitário e todos os testes de diagnóstico realizados, assim como resultados, tratamentos e vacinações realizados nos animais do CRS;
 - data de colheita e processamento do sémen;
 - destino do sémen processado;
 - armazenamento do sémen.
- nenhum dos animais alojados no CRS é usado para cobertura natural pelo menos 30 dias antes da data da primeira colheita de sémen e durante o período de colheita;
- todos os instrumentos que contatem com o sémen ou o garanhão doador durante a colheita ou o processamento devem ser devidamente desinfectados ou esterilizados antes de utilizados, exceto para instrumentos novos ou de uso único;
- os produtos de origem animal usados no processamento do sémen, incluindo os diluidores e os aditivos, sejam obtidos de fontes que não apresentem risco para a saúde animal ou que sejam tratados antes de usados para que esse risco seja prevenido;
- os agentes de criopreservação usados para o armazenamento do sémen não sejam previamente utilizados em outros produtos de origem animal;
- os contentores do sémen sejam devidamente desinfectados ou esterilizados antes de serem utilizados, exceto os novos ou descartáveis;
- cada dose de sémen ou cada ejaculado sejam identificados de maneira a que a data de colheita, a espécie, a raça, a identificação do dador e o número do CRS sejam facilmente identificáveis.

O regulamento estabelece ainda as condições aplicáveis aos garanhões dadores. Para que se possa colher sémen é necessário que o garanhão:

- não demonstre qualquer sinal clínico de doenças infetocontagiosas na data de admissão no CRS e no dia da colheita;
- deve ser mantido nos 30 dias anteriores à data da primeira colheita em local onde nenhum animal apresente sinais de arterite viral equina (AVE) ou de metrite contagiosa equina (MCE) durante o mesmo período;

- não deve ser utilizado para cobertura natural nos 30 dias anteriores à primeira colheita e em todo o período de colheita;
- deve ser submetido aos seguintes testes, realizados num laboratório reconhecido pelas autoridades competentes:
 - um teste de agar-gel de imunodifusão (teste de Coggins) ou uma ELISA para a Anemia Infeciosa Equina (AIE)
 - um isolamento de vírus para a AVE com resultado negativo numa amostra de sêmen do garanhão doador, exceto haja um resultado negativo numa diluição de um para quatro num teste de neutralização do plasma;
 - um teste para a MCE, levado a cabo em dois momentos, em amostras colhidas do garanhão com intervalo de sete dias. Deverá tentar-se isolar a *Taylorella equigenitalis* do fluido pré-ejaculatório ou de uma amostra de sêmen e de zaragatoas genitais tomadas pelo menos do corpo do pénis (Figura 11), uretra (Figura 12) e fossa uretral (Figura 13) todas com resultado negativo.

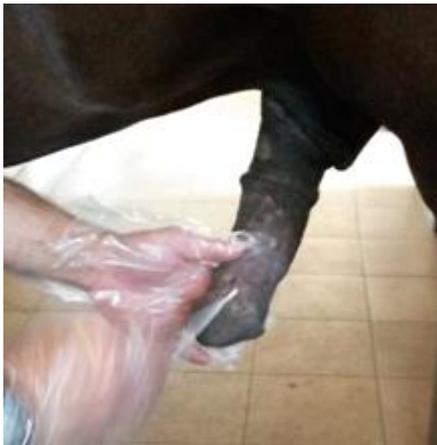


Figura 11 - Zaragatoa do corpo do pénis



Figura 12 - Zaragatoa da fossa peri-uretral



Figura 13 - Zaragatoa da uretra

Neste centro há ainda a possibilidade de acolher éguas em regime de internamento, havendo clientes a optar por deslocar as éguas apenas enquanto estavam a ser seguidas durante a época reprodutiva e outros que optavam por manter as éguas nas instalações durante todo o ano. Os garanhões também foram internados aquando do cumprimento da quarentena para exportação, após a realização dos exames requeridos pelo país para onde se deslocavam, ou enquanto se realizavam recolhas de sémen. As instalações permitem o alojamento em boxes, com separação das boxes para éguas e para garanhões, ou em *paddocks*, individuais ou de grupo. Há ainda a infraestrutura necessária ao trabalho desportivo dos equinos ali instalados.

Relativamente às instalações para o acompanhamento reprodutivo das éguas existia um tronco de contenção com um apoio para o ecógrafo, um suporte para suspender soros e um apoio para prender as rabadas das éguas. Existia ainda o apoio do laboratório já referido e das salas de arrumos.

Neste último estágio acompanharam-se um total de cento e quarenta e cinco casos, dos quais: setenta e sete foram animais seguidos reprodutivamente, quarenta e dois casos de medicina preventiva, treze casos envolvendo o aparelho locomotor, seis casos de dentisteria, cinco identificações equinas e dois casos de neonatologia - Gráfico 2.

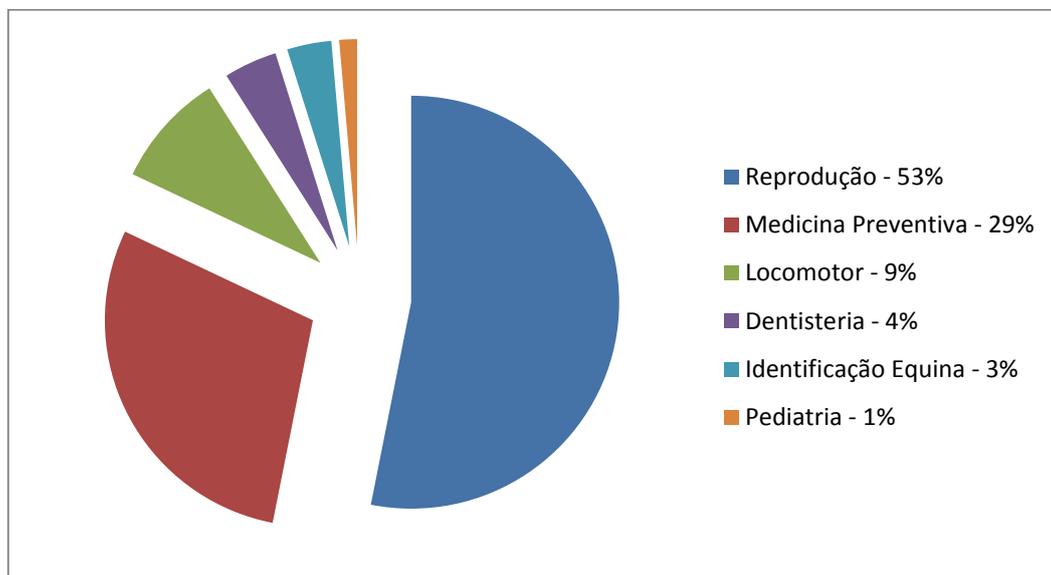


Gráfico 2- Casuística geral do estágio em Clínica e Reprodução de Equinos

No âmbito da medicina preventiva foram vacinados vinte e quatro animais contra a influenza equina e tétano, quinze desparasitados internamente e três externamente.

Procedeu-se à identificação de três equinos recorrendo a resenhos (Anexo 1), e de dois pela identificação eletrónica. Segundo o decreto-lei nº 123/2013 de 28 de Agosto, todos os equinos devem ser identificados. A Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) é a autoridade nacional competente para a identificação animal e responsável pela emissão dos documentos de identificação equina (DIE). Todos os equinos devem ter DIE ou passaporte, assim como um método que assegure a ligação do documento ao equino (resenho ou repetidor eletrónico) e ainda o Registo Nacional de Equídeos, que regista sob um número de identificação único (*Universal Equine Life Number - UELN*) os elementos de identificação relativos ao equídeo que deu origem ao DIE emitido. Todos os equinos nascidos em Portugal devem ser identificados até à data que ocorrer mais tarde das seguintes opções: abandonarem o local de nascimento, dia 31 de Dezembro do ano do nascimento ou até seis meses depois do nascimento. Todos os animais que sejam identificados atualmente devem ser identificados por um repetidor eletrónico (microchip), devendo o veterinário confirmar sempre a inexistência de algum anterior antes da colocação de um novo repetidor eletrónico. O detentor é responsável pela correta identificação dentro dos prazos estabelecidos e é obrigatória a atualização do detentor sempre que haja mudança de proprietário. O não cumprimento da identificação, atraso no prazo ou substituição/duplicação do DIE constituem contraordenação punível com coima de 250 a 3740€ para pessoas singulares e até 44890€ para pessoas coletivas.

No decorrer do estágio surgiram ainda seis casos de dentisteria, quatro dos quais foram correções dentárias de cavalos adultos e dois foram correções dentárias de poldros de dois anos. Em ambos os poldros foram removidos os dentes 105 e 205 (numeração segundo o sistema de Hugo Triadan Bern de 1971 (Figura 14)), também conhecidos por dentes de lobo.

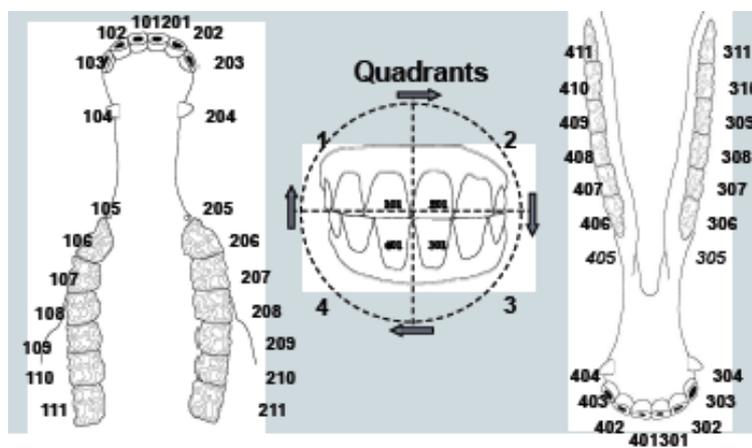


Figura 14 - Numeração dos dentes pelo sistema de Triadan
Imagem fornecida pelo Dr^o Denis Verwilghen, ULHT (2012)

A profilaxia dentária tem sido referida como uma parte importante do plano médico-veterinário para todos os cavalos. Os seus objetivos são limar as pontas dentárias cortantes, manter uma boa oclusão e equilíbrio entre as arcadas dentárias permitindo correta mastigação e mobilidade. O limar dos dentes é o procedimento mais comumente utilizado, principalmente para remover pontas de esmalte da face bucal da arcada maxilar e da face lingual dos dentes da arcada mandibular, mas tem também outros objetivos. A face rostral do segundo pré-molar (106, 206, 306 e 406), ganchos, rampas e ondas podem também ser corrigidas. O objetivo de limar os dentes é manter a simetria e equilíbrio entre as arcadas dentárias e permitir uma livre mastigação. Deve-se iniciar o exame pela história pregressa recolhendo os dados relativamente à idade, nível desportivo esperado e dificuldades sentidas pelo cavaleiro. Deve-se ainda avaliar a alimentação, tanto relativamente aos alimentos que recebe como à mastigação e comportamento face às refeições e verificar a presença de grãos inteiros nas fezes. Deve-se então seguir o exame visual do animal, onde se deve avaliar a sua condição física, o aspeto do pêlo, a atitude, a simetria e forma da cabeça e a presença de halitose. De seguida deve-se proceder à palpação. Durante a palpação deve avaliar-se a presença de pontas na face bucal dos pré-molares e molares maxilares, as articulações temporo-mandibulares e os linfonodos sub-mandibulares. Deve-se então avaliar a mobilidade da mandíbula, sendo que esta deve ser capaz de realizar os movimentos de abrir e fechar, de lateralização e antero-posterior. Há autores que aconselham que se siga o exame pela avaliação dos dentes caninos, limando-os, se se apresentarem pontiagudos ou com sobre crescimento, ainda antes de colocar o abre-bocas. Há ainda autores que aconselham que seja limada a face bucal maxilar antes da colocação do abre-bocas em casos onde se encontrem pontas dentárias cortantes nessa superfície, de modo a prevenir a fricção das mesmas com a mucosa oral aquando da abertura da boca. A mucosa oral pode também ser avaliada ainda antes da colocação do abre-bocas. Após a colocação do abre-bocas, deve-se proceder a uma cuidada avaliação da cavidade oral. Deve-se procurar não só alterações na dentição como feridas nos tecidos moles. As alterações mais frequentemente encontradas são as pontas de esmalte na face bucal do maxilar e na face lingual da mandíbula, devido à conformação normal da boca do cavalo; ganchos, normalmente nos segundos pré-molares mandibulares e nos últimos molares maxilares; ondas e rampas, que são crescimento anormal de alguns dentes devido à falta de crescimento do dente equivalente na arcada vertical contrária; e a presença de dentes do lobo (primeiros pré-molares). É aconselhável o registo das anomalias encontradas, assim como tratamento realizado e procedimentos futuros (Baker & Easley 2000; Caldwell 2006; Carmal 2006; Galloway 2011; Easley 2011; Gieche 2013).

Relacionados com o aparelho locomotor acompanhámos treze casos. Quatro dos quais foram lacerações nos membros: um caso de múltiplas lacerações da zona dorsal das canelas dos membros posteriores de um burro; um caso de uma laceração numa quartela com envolvimento do tendão flexor profundo; um caso de uma laceração nas faces dorsal e medial de uma canela de um membro posterior direito; e um caso de uma laceração na face cranial do antebraço do membro anterior esquerdo em que se realizou uma sutura de aproximação dos bordos (Figura 15).



Figura 15 - Manga de contenção

Nos restantes nove casos, foram realizados onze exames de claudicação e doze radiografias, distribuídas conforme Gráfico 3.

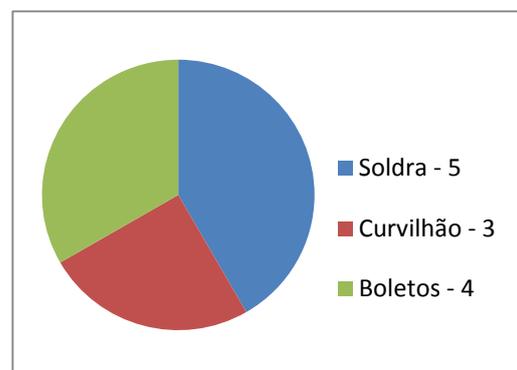


Gráfico 3 - Distribuição das radiografias por zonas

Durante o estágio foram acompanhados dois casos de internamento de poldros recém-nascidos paridos a campo.

No primeiro caso a poldra chegou em hipotermia. A hipotermia em poldros pode ser associada a doença sistémica severa ou temperatura ambiente reduzida. Esta poldra nasceu no campo, num dia chuvoso e a sua mãe tinha sido vista pela última vez (ainda gestante) 24 horas antes de os proprietários a encontrarem. A causa aparente será o facto de muito provavelmente não ter mamado o colostro e da temperatura ambiente ser reduzida. A poldra foi encontrada molhada e extremamente fria. Nestes casos, é de extrema importância tentar restabelecer a temperatura corporal do poldro e administrar uma fonte energética o mais breve possível, pois ocorre frequentemente hipoglicémia associada à hipotermia devido às reduzidas reservas dos poldros que rapidamente se esgotam quando tentam manter a sua temperatura corporal (McAuliffe & Slovis 2008). Neste caso colheu-se leite materno e administrou-se à poldra com o auxílio de uma sonda nasogástrica. Administrou-se ainda um litro de LR, aquecido, por via endovenosa. Tentou-se restabelecer a temperatura corporal da poldra tentando secá-la, por fricção, com mantas e com aquecedores elétricos. No entanto esta acabou por falecer pouco tempo depois.

O segundo caso foi um poldro *dummy*. Também conhecida por encefalopatia neonatal ou encefalopatia hipoxico-isquémica, esta doença caracteriza-se por disfunção neurológica imediatamente após o parto ou nas primeiras 24 horas de vida. Os sinais clínicos são variáveis, mas em geral os poldros não apresentam o reflexo de sucção, afastam-se da mãe e ficam deprimidos. A etiologia desta doença não é simples, mas sabe-se que um evento asfíxiante, que leva à hipoxia cerebral, é muito importante no processo. Neste caso, o poldro apresentava estes sinais clínicos no entanto foi encontrado nascido no campo e não se sabia quanto tempo de vida tinha. Esta alteração pode ser secundária a insuficiência placentária crónica, separação precoce da placenta durante o parto, pressão ou tensão sobre o cordão umbilical e compressão torácica no canal pélvico prolongado durante o parto (Paradis 2006).

Foi realizado um teste de mensuração de imunoglobulinas, de tipo imunoensaio semi-quantitativo (*SNAP® Foal IgG Test*). O resultado obtido foi inferior a 400mg/dL. Estávamos perante um caso de falha de imunização passiva. As causas mais frequentes para esta falha de imunização passiva são: produção do colostro antes do nascimento, falha na capacidade de produzir colostro de boa qualidade e/ou quantidade suficiente, falha de ingestão pelo poldro nas primeiras 12 horas de vida ou falha deste em absorver o colostro. Se a falha for detetada nas primeiras 12 horas de vida do poldro é recomendada a administração oral de colostro equino de boa qualidade (Paradis 2006).

A primeira coisa que um poldro precisa é de colostro. Este é essencial para a proteção imunológica e para um bom começo nutricional. Em pequenos criadores ou clínicas com pouca casuística de neonatologia pode ser difícil, mas em lugares com casuística relevante deve-se recolher colostro de éguas com excelente qualidade de colostro. Deve-se colher o colostro após o seu poldro ter mamado ou de uma teta enquanto o poldro mama da outra. O colostro pode ser mantido congelado por mais de dois anos, sendo descongelado em água quente quando for necessário utilizar. Geralmente um poldro precisa de dois a três litros de colostro de boa qualidade para aumentar os níveis de imunoglobulina B (IgG) para os 800mg/dL recomendáveis. No caso de não haver disponível colostro equino pode-se fazer uma administração EV de plasma equino alto em IgG. A utilização de colostro de outra espécie ou de suplementos comerciais de colostro podem ajudar, mas nunca substituem o colostro equino ou a transfusão de plasma (Paradis 2012).

Deve-se realizar uma transfusão de plasma até que se obtenha valores de IgG no poldro superiores a 800mg/dL. Em poldros normais, uma dose de 200mg IgG/kg aumenta os níveis de IgG em 450mg/dL e uma dose de 400mg/kg aumenta em 575mg/dL. A administração de um litro de plasma equino a um poldro de 45kg normalmente aumenta a sua concentração de IgG em cerca de 200 a 300mg/dL, sendo portanto frequente a necessidade de administrar dois a quatro litros. Para realizar a transfusão de plasma deve-se introduzir asépticamente um cateter numa das veias jugulares do poldro. O fluxo inicial deve ser lento (0.5mL/kg nos primeiros 10 a 20 minutos) e deve-se estar atento a possíveis reações adversas. Os sinais clínicos de reações adversas à transfusão são: fasciculações musculares, piloereção, aumento das frequências respiratórias e cardíacas, febre, dor abdominal ou colapso. Se não for observada nenhuma reação adversa a taxa de infusão pode ser aumentada até 40mL/kg/hora. Após a transfusão nova mensuração dos níveis de IgG do poldro devem ser realizados 12 a 14 horas após a transfusão (Paradis 2006). No caso acompanhado foi então realizada uma transferência de plasma. Colheram-se nove litros de sangue da mãe, deixaram-se decantar por gravidade e transferiu-se o plasma para o poldro.

Realizou-se a alimentação por sonda nasogástrica durante duas semanas. O poldro tinha períodos em que se mostrava mais alerta e mamava, apesar de nunca mamar o suficiente sozinho. Havia no entanto períodos em que ficava apático e dependia totalmente da alimentação pela sonda. Ordenhava-se a mãe e completava-se o volume recomendado para a idade com leite comercial.

Ao fim de duas semanas os curvilhões e a soldra direita do poldro surgiram aumentados e quentes. Foi colhido líquido articular que se apresentava pouco viscoso e turvo, tendo-se chegado à conclusão que se estava perante um caso



**Figura 16 -
Líquido articular
recolhido**

de artrite séptica (Figura 16). O proprietário optou pela eutanásia do poldro. A artrite séptica neonatal constitui uma importante causa de morbidade que pode vir a limitar o desempenho desportivo do poldro no futuro. Apesar disso, a resolução da infeção do espaço sinovial em poldros possui um bom prognóstico quando o diagnóstico é precoce. A incidência real da doença varia entre estábulos, refletindo as práticas de manejo, tais como a higiene periparto da égua e poldro. Outros fatores de risco para o desenvolvimento de artrite séptica incluem transferência inadequada de imunoglobulinas do colostro, atraso no tempo para se colocar de pé ou mamar, prematuridade, dismaturidade, distócia e doenças periparto da égua. A probabilidade de desenvolvimento da artrite séptica é maior nos primeiros 30 dias após o parto e o tarso é relatada como sendo a articulação mais frequentemente afetada. Para além disso, é necessário ter em conta o risco de infeção articular múltipla e de osteomielite concomitante que não são incomuns no poldro recém-nascido, ao contrário dos cavalos adultos (Schneider *et al.* 1992; Steel *et al.* 1999; Meijer *et al.* 2000; Annear *et al.* 2011).

Contrariamente ao que é observado em cavalos adultos, cuja origem da contaminação articular é geralmente por traumatismos, nos poldros a propagação de organismos infecciosos é tipicamente hematogénica aquando de uma bacterémia transiente ou permanente. A bacterémia ocorre geralmente por falha na transferência passiva de imunoglobulinas do colostro associado a entrada de bactérias através do trato gastrointestinal, respiratório, cordão umbilical ou placenta. A colonização bacteriana numa articulação é propiciada pela natureza altamente vascularizada da sínovia e da epífise do osso subcondral. Uma vez estabelecida a entrada de agentes patogénicos na articulação, desenvolve-se uma marcada resposta inflamatória, com efeitos negativos para os tecidos sinoviais, resultando numa destruição da cartilagem articular. Assim, em casos de claudicação e efusão articular quente é importante avaliar a saúde sistémica do poldro e procurar a origem da infeção. A avaliação do estado geral do poldro deve incluir um exame físico completo, hematologia de rotina e procurar qualquer evidência de distúrbio gastrointestinal ou de onfaloflebite. As alterações hematológicas podem ser leves no início do curso da infeção, mas dentro de 48-72 horas observa-se uma leucocitose e hiperfibrinogenemia significativa em casos de artrite séptica (Annear *et al.* 2011). Um importante método de diagnóstico é a obtenção e avaliação de líquido sinovial. O líquido sinovial normal é amarelado e viscoso, enquanto o fluido das articulações inflamadas é menos viscoso, mais escuro e turvo. Tal como referido anteriormente relativamente à artrite séptica em cavalos adultos, a proteína total do fluido sinovial normal de um poldro, medido com refratómetro, deve ser inferior a 2g / dl. Quanto à contagem de leucócitos de líquido sinovial normal é de 167 células/mm³ e o número total de células nucleadas não deverá ser superior a 10.000 células/mm³ (10,0 x 10⁹ / l), à semelhança do cavalo adulto.

O diagnóstico por imagem é frequentemente realizado e pode fornecer informações úteis para ajudar a determinar a gravidade e a cronicidade da doença. Radiografias obtidas durante os

estágios iniciais da artrite séptica podem ser normais ou pode-se observar um aumento do espaço articular e distensão do conjunto de tecidos moles em torno da articulação. Apesar de estes resultados serem relativamente inespecíficos, eles são de grande valor no diagnóstico e prognóstico quando correlacionados com o quadro clínico e os resultados da análise do líquido sinovial.

De modo a resolver a infecção e restaurar a saúde das articulações é essencial a obtenção de um diagnóstico precoce e a instituição rápida de terapêutica adequada. Para alcançar esses objetivos, a terapêutica assenta na administração de antibióticos sistêmicos de largo espectro, na drenagem e lavagem da articulação infetada, administração de antibióticos intra-articularmente e de anti-inflamatórios não esteroides por via parentérica. No entanto, é necessário ter em conta que o neonato apresenta desafios adicionais na administração da medicação devido às diferenças no volume de distribuição e eliminação, que podem ser influenciadas pela presença de outras doenças concomitantes, juntamente com o potencial de envolvimento articular múltiplo (Annear *et al.* 2011).

Quanto à antibioterapia sistémica, os fármacos considerados mais adequados em neonatos incluem a penicilina G potássica (20.000 UI / kg, EV cada 6h), gentamicina (11-15 mg / kg, EV cada 24h), amicacina (20-25 mg / kg, EV cada 24h) e 3^a geração cefalosporinas como o ceftiofur (2,2 mg / kg, IM cada 12h). Uma vez que os poldros têm o mecanismo de eliminação do medicamento alterado devido a imaturidade da função hepática e renal, que poderá estar a ser prejudicada ainda mais pela doença, é necessário executar cuidadosamente o cálculo da dose. Quanto à drenagem e lavagem da articulação infetada, esta é feita com o poldro sedado. Colocam-se duas agulhas de 16 ou 18Gauge dentro do espaço articular, previamente preparado cirurgicamente. Procede-se à lavagem do espaço sinovial com LR, infiltrando-se o LR na articulação com uma agulha e deixando-se que saia pela outra. No final, administra-se amicacina intra-articularmente através de uma das agulhas. O anti-inflamatório de eleição em poldros geralmente é flunixin-meglumina a uma concentração de 1,1 mg/kg, EV cada 24h (Annear *et al.* 2011).

Como referido inicialmente, o prognóstico para a resolução da artrite séptica neonatal é razoável quando diagnosticada atempadamente. No entanto, o prognóstico para a sobrevivência a longo prazo parece ser menos encorajador. Foi descrita uma taxa de sobrevivência de 45%, após infecção da articulação em poldros, um resultado significativamente pior do que em adultos com artrite séptica. Um estudo mais recente relatou a resolução da infecção articular em 71% dos poldros, com 42% sobreviventes. Neste caso, é importante considerar que os poldros que desenvolveram artrite séptica poderão ter sido submetidos a eutanásia por antecipação de um pior prognóstico para o desempenho atlético no futuro (Schneider *et al.* 1992; Meijer *et al.* 2000).

No âmbito da reprodução foram seguidos um total de setenta e sete casos, estando os procedimentos enumerados na Tabela 2.

Tabela 2 - Casuística no âmbito da reprodução

Procedimento	Número de vezes que se repetiu o procedimento	%
Ecografia transretal	542	
Diagnóstico de gestação:	58	
- Positivos	33	57%
- Negativos	25	43%
Verificação de batimento cardíaco do embrião	12	
Zaragatoa uterina	2	
Lavagem uterina	6	
Tratamento oral (com enrofloxacina)	58	
Tratamento intra uterino (com gentamicina)	26	
Recolha de embrião:	7	
- seguida de implantação	3	43%
- sem obtenção de embrião	4	57%
Sutura Caslick	1	
Colheita de sémen	11	
Congelação de sémen		
Inseminações:	85	
- com sémen fresco	3	4%
- com sémen refrigerado	62	73%
- com sémen congelado	20	23%
Exame vaginal:	2	
- com espéculo	1	50%
- com endoscópio	1	50%
Esmagamento de embrião gémeo	2	

Em 1937, Caslick fez a primeira referência à importância da conformação vulvar das éguas na infeção do trato genital e na formação da pneumovagina. Caslick descreveu um procedimento cirúrgico para fechar a parte dorsal dos lábios vulvares, sutura conhecida atualmente por Caslick ou vulvoplastia. A conformação vulvar de cada égua deve ser avaliada sempre que se tenciona inseminar a égua, pois não só varia individualmente como também varia com fatores como a idade, o estado nutricional ou os partos. Deve-se avaliar o comprimento da vulva, o seu ângulo em relação à

vertical e ainda a sua posição relativamente ao arco isquiático da pélvis. O ideal será que a vulva tenha um máximo de 10° em relação à vertical e que mais de 80% do seu comprimento esteja abaixo do arco isquiático. A técnica cirúrgica descrita por Caslick é:

- a égua deve ser contida, preferencialmente num tronco de contenção;

- deve-se tentar manter a zona perineal limpa: a cauda deve ser envolta numa luva de palpação ou numa ligadura limpa, exceto se a égua tiver a parte superior da rabada tosquiada;

- o reto deve ser esvaziado para prevenir conspurcação durante o procedimento;

- toda a zona perineal deve então ser cuidadosamente lavada com sabão e água e seca com papel (Figura 17);

- os lábios vulvares devem então ser infiltrados com um anestésico local, como a lidocaína (Figura 18);

- deve-se então remover o tecido da junção mucocutânea desde a comissura labial dorsal até cerca de um centímetro após o arco isquiático. Deve-se ter cuidado para não remover pele pois com as repetidas cirurgias a égua pode ficar com falta de pele na vulva (Figura 19);

- os fios de sutura mais utilizados são os monofilamentados não absorvíveis (nylon ou polipropileno);

- são usadas diversas suturas, tanto contínuas como interrompidas, com resultados favoráveis.

Antes do parto (ou antes da inseminação em alguns casos) é necessário abrir a Caslick. Deve-se fazer uma infiltração com anestésico local, tal como para realizar a Caslick, e abrir o local da sutura com uma tesoura ou lâmina de bisturi (McKinnon *et al.* 2007).



Figura 17 - Zona perineal limpa



Figura 18 - Vulva infiltrada com lidocaína



Figura 19- Junção mucocutânea removida

Colheita, avaliação e processamento de sémen

Muitos fatores influenciam a libido, a habilidade de cobertura e a colheita de sémen nos garanhões. Estes fatores podem ser hereditários, ambientais ou fruto do manejo. A colheita eficiente de sémen de boa qualidade é muito importante no processo de inseminação artificial ou nos programas de armazenamento de sémen. A colheita e avaliação de sémen (CS) pode ainda fazer parte do exame de ato de compra e venda do garanhão ou ainda realizar-se para tentar averiguar a causa da diminuída fertilidade de um certo garanhão. No entanto, o processo de CS por si só pode ser causa de baixa qualidade de sémen (Samper 2009; McKinnon *et al.* 2011).

O local da CS deve ser espaçoso, limpo, não escorregadio e livre de distrações (como barulhos, outros animais ou pessoas externos ao processo). É de extrema importância que este espaço seja concebido tendo em mente a segurança do pessoal e dos garanhões (Samper 2009; McKinnon *et al.* 2011).

O sémen equino pode ser colhido por cinco métodos: uso de preservativo, ejaculação induzida por fármacos, manipulação manual do pênis, colheita de sémen do epidídimo e com o uso de uma vagina artificial (VA). Sendo o uso de VA o método de eleição nos programas comerciais de CS. As características essenciais de cada método são (Shepherd 2008; Samper 2009; McDonnell 2011; McKinnon *et al.* 2011):

- Uso de preservativo: o sémen colhido por este método é fortemente contaminado. O método requer uma égua em estro para ser coberta e a colocação de um preservativo no pênis do garanhão antes da cobertura. As desvantagens associadas a este método são a não tolerância do preservativo por parte de alguns garanhões e a perda do preservativo/sémen ser comum. No entanto, pode ser uma solução viável para garanhões habituados a cobertura natural, até que tenha o devido treino com a VA.
- Ejaculação induzida por fármacos: o sémen colhido por este método tem pouco volume e alta concentração. A sua utilização para refrigeração ou congelação é possível. No entanto, só em 25 a 30% das tentativas se consegue a ejaculação do garanhão, o que torna este método pouco viável em programas comerciais de CS. Existem protocolos com a utilização de xilazina, imipramina, as duas em associação ou prostaglandina. É importante que o garanhão seja mantido calmo e sem distrações durante o processo. Um dos protocolos é a administração de 2mg/kg de imipramina EV e, na ausência de ereção e ejaculação em 10 a 15 minutos, administração de xilazina EV numa dose de 0.2 a 0.3 mg/kg. Foram descritas alucinações em alguns garanhões após a administração de imipramina. Com o uso desta combinação imipramina - xilazina a ejaculação deve ocorrer

associada a ereção e masturbação. Se a xilazina for usada isoladamente não ocorre ereção e masturbação. A ejaculação ocorre quando o garanhão entra ou recupera do período de sedação.

- Manipulação manual do pênis: com este método obtêm-se ejaculados semelhantes aos obtidos com o uso de VA. Este não é um método muito praticado. Requer treino do operador e muitos garanhões não ejaculam com este método, necessitando de muito treino para ejacularem. A grande vantagem deste método é não haver necessidade de muito material específico para a CS e, normalmente, não ser necessário o contato direto com uma égua em estro. Aquando da ereção do pênis coloca-se uma luva ou saco no pênis. Uma mão do operador estimula a glande e a outra mão estimula a base do pênis. Pode-se colocar uma toalha molhada em água quente na base do pênis para aumentar a estimulação.

- Colheita de sémen do epidídimo (Bruemmer 2006): em caso de lesões, morte ou castração eletiva de um garanhão, é possível recolher sémen da cauda do epidídimo. Esse sémen pode ser congelado e utilizado posteriormente, preservando-se assim material genético. É também possível enviar os epidídimos e testículos de um garanhão para um laboratório para que o sémen seja aí recolhido e processado.

- Uso de VA: este é o método mais utilizado para as CS em garanhões. Existem diversos modelos de VA disponíveis comercialmente. Estas são preenchidas com água, que permite controlar a temperatura e a pressão dentro da VA. Pode-se utilizar um lubrificante não espermicida para diminuir a fricção do pênis com a VA. No entanto, foi referida diminuição da motilidade do sémen associada com a utilização de lubrificantes mesmo quando ditos não espermicidas. As VA são construídas para manter a temperatura pelo período necessário à CS, para permitir a ejaculação diretamente num recipiente (acoplado à VA para esse efeito) e para serem fáceis de manusear pelo operador. O operador deve ser capaz de suportar a VA apenas com uma mão na posição correta, enquanto a outra mão deve ser usada para desviar o pênis do manequim ou da égua. A falha na CS é frequentemente associada a um incorreto posicionamento da VA, temperatura da mesma no momento da CS, manequim com uma altura não confortável para o garanhão ou uma pressão na VA frequentemente excessiva. De notar que todos estes aspetos têm variações individuais. Os modelos de VA são semelhantes. Os vários modelos variam essencialmente no comprimento, diâmetro, facilidade de enchimento da câmara e



Figura 20 -
VA: Hanover (esquerda)
e Colorado (direita)

peso (principalmente quando preparada). Os modelos mais comuns são: Missouri, Colorado, Hanover, Nishikawa, HarVet e modelos polacos (Figura 20).

Durante o estágio as CS foram realizadas com o uso de VA, tendo sido utilizado o modelo Colorado. Este modelo é substancialmente mais comprido, com maior diâmetro e mais pesado do que os outros modelos (Shepherd 2008; Samper 2009).

A preparação e o planeamento da CS são de extrema importância para garantir um manuseamento adequado do sémen imediatamente pós-colheita. O laboratório deve estar preparado, com os materiais e diluidores à temperatura desejada (35 a 37°C). A égua ou o manequim que será utilizado deve estar preparado de modo a prevenir contaminação do pénis do garanhão. Quando tudo está pronto o garanhão deve ser então conduzido ao local. Aquando da ereção do garanhão deve-se proceder à lavagem do pénis com água quente e limpa, podendo-se também utilizar sabão próprio para o efeito. O pénis deve então ser bem seco com papel limpo e descartável. Deve-se então preparar a VA. Novamente quando o garanhão tiver atingido a ereção total deve-se conduzi-lo à égua/manequim. Aquando do salto deve-se desviar o pénis para a VA e esta deve ser posicionada de modo a proporcionar conforto ao garanhão. Aquando da ejaculação pode-se abrir a válvula de entrada/saída de água na VA, de modo a baixar a pressão e ser mais fácil remover o pénis da VA. Esta deve ser imediatamente colocada numa posição que conduza o sémen ao recipiente acoplado, de modo a que não fique em contato com a temperatura demasiado elevada no interior da VA e que não se perca o sémen pelo lado aberto da vagina. O sémen deve então ser conduzido ao laboratório, avaliado e processado de imediato (Samper 2009; McDonnell 2011; McKinnon *et al.* 2011).

A amostra de sémen ideal para refrigerar ou congelar deve ter elevada concentração de espermatozoides, pouco plasma seminal, elevada percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e baixa percentagem de anomalias morfológicas. Alguns cuidados que se pode ter neste sentido é a mínima estimulação sexual do garanhão para uma boa ereção e tentar descartar o máximo possível de fluido pré-ejaculatório antes da intromissão do pénis na VA. Outros exemplos de fatores que podem reduzir a qualidade do sémen são: resíduos tóxicos no material da colheita (como sabão), choque de temperatura (especialmente antes de adicionado o diluidor), exposição à luz e contaminação bacteriana excessiva (Loomis 2011; McKinnon *et al.* 2011).

Se não for utilizado um filtro diretamente acoplado na VA, deve-se então filtrar o ejaculado com um filtro apropriado. Os primeiros parâmetros a avaliar devem ser a cor, volume, concentração e a motilidade do sêmen. A concentração pode ser determinada em câmaras de contagem (devendo contar-se um mínimo de quatro câmaras e fazer a média, é um método demorado e pouco utilizado), em espectrofotômetros (como o SpermaCue, utilizado durante o estágio - Figura 21) ou por aparelhos de contagem de núcleos (chemometec NucleoCounter SP-100 - Figura 22). A motilidade por sua vez pode ser estimada por um técnico treinado, observando ao microscópio ótico com placa aquecida uma gota de sêmen entre lâmina e lamela (Figura 23). Pode-se também utilizar um analisador computadorizado de motilidade de sêmen que determina a percentagem com motilidade, assim como a velocidade e outras características do sêmen (Loomis 2011; McKinnon *et al.* 2011).



Figura 21- SpermaCue



Figura 22 - NucleoCounter



Figura 23 - Observação de motilidade no microscópio com placa aquecida

O sémen dos garanhões é composto por diferentes frações. Estas podem agrupar-se em dois grupos essenciais: fração pobre em espermatozóides e fração rica em espermatozóides. A fração pobre em espermatozóides, tal como o nome indica, apresenta poucos espermatozóides. É constituída essencialmente pelos fluidos das glândulas acessórias (próstata e vesículas seminais). Esta fração é a última do ejaculado e tem um papel de modelação do sistema imunitário da égua aquando da cobertura natural, não tendo interesse aquando do processamento do sémen para armazenamento. A fração rica em espermatozóides é a primeira do ejaculado e é onde se encontram a grande maioria dos espermatozóides. Aquando da cobertura natural o sémen é ejaculado diretamente no cérvix aberto da égua em estro e é rapidamente diluído nos fluidos uterinos e transportado, com auxílio das contrações uterinas ascendentes, até ao topo dos cornos uterinos. Atingido o topo dos cornos uterinos, apenas os espermatozóides viáveis entram no oviduto deixando para trás os espermatozóides mortos ou não viáveis, fluido seminal e detritos. Naturalmente o sémen não é portanto mantido muito tempo no plasma seminal. O plasma seminal não é um bom diluidor para os espermatozóides, evidenciando-se este facto quando se processa sémen com presença excessiva de plasma seminal. É então necessário diluir o ejaculado num diluidor que preserve a qualidade do sémen por um maior período de tempo. Foi demonstrado que a diluição mínima para conservar a motilidade durante o armazenamento, sem centrifugar o sémen, a 5°C é de três partes do diluidor para uma parte de sémen (3:1), sendo o ideal uma diluição final de 30 a 50 milhões de espermatozóides por mililitro (Loomis 2011).

É também possível centrifugar o sémen, removendo-se grande parte do plasma seminal. Nesse caso, uma diluição de 1:1 é bastante para centrifugar. Deve-se centrifugar o sémen a 350 a 400 G durante 10 a 12 minutos. No final da centrifugação obtém-se a separação do *pellet* do sobrenadante. Deve-se então descartar o sobrenadante e adicionar diluidor para re-suspender os espermatozóides e alcançar a concentração desejada (Figura 24). A dose de inseminação a preparar não tem um número fixo de espermatozóides móveis nem um volume fixo. O volume da dose de inseminação não parece interferir nas taxas de gestação e doses de 50 milhões de espermatozóides móveis não levaram a diminuição das taxas de gestação (Loomis 2011; McKinnon *et al.* 2011).



Figura 24 - A adicionar diluidor até obter a concentração desejada

Alguns fatores que podem influenciar o sucesso com sémen refrigerado (SR) são: a CS, o manuseamento do sémen, a composição do diluidor, a taxa de diluição utilizada, a centrifugação ou não do sémen, a refrigeração do sémen, a dose de inseminação e o manei

reprodutivo da égua, especialmente a sincronização da inseminação com a ovulação (Loomis 2011). As principais vantagens do uso do uso de sémen refrigerado são: custo mais baixo de transportar o sémen do que levar a égua ao garanhão, menor stress na égua a inseminar, permite o tratamento antimicrobiano do sémen diminuindo a propagação de doenças, aumenta o número de éguas que se podem inseminar com o sémen de um garanhão pode inseminar e ainda permite a avaliação do sémen antes do envio. Já as principais desvantagens associadas são: baixas taxas de gestação em alguns garanhões, é necessário pessoal formado para realizar o processo e há custos inerentes a todo o processo e todas as instalações necessárias (McKinnon *et al.* 2011).

O exame andrológico pode ser requerida ao veterinário por motivos tão diversos como: requisição por companhias de seguro (mais usada em cavalos de corrida), exame de ato de compra e venda, quando há suspeita de subfertilidade ou avaliação em pré-época de garanhões usados em programas comerciais de CS. Os procedimentos realizados na avaliação do sémen também diferem conforme o solicitado. No entanto, independentemente do motivo ou da profundidade do exame, alguns dados devem sempre ser obtidos, tais como: EEG, líbido, habilidade de cobrição, qualidade do sémen, resultados de avaliações anteriores, uso anterior e perspectiva de uso reprodutivo futuro, manejo dietético, exercício, estado vacinal, doenças e medicação administrada. Dependendo da perspectiva de utilização futura do garanhão pode ser interessante o processamento e refrigeração/congelação de amostras de sémen, de modo a incluir a habilidade para refrigeração ou congelação desse garanhão. É ainda aconselhável a realização de zaragatoas para despiste de doenças sexualmente transmissíveis, para evitar a contaminação de águas e VA. Para assegurar que a amostra de sémen é representativa da qualidade do sémen do garanhão podem ser necessárias diversas CS. Pycock (2012) refere o interesse de saber a quantidade de espermatozoides produzida diariamente por um garanhão, sendo nesse caso necessário fazer colheitas em dias consecutivos até se obter um valor mais ou menos constante. Este valor permite estimar a quantidade de doses de sémen possíveis de preparar diariamente de um determinado garanhão (McKinnon *et al.* 2011; Pycock 2012; Varner 2011).

III. Transferência de Embriões em Equinos

1. Introdução

A reprodução equina tem vindo a sofrer alterações relacionadas com o desenvolvimento de técnicas reprodutivas e com os interesses dos criadores. A antiga prática em que os criadores juntavam um garanhão a uma égua a campo caiu em desuso. A cobrição natural assistida foi o passo seguinte do desenvolvimento, mas também tem tendência a cair em desuso, mantendo-se ativa nas raças que não permitem a utilização de inseminação artificial, como no Puro Sangue Inglês (PSI). O desenvolvimento de técnicas de controlo folicular, de recolha de sémen e de armazenamento do mesmo, de IA, de TE e de diagnóstico precoce de gestação levaram a uma otimização dos resultados obtidos e à possibilidade de manter os animais com uma carreira desportiva ativa - mesmo durante a época de reprodução.

Atualmente um manejo reprodutivo adequado inclui os procedimentos de diagnóstico da saúde tanto do garanhão como da égua, tratamentos, quando necessários, e determinação da altura ideal para a inseminação. Quando o criador opta pelo garanhão que pretende utilizar na(s) sua(s) égua(s) é pesquisado o tipo de sémen (fresco, refrigerado ou congelado) que é possível obter desse garanhão, baseado na posição geográfica do mesmo, na disponibilidade, nos meios de transporte de sémen existentes, entre outras variáveis.

O proprietário da égua pode ainda escolher se pretende que a sua égua leve a gestação a termo ou se prefere transferir o embrião para uma égua recetora, de modo a poder obter mais produtos da mesma égua ou a poder manter a dadora desportivamente ativa.

2. Ciclo éstrico da égua

Antes de qualquer manipulação do ciclo reprodutivo dos cavalos é de extrema importância o conhecimento do funcionamento natural do mesmo, tanto relativamente à égua como ao garanhão (Morel 2005).

As éguas são naturalmente fêmeas de atividade reprodutiva sazonal. A sua época reprodutiva natural é na primavera e verão, sendo que nos períodos transicionais podem apresentar ciclos anovulatórios. O início da atividade reprodutiva é estimulado pelo aumento do fotoperíodo. Da mesma forma, a diminuição do fotoperíodo leva ao cessar dessa atividade. O manejo dietético

é também de elevada importância, sendo que o facto de as éguas terem uma dieta adequada também contribui para que estas iniciem os seus ciclos éstricos. Atualmente, com a estabulação existente estas diferenças de fotoperíodo nem sempre são tão evidentes (devido à luz artificial dentro dos estábulos) o que pode, associado a um correto manejo dietético, levar as éguas estabuladas a apresentarem ciclos reprodutivos durante todo o ano (Hafez & Hafez 2004; Morel 2005).

O ciclo éstrico das éguas pode ser dividido em fases tanto seja relativamente à recetividade sexual (estro e diestro) como fases fisiológicas (fase folicular e fase luteal). Estas duas fases não se sobrepõem completamente, sendo o estro correspondente à fase folicular e início da fase luteal. O ciclo éstrico tem uma duração média de 21 dias, dos quais cerca de dezasseis dias são de diestro e cerca de cinco são dias de estro. A duração do estro está associada ao tamanho folicular no início do mesmo, taxa de crescimento do(s) folículo(s) dominante(s) e o tamanho do(s) folículo(s) quando ocorre a ovulação. A ovulação ocorre normalmente nas últimas 24-48 horas do estro. É o aumento dos níveis de progesterona secretada pelo corpo lúteo (CL) recém-formado que vai cessar o comportamento típico do estro. As éguas atingem a maturidade sexual, começando a apresentar ciclos éstricos, entre os 10 e os 24 meses de idade. Após o parto, o primeiro ciclo éstrico - cio do poldro - ocorre em quatro a 12 dias, seguindo-se os normais ciclos de 21 dias aproximadamente (Morel 2005; McCue *et al.* 2011; Stout 2012).

Em cada ciclo podem observar-se alterações hormonais, de comportamento e no trato reprodutivo. As referidas alterações são controladas pelo eixo hipotálamo-pituitário-gonadal (EHPG), através das hormonas produzidas nestas glândulas. A atividade do EHPG é determinada pelo fotoperíodo, como já referido. A informação da luz é recebida pelo olho, que leva a informação nervosa até à glândula pituitária, que por sua vez produz melatonina para passar a mensagem ao hipotálamo. A melatonina é uma hormona produzida na ausência de luz. Nos equinos esta inibe a produção da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH). A diminuição dos níveis de melatonina vai induzir o aumento de produção de GnRH. A GnRH vai estimular a glândula pituitária anterior a produzir a hormona folículo estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH) (Hafez & Hafez 2004; Morel 2005; Alexander & Irvine 2011a).

Como o nome sugere, a FSH vai estimular o desenvolvimento folicular. Esta hormona tem dois picos durante o ciclo éstrico: um mais pequeno entre os dias 9 e 12 do ciclo e outro maior na altura da ovulação. Por sua vez a LH tem apenas um pico após a ovulação.

Os estrogénios são hormonas derivadas do colesterol tal como todas as hormonas esteróides. Estas hormonas são produzidas essencialmente nos ovários, pelas células da granulosa e da teca com o auxílio da LH e da FSH. Na égua, não são só os folículos que produzem

estrogénios. O CL também produz estrogénios, sendo necessário um CL ativo para que os níveis de estrogénios aumentem entre os 35 e os 50 dias de gestação. No entanto o mecanismo desta produção por parte do CL ainda não está completamente compreendido. A glândula adrenal também pode produzir pequenas quantidades de estrogénios. Os níveis de estrogénio começam a subir aproximadamente entre os seis a oito dias antes da ovulação e têm o pico um a dois dias antes da mesma. Esta duração é variável com a sazonalidade, sendo normalmente maior no início da época reprodutiva e menor no seu pico. O estrogénio é o responsável pelas alterações típicas do estro na égua: relaxamento do cérvix, edema no útero, aumento das secreções uterinas, estimulação pituitária para libertação da LH e recetividade ao garanhão. Os níveis de estrogénios começam a reduzir antes da ovulação, devendo atingir o nível basal um ou dois dias depois da ovulação. (Christensen 2011; McCue *et al.* 2011).

Após a ovulação o folículo colapsa, os capilares sanguíneos que anteriormente serviam para nutrir o folículo sangram e formam um coágulo de sangue - o corpo hemorrágico (CH - Figura 25). A teca interna vai então desenvolver-se concentricamente e as suas células transformar-se em células luteínicas, formando o CL (Figura 26). O CL secreta progesterona, também esta uma hormona esteróide. Os níveis de progesterona aumentam imediatamente após a ovulação e mantêm-se elevados durante a gestação ou, no caso de não haver gestação, voltam a diminuir entre os dias 14 - 16 do ciclo éstrico. Esta diminuição deve-se à luteólise provocada pela libertação de prostaglandina F₂-alfa (PGF₂α) pelo útero. Esta diminuição é relevante para o novo ciclo porque a progesterona inibe a secreção de LH e diminui a secreção da FSH - impedindo o começo de um novo ciclo éstrico. Em éguas gestantes a presença do embrião no lúmen uterino inibe a secreção de PGF₂α pelo endométrio. Não ocorre luteólise e prolonga-se a secreção de progesterona pelo CL, que passa a denominar-se CL primário. (Morel 2005; McCue *et al.* 2011; Vanderwall 2011).



Figura 25 - Imagem ecográfica de um CH
McCue *et al.* 2011

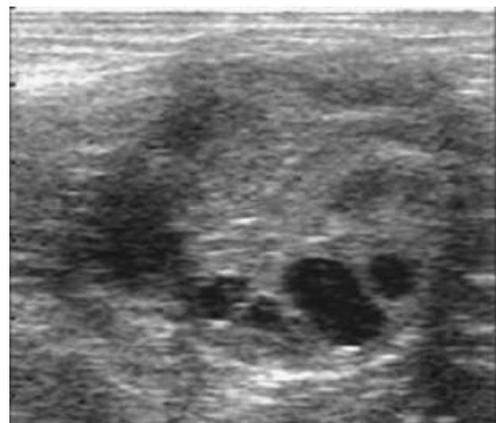


Figura 26 - Imagem ecográfica de um CL
McCue *et al.* 2011

3. Início da gestação na égua

A gestação na égua tem uma duração média entre os 315 e os 360 dias. Entre o quinto dia e meio e o sexto dia e meio de gestação o embrião desce para o útero. Não havendo ainda diferenças hormonais entre uma égua gestante ou não gestante (Morel 2005).

Até ao 40º dia de gestação é o CL primário que produz a progesterona, que vai impedir a égua de entrar em novo estro. A partir do 40º dia de gestação há a formação de CL secundários e acessórios, que vão ajudar na manutenção dos níveis de progesterona. Os CL secundários e acessórios acabam por regredir por volta do 150º dia de gestação. Os CL secundários são formados após a ovulação de folículos enquanto os CL acessórios são formados pela luteinização de folículos anovulatórios. A formação destes CL é estimulada pela ação combinada da FSH e da Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG), esta última secretada pelos cálices endometriais. A partir do 70º dia de gestação a placenta inicia a produção de progesterona. No entanto, a progesterona produzida pela placenta só é suficiente (sem a ajuda da progesterona ovárica) para manter a gestação aproximadamente aos 100 dias de gestação. Fisiologicamente, a transição da progesterona ovárica para a placentária é gradual até aos 180 dias de gestação, quando os CL regredem, e manter-se-á aproximadamente até aos 240º a 300º dias de gestação (Caixeta *et al.* 2006; McDowell & Sharp 2011; Ousey 2011; Vanderwall 2011).

Para que não ocorra a luteólise do CL é necessário que haja um sinal do embrião que iniba a secreção de PGF2 α pelo útero. Este processo denomina-se reconhecimento materno da gestação. Nas éguas há uma forma precoce deste reconhecimento materno ainda quando o embrião se encontra no oviduto. É permitido o transporte de embriões do oviduto para o útero, mas não é permitido o transporte de óocitos não fecundados. O mecanismo desta seleção ainda não está totalmente estudado, mas pensa-se que estará relacionado com a libertação de prostaglandina E2 pelo embrião. Esta prostaglandina tem a propriedade de provocar contrações locais e relaxamento da musculatura lisa, permitindo assim que o embrião se mova progressivamente. Uma vez que o embrião se encontre no útero ainda não é garantida a inibição da luteólise. Pensa-se que o reconhecimento maternal da gestação, que impede a luteólise, esteja associado à produção de estrogénios pelo embrião, mas o processo ainda não é totalmente compreendido. A movimentação do embrião pelo útero também é de extrema importância no reconhecimento materno da gestação (Allen 2000; Caixeta 2006; McDowell & Sharp 2011; Ousey 2011). McDowell & Sharp (2011) mostraram que quando o embrião tem acesso apenas a metade do útero só 50% das éguas conseguem reconhecer a gestação e manter o CL funcional. Mostraram ainda que quando o embrião tem acesso apenas a um corno uterino só 12% das éguas mantiveram a gestação. Posteriormente os mesmos autores

realizaram outro estudo onde demonstraram que restringindo-se o embrião mas administrando progesterona sintética (Regumate) quatro em cinco (80%) éguas mantiveram a gestação e foram positivas no teste da eCG realizado aos 40 dias de gestação.

O embrião equino é concebido no oviduto onde permanece até à passagem para o útero aproximadamente seis dias após a ovulação. Durante o desenvolvimento no oviduto, o embrião não aumenta de dimensão sendo esta semelhante ao oócito não fertilizado com um diâmetro entre os 149 e 180µm. Nesta fase, o embrião encontra-se em transição entre a mórula e os estágios de blastocisto. A cápsula do embrião é então formada e é aproximadamente no primeiro dia no útero que o embrião sai da zona pelúcida, enquanto blastocisto. A cápsula é estruturalmente forte e de extrema importância para a manutenção da gestação, continuando a função protetora anteriormente desenvolvida pela zona pelúcida. A fase de maior crescimento do conceptus ocorre entre o dia 11 a 16 de gestação. O conceptus mantém a sua forma esférica cerca 17 dias. Neste momento, os seus contornos externos tornam-se irregulares devido à alteração na estrutura da cápsula que se torna flácida. Dá-se então a sua fixação e orientação, ficando o embrião na zona ventral do saco embrionário. As dobras amnióticas desenvolvem-se à volta do embrião, até se fundirem e formarem o âmnio. Nesta altura a cápsula ainda está presente, perdendo-se por volta do dia 21 pós-ovulação. Entre os 21 e os 28 dias de gestação desenvolve-se rapidamente o sistema circulatório, começa a detetar-se forma corporal e desenvolve-se a membrana alantóide. Esta membrana alantóide vai envolver o embrião e fundir-se com o córion externo, formando a corioalantóide que irá formar a placenta (Figura 27). No dia 25 a membrana corioalantóide e o seu conteúdo líquido constituem cerca de 25% do volume do conceptus, e aproximadamente no dia 45 ocupa o espaço deixado pelo saco vitelino, que desaparece (Caixeta *et al.* 2006; Carnevale 2006; Allen *et al.* 2011; Betteridge 2011).

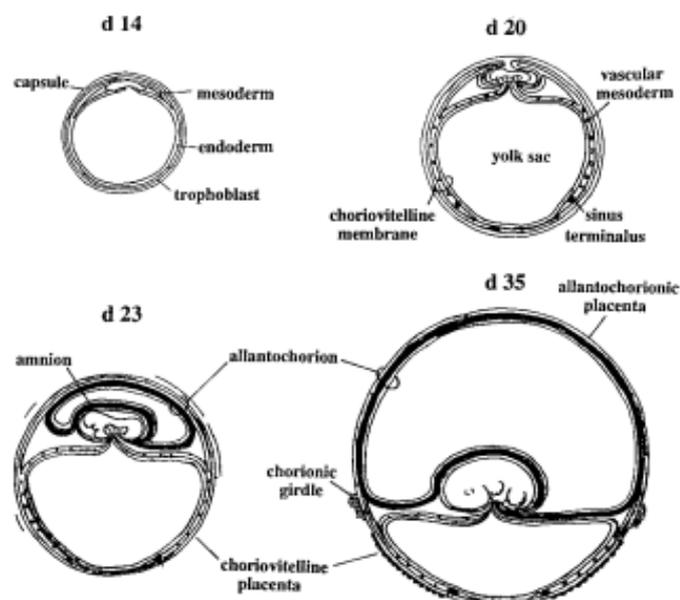


Figura 27 - Representação do desenvolvimento das membranas fetais entre os dias 14 e 35 dias pós-ovulação. Allen 2000

Durante o estágio acompanhamos três casos de gestação gemelar num total de setenta e sete casos, o que corresponde a uma taxa de 3.8%. Segundo McKinnon (2011) a ocorrência de gémeos é repetida na mesma égua, a taxa de gestações gêmeares varia com a raça e quanto mais fértil é o garanhão mais gestações gêmeares vai produzir. Antigamente a gestação gemelar era a maior causa de perda embrionária precoce. Atualmente com o desenvolvimento da ultrassonografia conseguem-se taxas de perdas associadas a gestação gemelar tão baixas como 1.7%, devido à facilidade em diagnosticar as gestações antes dos 16 dias e podendo-se então optar pelo esmagamento de um dos gémeos. A égua é naturalmente bastante eficiente a reduzir gémeos a uma só gestação. Há uma competição pelos nutrientes que é relacionada com o tamanho e posicionamento do embrião. No entanto nem sempre acontece esta redução, sendo importante o acompanhamento veterinário adequado para prevenir perdas económicas associadas com estas gestações. O procedimento que acarreta menos riscos e que é preferencialmente utilizado na prática veterinária é o diagnóstico de gestação antes dos 16 dias. Desta forma normalmente é possível identificar precocemente uma gestação gemelar e esmagar um dos gémeos antes da fixação, aos 17 dias. A placenta nesta espécie é do tipo difusa, microcotiledonária e epiteliocorial pelo que a competição pelo contacto com o endométrio materno, por parte das placentas, resulta em insuficiência placentária, que na maioria das vezes leva a perda da gestação. Sabe-se ainda que na gestação gemelar são frequentes os partos prematuros (muitas vezes associados a distócias que podem comprometer o rendimento reprodutivo futuro da égua) e que há uma tendência para os poldros gémeos terem um desenvolvimento menor do que o esperado, acrescentando muitas vezes custos de neonatologia veterinária. Todos estes fatores levam a que a gestação gemelar seja indesejada pela maioria dos criadores (Hafez & Hafez 2004; McKinnon 2011).

No entanto, no contexto da transferência de embriões esta questão não se coloca por se recolher vários embriões de uma dadora e ser possível implantá-los em diversas recetoras.

4. Perda embrionária precoce

A Perda Embrionária Precoce (PEP) é definida como a perda da gestação antes do dia 60 da mesma. Os fatores que podem contribuir para a PEP foram classificados em intrínsecos, extrínsecos e embrionários (Vanderwall 2008).

- Fatores intrínsecos da PEP:

- **Doença endometrial:** inflamatória - endometrite crónica ou aguda - ou não inflamatória - como fibrose periglandular e quistos endometriais. A causa mais frequente de endometrite é a inflamação pós-cobrição ou infeções. Esta inflamação vai provocar libertação de PGF_{2α}, que a partir do quinto dia pós-ovulação vai atuar no CL levando à sua regressão, e à perda da gestação. A endometrite crónica e a fibrose periglandular nem sempre provocam subfertilidade, pois éguas idosas com estas patologias conseguem manter a sua gestação. Os quistos endometriais aumentam com a idade nas éguas, não se sabendo ao certo se o aumento da PEP estará associado aos quistos ou ao envelhecimento da égua. Existem dois processos pelos quais se pensa que os quistos endometriais possam afetar a gestação: se tiverem um diâmetro superior a três centímetros podem afetar a mobilidade do embrião, interferindo no correto reconhecimento materno da gestação, e levando à produção de PGF_{2α} e conseqüente regressão do CL e à PEP; outro modo dos quistos endometriais afetarem a gestação, é no caso do embrião fazer a sua nidação perto do quisto, o que pode levar a uma falha do correto aporte sanguíneo (Carleton 2011; Vanderwall 2008). Num programa de TE, endometrite pós-cobrição pode causar PEP na égua dadora, a endometrite por infeção pode causar PEP tanto a dadora como a recetora e as doenças endometriais não inflamatórias podem ser causa de PEP nas recetoras.

- **Insuficiência de progesterona:** a suplementação em progesterona exógena tem-se feito empiricamente em éguas com PEP em que parece não haver outro fator que a justifique, apesar de não haver ainda documentação científica que comprove que esta administração faça realmente efeito (Vanderwall 2008; Carleton 2011). Esta causa estará associada às recetoras num programa de TE. No entanto, Hartman (2011) refere o uso de progesterona em dadoras desde que ovulam até à realização da TE.

- **Idade materna:** avaliou-se a viabilidade de embriões de éguas jovens e idosas num estudo em que os embriões foram transferidos, aos quatro dias pós-

ovulação, para recetoras jovens. A taxa de sobrevivência dos embriões foi de 84% no grupo das éguas jovens e de apenas 25% nas éguas idosas. Visto que os embriões foram recolhidos do oviduto, foi sugerido que os embriões das éguas idosas tivessem sido sujeitos a um ambiente desfavorável no oviduto ou que apresentassem defeitos inerentes aos próprios embriões. Foi então realizado outro estudo onde (com o auxílio da aspiração transvaginal ecoguiada de folículos) se transferiram oócitos de um grupo de éguas jovens e de outro de éguas idosas para recetoras jovens, eliminando-se assim o fator do ambiente desfavorável do oviduto das éguas dadoras. Doze dias depois foram feitos os diagnósticos de gestação por ecografia transretal e observaram-se 92% de diagnósticos positivos para o grupo das éguas dadoras jovens e 31% de diagnósticos positivos para o grupo das dadoras idosas. Estes resultados sugerem então que existam defeitos inerentes aos oócitos das éguas idosas, visto que estes nunca estiveram em contato com a genitália tubular das suas dadoras (Daels 2007; Vanderwall 2008; Carleton 2011).

- **Utilização do cio do poldro:** existem estudos que relacionam a utilização do cio do poldro com aumento de PEP, no entanto existem também estudos que não observaram diferenças de PEP nas éguas em que foi utilizado o cio do poldro e nas éguas que foram utilizados os cios seguintes. Esta discrepância pode dever-se a outros fatores relacionados com o manejo das éguas, por exemplo, éguas que foram tratadas devido a haver uma acumulação intrauterina de fluido tem um aumento significativo da PEP quando é utilizado o cio do poldro do que éguas em que este cio não é utilizado. São necessários mais estudos nesta área para esclarecer o efeito da utilização ou não do cio do poldro para inseminação ou para implantação de embriões na PEP (Carleton 2011; Vanderwall 2008).

- **Momento da inseminação relativamente à ovulação:** a inseminação pós-ovulação foi associada com um aumento de PEP, no entanto a causa permanece desconhecida. Uma hipótese será que a qualidade do oócito esteja alterada, permitindo a fertilização, mas inviabilizando o desenvolvimento embrionário. Outra hipótese será que o atraso na fertilização possa causar um atraso no desenvolvimento embrionário, que pode comprometer o bloqueio da luteólise. No entanto, outro estudo demonstrou que éguas inseminadas até seis horas pós-ovulação com sémen congelado não apresentavam maior taxa de PEP do que éguas inseminadas pré-ovulação, também com sémen congelado. Pode significar que os efeitos adversos da inseminação pós-ovulação podem-se verificar apenas quando esta é realizada a partir das seis horas pós-ovulação (Vanderwall 2008).

- **Local da fixação da vesícula embrionária:** a fixação na zona caudal do corpo uterino está associada com uma taxa de PEP extremamente elevada: em dezoito casos de fixação da vesícula embrionária nesta zona apenas três (17%) chegaram ao termo da gestação, treze (72%) perderam a gestação antes do dia 43 e as restantes duas (11%) éguas perderam a gestação aos quatro e aos seis meses. No entanto, uma fixação da zona cranial do corpo uterino não parece afetar o desenvolvimento embrionário precoce - apenas uma de nove éguas observadas perdeu o embrião durante a gestação. A causa deste aumento da PEP quando a fixação se dá no corpo uterino caudal ainda não é conhecida (Vanderwall 2008).

- **Fatores extrínsecos da PEP:**

- **Stress:** o stress associado com dor severa - como em casos de cólicas -, doenças infecciosas ou com o desmame resulta numa descida de entre 30 a 50% dos níveis de progesterona circulante em éguas gestantes. Pensa-se que a descida dos níveis de progesterona seja mediada por corticosteroides adrenais, libertados em situações de stress. No caso de endotoxémia, há um comprometimento da função do CL devido à libertação de PGF2 α endógena. Este último caso pode ser prevenido se for administrada flunixinina meglumina, em dose antiendotoxémica, no entanto tem que ser numa fase muito precoce - ainda antes de haver sinais clínicos. O outro modo de prevenção de PEP em casos de endotoxémia é a administração de progesterona exógena (Carleton 2011; Vanderwall 2008). Este fator pode afetar tanto dadora como recetora num programa de TE.

- **Nutrição:** Henneke *et al.* (1984) demonstraram que éguas inseminadas pós-parto com uma condição corporal baixa têm uma taxa de PEP bastante mais elevada do que éguas com uma boa condição corporal (75% para as éguas com baixa condição corporal e apenas 0 - 12% para éguas com boa condição corporal). A PEP pode ainda ser causada por plantas com efeitos nefastos para a gestação, como os fitoestrogénios (Carleton 2011).

- **Fatores embrionários da PEP:**

Tal como a idade da égua pode afetar a qualidade do oócito, pensa-se que a manipulação dos oócitos, espermatozóides e embriões possa também causar danos que, apesar de permitirem a gestação, possam levar a alterações no desenvolvimento embrionário e aumento da taxa de PEP, no entanto ainda não foi demonstrado e portanto é necessário mais informação concreta nesta área. (Vanderwall 2008).

Os sinais que podem alertar para uma possível PEP são: forma anormal da vesícula embrionária, mobilidade da vesícula embrionária para além do 16º dia de gestação, edema endometrial excessivo, vesícula embrionária de tamanho reduzido para a idade ou a diminuir de tamanho, perda de batimento cardíaco do embrião, alterações na ecogenicidade da vesícula embrionária e desenvolvimento anormal das membranas embrionárias (Carleton 2011; Vanderwall 2008).

Para se reduzir a taxa de PEP é importante que as éguas tenham (Vanderwall 2008):

- maneiio correto para conseguirem manter uma condição corporal ótima;
- vacinação adequada, assim como outros cuidados de saúde de rotina - como a profilaxia dentária e a desparasitação;
- ambientes calmos, tentando-se evitar situações stressantes - como a introdução de novas éguas na manada ou a competição pela comida.

Há casos, como nas deficiências inerentes ao oócito nas éguas idosas, em que pouco se pode fazer para evitar a PEP.

No caso de haver suspeita que possa vir a ocorrer PEP - como em casos de embriões pequenos para a idade, casos de endotoxémia ou de stress - deve-se ponderar a administração de progesterona exógena até aos 150 dias de gestação, quando a placenta assegura a produção de progesterona. Nos casos referidos pode haver libertação de PGF2 α , que leva à luteinização do CL com conseqüente diminuição dos níveis de progesterona. Sendo por isso aconselhada a administração de progesterona. No caso de endotoxémia deve ainda ser administrada flunixinina meglumina em dose antiendotoxémica (Carleton 2011; Vanderwall 2008).

Também de extrema importância é a observação regular das éguas, a fim de se poder detetar as PEP que ocorrerem e se poder reintroduzir essas éguas o mais brevemente possível (Vanderwall 2008). Carleton (2011) sugere um controle gestacional semanal para éguas idosas ou com alguma história progressa de PEP e quinzenal para as restantes éguas, até aos 60 dias de gestação.

5. Superovulação na égua

Um dos maiores custos associados à TE é manutenção de éguas que são programadas para serem recetoras mas acabam por não o ser na ausência de embriões aquando da recolha de embrião da dadora. Um dos métodos para reduzir este custo seria a superovulação das dadoras associada a um maior número de embriões obtidos por recolha. Outras vantagens da superovulação seriam: aumento do número de folículos que podem ser aspirados para colheira de oócitos, aumento da fertilidade de éguas subférteis ou aumento da taxa de gestações de garanhões subférteis (Squires *et al.* 2003)

A eCG é utilizada para induzir superovulações em ruminantes. No entanto, mesmo em altas doses, não é eficaz a induzir desenvolvimento folicular nem ovulação nas éguas. Allen (2005) refere que a concentração de recetores para a eCG é mais reduzida nas gónadas dos equinos do que nas gónadas de outras espécies. Este facto ocorrerá como uma defesa do organismo contra a hiper-estimulação pela eCG durante a gestação. A GnRH administrada a éguas em anestro sazonal induz o desenvolvimento de múltiplos folículos, mas quando administrada a éguas cíclicas também não é eficaz a induzir ovulações múltiplas (Squires *et al.* 2003; Allen 2005). FSH de origem porcina foi também utilizada em tentativas de superovular éguas. A administração de uma dose de 150mg BID aumenta o número de ovulações para apenas para uma e sete décimas por ciclo (Squires 2006)

Outro produto utilizado para induzir ovulações múltiplas nas éguas é um Extrato Pituitário Equino (EPE). No entanto as taxas de ovulação são muito variáveis, provavelmente devido à quantidade de FSH e LH não estar definida. A ovulação só pode ocorrer na fossa de ovulação devido à existência da túnica albugínea que cobre a restante área do ovário equino, o que implica uma competição dos folículos na movimentação pelo estroma até à fossa de ovulação. Os folículos que não conseguirem alcançar a fossa de ovulação luteinizam sem ovular. Isto faz com que mesmo que se consigam duplicar o número de oócitos ou embriões recolhidos, nunca seja possível ter superovulações muito numerosas nas éguas, como é possível noutras espécies (Squires *et al.* 2003; Allen 2005; Squires 2006).

Tal como nas ovulações espontâneas, a taxa de recolha de embriões por ovulação é de cerca de 50%. Portanto, de uma égua que tenha quatro ovulações consegue-se recolher, em média, dois embriões. A taxa de embriões recolhidos em éguas tratadas com EPE por ciclo é cerca de três a quatro vezes superior do que em éguas com ovulações espontâneas. Por sua vez, a taxa de gestação dos embriões recolhidos de éguas superovuladas é semelhante às taxas de gestação após TE de éguas com ovulações espontâneas (Squires *et al.* 2003).

Para maximizar a eficácia do EPE deve-se começar o tratamento no quinto dia pós-ovulação, sendo que a resposta ovulatória ao EPE é melhor se a égua apresentar todos os folículos com menos de 25mm de diâmetro aquando do início do tratamento. Deve-se ainda administrar Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) ou deslorelina para induzir as ovulações sincronizadas, quando houver vários folículos pré-ovulatórios com diâmetros superiores a 35mm. O uso de EPE num ciclo reprodutivo não parece influenciar os ciclos reprodutivos seguintes (Squires *et al.* 2003).

Também se realizou um estudo para avaliar o efeito da administração de EPE com apenas uma administração diária e com duas administrações diárias. As éguas foram admitidas para o estudo quando estavam entre os seis e os oito dias pós-ovulação. Administrou-se PGF2 α a todas as éguas e formaram-se dois grupos, administrando-se EPE uma vez por dia ao primeiro grupo e duas vezes por dia ao segundo grupo. O número médio de dias de tratamento necessário para induzir múltiplas ovulações foi de seis dias e seis décimas para ambos os grupos. No entanto, no segundo grupo (com duas administrações diárias) o número médio de ovulações foi de sete e uma décima, enquanto no primeiro grupo (apenas uma administração de EPE diária) apenas se obteve uma média de duas ovulações e quatro décimas. O número médio de embriões recolhidos no primeiro grupo foi de um embrião e seis décimas, enquanto no segundo grupo se obteve uma média de três embriões e meio. Este primeiro estudo não conseguiu concluir se a diferença nos resultados se devia à frequência da administração ou à dose utilizada, visto que no primeiro grupo foram administradas apenas 25mg de EPE por dia enquanto no segundo grupo se administrou 50mg de EPE por dia, distribuído em duas administrações de 25mg cada. Um estudo posterior concluiu que a administração da EPE duas vezes por dia é mais eficaz do que apenas uma administração diária (Squires *et al* 2003).

Em 2003 foi lançado comercialmente FSH equina (eFSH) para indução de superovulação nas éguas. Conseguiu-se uma média de três ovulações e quatro décimas quando se realizou o tratamento com 25mg de eFSH BID e se administrou hCG para indução da ovulação imediatamente após o fim do tratamento com a eFSH. Posteriormente foi realizado outro estudo onde atrasaram a administração da eFSH de um dia e meio a dois dias. Neste segundo estudo conseguiu-se uma média de quatro ovulações e uma décima, resultando numa média de dois embriões e seis décimas por ciclo (Squires 2006).

6. Transferência de embrião

O primeiro ser nascido de TE foi um coelho, em 1890. Seguiram-se os ratos na década de 30, década onde também começaram os primeiros esforços para aplicar a TE aos grandes animais. Nos anos 50 nasceram os primeiros leitões, bezerros e borregos de TE, sendo que nestes primeiros animais os embriões eram implantados no útero das recetoras cirurgicamente. Nos anos 60 nasceram os primeiros bezerros e leitões de TE não cirúrgica, utilizando já a técnica transcervical (McCue 2009).

Em 1971 realizou-se, com sucesso, a primeira transferência de embriões entre burros e cavalos, na “Animal Research Station” em Cambridge, Grã-Bretanha (Allen, 2005). O primeiro poldro obtido por transferência de embriões nasceu em 1974 por Oguri e Tsutsumi, no Japão. Mas apenas nos anos 80 se começou a realizar a TE em equinos comercialmente, na Argentina. Era utilizada como um método de produzir descendência das melhores pónies de pólo - sem que estas interrompessem as suas carreiras desportivas. Atualmente, a recolha e TE, é permitida em muitas raças. No entanto, a hesitação de algumas associações de raças em permitir o registo de múltiplos poldros obtidos por TE constituiu uma forte limitação à expansão desta biotecnologia (McCue 2009; Pashen *et al.* 1993).

Segundo Stroud (2011), foram reportadas 36 955 TE em 2009 e em 2010 foram reportadas 41 652 TE. Entre os países que reportam as TE para esta base de dados, lideram:

- Brasil - em 2010 foram reportadas 14 422 TE;
- Argentina - em 2010 foram reportados 8 226 TE;
- Estados-Unidos - onde em 1999 foram produzidos 1500 poldros por TE; em 2010 foram reportados 6 037 TE.

De referir que na Europa apenas a República Checa, a Hungria, a Itália e Portugal reportaram TE em equinos para a Sociedade Internacional e Transferência de Embriões, pelo que faltam bastantes dados nestas estatísticas.

Em Portugal o uso de técnicas de reprodução assistida parece ter tido um incremento nos últimos anos. É notório o interesse pela TE tanto por parte dos criadores como por parte dos médicos veterinários, no entanto não há dados sobre o número de TE realizadas (Rocha, 2011). A Associação Portuguesa de Criadores do Cavalo Puro Sangue Lusitano (APSL) permite, desde 2009, o uso de IA e TE. No entanto, só podem ser registados um máximo de três descendentes por égua anualmente, sendo que a comunicação para a utilização da égua dadora de embriões tem de ser feita à APSL até 31 de Dezembro, precedente da época de monta - em regulamento do livro genealógico do Cavalo Lusitano, anexo V, artigos 15º a 17º, Março de 2010 (Anónimo 2010).

Apesar de inicialmente a TE ter como objetivo a obtenção de poldros de éguas idosas ou subférteis, chegou-se à conclusão que os embriões produzidos por estas éguas são tendencialmente defeituosos e como tal revelam taxas de sobrevivência na recetora bastante baixas (Vanderwall 2000; Squires *et al* 2003; Daels 2007; Carleton 2011; Hartman 2011). Atualmente, as aplicações desta técnica incluem:

- obtenção de poldros de éguas com carreira desportiva ativa;
- obtenção de poldros de éguas que são vendidas;
- obtenção de vários poldros da mesma égua, no mesmo ano;
- obtenção de poldros de éguas com dois anos;
- obtenção de poldros de éguas com problemas de saúde não reprodutiva;
- utilização como ferramenta de pesquisa;
- produção de descendentes de espécies de equídeos ameaçadas, como o cavalo *Przewalski* e as zebras (Vanderwall 2000; Allen 2005; Daels 2007; Carleton 2011; Hartman 2011).

Os equídeos têm a capacidade de se cruzarem livremente entre as espécies diferentes do género (cavalo, burro e zebra) produzindo descendentes normalmente inférteis. Têm também a capacidade de levar a termo gestações de embriões transferidos entre as diferentes espécies (Figura 28), tendo-se já obtido produtos de TE de: égua para burra; burra para égua; cavalo *Przewalski* para égua; zebra para égua; égua para mula e burra para mula (Allen 2005).



Figura 28 - Descendentes de burros, cavalo *Przewalski* e zebras obtidos por TE para éguas recetoras (Allen, 2005)

Os riscos associados à TE são semelhantes aos da IA, nomeadamente os riscos relacionados com palpações transretais, a própria IA e lavagens uterinas (Coutinho da Silva 2008). Há também o risco da dadora ficar gestante depois de uma recolha de embrião falhada e por isso

administra-se PGF2 α após a colheita do embrião para se garantir que a dadora não fica gestante (Carleton 2011).

O sucesso da TE é calculado segundo duas variáveis: a recolha de embriões e a taxa de gestações após implantação. A média das recolhas de embriões, por ciclo, em éguas com uma ovulação simples é aproximadamente de 50% - sendo que este valor cresce se forem éguas jovens. A taxa de gestações após TE com embriões de qualidade excelente varia entre os 65 - 75%. O que resulta num sucesso da TE entre 33 a 38%, por ciclo segundo Coutinho da Silva 2008. Por outro lado, Hartman 2011 afirma que as taxas de recolha de embriões podem ser iguais ou mesmo superiores às taxas de gestação por ciclo de um determinado garanhão. Isto significa um sucesso de recolha de embriões presentes no útero de 100%. O mesmo autor refere que para um programa de TE com sucesso deve-se ter como objetivo 90% de gestações positivas aos 12 dias e 85% aos 30 dias de gestação.

Uma grande dificuldade do procedimento reside na organização de todos os componentes que afetam o sucesso, como o manejo da dadora, a qualidade e a sincronização da recetora (Hinrichs & Choi 2005; Coutinho da Silva 2008).

6.1. Escolha das recetoras

A seleção e o manejo correto da(s) recetora(s) é um fator de crucial importância para o sucesso de um programa de TE. A(s) recetora(s) não devem ter anomalias no seu ciclo estrico, assim como no seu útero ou ovários. Pode ser necessária a realização de uma Caslick se a conformação vulvar assim o indicar. A(s) recetora(s) devem ainda apresentar boa condição física, adequada saúde dentária e uma glândula mamária capaz de amamentar um poldro. Hopkins & Meadows (2003) sugerem que na seleção das recetoras seja realizada palpação transretal, ecografia transretal do aparelho reprodutor, biópsia, cultura e citologia uterinas. Deve-se confirmar que as candidatas a recetoras estejam a ciclar e a ovular normalmente (exceto se se optar pelo uso de éguas não cíclicas). Devem ter idades entre os três e os dez anos. É ainda de extrema importância que a recetora seja dócil e tenha instinto maternal, dando-se preferência a éguas que já tenham amamentado anteriormente (Carleton 2011; Hartman 2011).

Quando se encontram no estro, as recetoras devem ser examinadas diariamente por palpação transretal e ultrasonografia para monitorizar o desenvolvimento folicular e detetar a ovulação. A ovulação da(s) recetora(s) deve ocorrer entre um dia antes a três dias depois da ovulação da dadora (Vanderwall 2000).

6.2. Preparação das recetoras

A sincronização de ciclos éstricos permite que tenhamos um grupo de éguas que concentram os seus estros num curto espaço de tempo. Implica que as inseminações, os diagnósticos de gestação e os partos também se concentrem em curtos intervalos de tempo. Em termos de maneiio esta concentração dos acontecimentos pode facilitar muito o trabalho de campo, especialmente perante situações de eguadas que tenham pouco maneiio ou pouca supervisão fora destas épocas de trabalho reprodutivo. No caso da TE a sincronização de cios torna-se indispensável pois é necessário que a dadora e a(s) recetora(s) estejam sincronizadas de modo a poder fazer-se a TE e o embrião continuar o seu desenvolvimento normal na recetora (Morel 2005).

Existem as seguintes três formas de preparar as recetoras para TE (Hopkins & Meadows 2003):

- Se houver uma eguada disponível, pode-se rastrear a fase do ciclo éstrico das éguas. Devem-se procurar duas recetoras que tenham ovulado de um dia antes a dois dias depois da égua dadora.
- Pode-se utilizar éguas que não estejam cíclicas – seja por sazonalidade ou por ovariectomia - sendo necessário administrar progesterona desde seis dias antes da TE até aos 150 dias de gestação.
- Sincronização dos cios recorrendo à administração de hormonas. No entanto, este é o método com menos sucesso segundo Hopkins & Meadows (2003).

Para a sincronização de cios pode-se administrar um progestagénio (como o altrenogest) durante 10 a 15 dias, o que provoca uma fase luteal artificial na égua, cessando a atividade ovárica. O final do tratamento vai induzir o começo de um novo ciclo éstrico passados três a sete dias, semelhante ao que acontece naturalmente quando o CL regride (Morel 2005).

Se a égua tiver um CL, a administração de PGF2 α provoca a sua regressão e permite desse modo uma nova subida dos níveis de FSH e LH, que levam a um novo estro em três a sete dias. É necessário ter em atenção que a PGF2 α só exerce o seu efeito em CL entre os quatro e os catorze dias do ciclo (Allen 2005; Morel 2005).

É possível realizar os dois tratamentos já referidos na mesma égua, fornecendo o progestagénio e depois interrompendo o mesmo e administrando a PGF2 α , como acontece naturalmente quando o útero secreta PGF2 α para regredir o CL. No entanto neste caso poder não haver um CL, dependendo da fase em que se começou a administração da progesterona (Morel 2005).

É também possível induzir a ovulação, administrando a hCG ou a deslorelina, que na presença de um folículo maduro provocam a ovulação nas 24 a 48 horas seguintes. A hCG tem um efeito similar à LH e a deslorelina é um potente análogo sintético da GnRH, induzindo secreção de LH e deste modo induzindo a ovulação. Alguns estudos sugerem que as éguas desenvolvem anticorpos contra a hCG, deixando de responder após algumas administrações da mesma (Allen 2005; Morel 2005; Canesin *et al.* 2010).

Hartman (2011) refere a utilização de luz artificial para aumentar o fotoperíodo a que as éguas são sujeitas, garantindo assim uma entrada precoce na época de reprodução. Este autor refere a exposição a 16h de luminosidade diária a começar no meio do novembro, com o objetivo de ter éguas cíclicas em fevereiro.

Um dos fatores que mais afeta a probabilidade do estabelecimento de uma gestação após a TE é a sincronia entre a égua dadora e a recetora. Apesar da enorme variedade da duração do ciclo éstrico das éguas dificultar os procedimentos de sincronização, o facto da sincronização requerida para a égua ser menos precisa que em outras espécies animais funciona como um fator compensatório. As recetoras que ovularam de um dia antes a três dias depois da dadora apresentaram grande probabilidade de levar a gestação a termo; fora deste intervalo, as taxas de gestação caem substancialmente. Foram feitos diversos estudos de modo a aumentar este intervalo. Carnevale *et al.* (2000) transferiram embriões para recetoras entre o quinto e o nono dia pós-ovulação, verificando que as perdas de gestação eram significativamente menores em recetoras no quinto ou sexto dia pós-ovulação do que em recetoras entre o sétimo e o nono dia pós-ovulação. As taxas de perdas embrionárias para as que se encontravam no oitavo dia (15,1%) eram aproximadamente o dobro das taxas de recetoras no quinto ou sexto dia pós-ovulação (7,3 e 8,6%). Os resultados sugerem que as recetoras utilizadas no início do seu ciclo são menos suscetíveis à perda embrionária (Vanderwall 2000; Carnevale *et al.* 2000; Allen 2005; Hinrichs & Choi 2005). Nos grandes centros de TE, onde estão disponíveis várias recetoras que são escolhidas quando há embriões para implantar, as recetoras são organizadas pelo dia pós-ovulação em que se encontram. Sendo normalmente escolhida uma recetora que esteja entre o quarto e o oitavo dia pós-ovulação (Hartman 2011).

O reconhecimento materno da gestação na égua pode afetar a produção de progesterona pelo CL e a qualidade do ambiente uterino. Assim, o reconhecimento da gestação pode não ser fiável em recetoras já no nono dia pós-ovulação. No caso de ter de se utilizar uma recetora no nono dia pós-ovulação está indicada a suplementação com progesterona no momento da TE. Os resultados indicam que o tempo após a ovulação da recetora é mais importante que a sincronização entre recetora e dadora, aquando da escolha de uma recetora (Carnevale *et al.* 2000).

A utilização de éguas não cíclicas - tratadas com progesterona - como recetoras pode ser também uma opção a ter em conta, especialmente no início da época reprodutiva, quando ainda não há muitas éguas a ciclar. As recetoras não cíclicas têm ainda a vantagem de não precisarem de sincronização, nem do controlo reprodutivo associado, estando sempre no ponto certo para receberem o embrião. Filho *et al.* (2004) fizeram um estudo retrospectivo onde avaliaram as taxas de gestação e de Perda Embrionária Precoce (PEP) em recetoras cíclicas e não cíclicas. Durante três épocas reprodutivas foram transferidos 264 embriões, dos quais 152 foram transferidos para recetoras cíclicas (grupo de controlo) e 112 foram transferidos para éguas não cíclicas. Foram formados quatro grupos distintos com as 112 recetoras não cíclicas: o “Grupo 1”, formado por 54 recetoras, foi tratado com 200mg/dia de progesterona de curta ação (P4; Northside Pharmacy; Lexington; USA); o “Grupo 2”, formado por 13 recetoras, foi tratado com 400mg da mesma progesterona de curta ação em dias alternados; o “Grupo 3”, formado por 30 recetoras, foi tratado com 1500mg de progesterona de longa ação (P4 LA 150; B.E.T. Laboratories; Lexington; USA) a cada 7 dias; o “Grupo 4”, formado por 15 recetoras, foi tratado com 1500mg de progesterona de longa ação a cada 6 dias. Os embriões foram transferidos para as recetoras entre os dias quatro e oito pós-ovulação ou entre os dias cinco e oito após o início da administração de progesterona nas éguas não cíclicas. Os diagnósticos de gestação foram realizados nos dias 12, 25 e 50 pós-ovulação, por ecografia transretal. As taxas de gestação no dia 12 (Controlo: 75.0%; Grupo 1: 75.9%; Grupo 2: 76.9%; Grupo 3: 76.6% e Grupo 4: 73.3%) e no dia 50 (Controlo: 61.8%; Grupo 1: 61.1%; Grupo 2: 61.5%; Grupo 3: 53.3% e Grupo 4: 60.0%), assim como as taxas de PEP (Controlo: 17.5%; Grupo 1: 19.5%; Grupo 2: 20.0%; Grupo 3: 30.4% e Grupo 4: 18.2%) não foram significativamente diferentes ($P>0.05$) nos diferentes grupos. Também não se observaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados os resultados das recetoras tratadas com progesterona de curta ação e progesterona de longa ação. Concluiu-se então que as recetoras não cíclicas podem ser utilizadas nos programas de TE com sucesso se forem tratadas com progesterona, nos parâmetros testados.

No momento da TE deve-se ainda verificar que a recetora tem (Hopkins & Meadows, 2003):

- um CL com um diâmetro mínimo de 30mm;
- sem líquido no útero;
- cérvix fechado;
- útero tubular.

Squires *et al.* (2003) e Hartman (2011) defendem que o tônus uterino e do cérvix são de extrema importância na escolha da recetora adequada.

Por todos os motivos já referidos, é aconselhável a existência de pelo menos duas recetoras, de modo a poder-se escolher a mais apropriada no momento da TE.

6.3. Dadora

Para que a TE seja bem sucedida é indispensável que a égua dadora seja capaz de desenvolver folículos, ovular um oócito saudável, transportar os gametas, fertilizar e transportar o embrião para o útero, fornecer um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento embrionário até à colheita do embrião e ter um cérvix funcional durante a primeira fase de gestação. Éguas que não apresentem estas condições - como éguas com: endometrite não-responsiva pós-cobrição, lacerações do cérvix não reparáveis ou alterações ao nível do útero ou ovidutos decorrentes de distócias - não devem ser candidatas a TE. Nestes casos as éguas devem ser encaminhadas para técnicas mais avançadas como a transferência de oócitos ou a injeção intracitoplasmática de espermatozóides. No caso de se detetar alguma anomalia tratável, deve-se realizar o tratamento correto antes de iniciar o programa de TE (Vanderwall 2000; Daels 2007; Coutinho da Silva 2008).

Quando se inseminam éguas com um bom sémen, a taxa de fertilização ronda os 90% em éguas jovens, baixando para os 85% em éguas idosas. No entanto, a taxa de diagnósticos de gestação positivos e de recolha de embriões é significativamente mais baixa em éguas idosas. Isto leva a crer que haja uma maior PEP em éguas idosas - menos de 10% em éguas jovens contra 60 a 70% em éguas idosas (Vanderwall 2008; Carleton 2011).

O objetivo do maneio da dadora é a obtenção de um embrião limpo e de tamanho fácil de transferir. Quando o útero não se encontra limpo na recolha de embrião é possível recolher embriões. Mas, mesmo sendo lavados laboratorialmente antes de implantados numa recetora, estes embriões têm dificuldade em sobreviver. É então de extrema importância não só controlar os folículos, mas também as condições uterinas durante o estro. É cada vez mais comum a utilização da mesma dadora para várias TE durante a mesma época reprodutiva. Deve-se vigiar o estado do útero durante toda a época reprodutiva, procurando sinais de endometrite ou de infeção uterina. Podem ser indicadas várias culturas uterinas durante a época reprodutiva (Hartman 2011).

6.4. Recolha do embrião

Tal como referido anteriormente, os embriões equinos normalmente entram no útero entre o quinto e o sexto dia pós-ovulação, quando são uma mórula compacta (Figura 29) ou um blastocisto expandido (Figura 30) (Hinrichs & Choi 2005; Carnevale 2006).

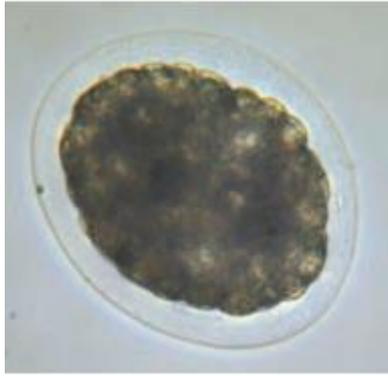


Figura 29 – Mórula, sendo a camada mais externa a zona pelúcida .
McCue *et al.* (2009)

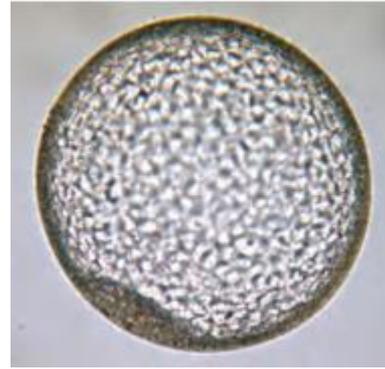


Figura 30 – Blastocisto expandido.
McCue *et al.* (2009)

Após a sua entrada no útero, o embrião tem um crescimento rápido (Tabela 3).

Tabela 3 - Diâmetros de embriões equinos. Adaptado de Vanderwall, 2000

Dia pós-ovulação	Número de embriões avaliados	Média do diâmetro do embrião (mm)
6	121	0.208
7	144	0.406
8	142	1.132
9	41	2.220

A recolha do embrião é normalmente realizada entre os dia seis e oito, considerando o dia zero o dia da ovulação. Os embriões são colhidos um dia mais tarde se a égua for inseminada com sémen congelado, se for uma égua idosa (pois o tempo que o embrião demora a percorrer o oviduto é maior e a sua taxa de crescimento menor) ou se for inseminada após a ovulação (Daels 2007). Cuervo-Arango *et al.* (2009) refere que o único fator que verdadeiramente influencia o tamanho do embrião parece ser a presença de espermatozoides no oviduto no momento da ovulação, pelo que embriões resultantes de inseminações pós-ovulação necessitam de aproximadamente um dia a mais para atingir dimensões semelhantes a embriões cuja inseminação foi realizada pré-ovulação. McCue *et al.* (2010) não obtiveram diferenças nos tamanhos dos embriões entre éguas com mais de 15 anos e éguas com menos de 15 anos. Os mesmos autores obtiveram embriões mais pequenos com a utilização de sémen congelado em comparação com sémen fresco ou refrigerado. Por outro lado, Hartman (2011) refere que os fatores que influenciam o tamanho do embrião são: a idade da dadora, a fertilidade do garanhão, o momento da inseminação em relação à ovulação e o momento da fertilização em relação à ovulação.

As taxas de recolha de embriões no dia sete, oito ou nove pós-ovulação são muito semelhantes sendo contudo ligeiramente menores para embriões com seis dias. Esta menor taxa pode ser atribuída à ausência de identificação do embrião no meio de lavagem, à perda do embrião durante os procedimentos de recolha devido à sua pequena dimensão, à dificuldade em obter o embrião no líquido de lavagem devido à sua grande gravidade específica ou falha de alguns embriões em entrarem no útero no dia seis, sendo as duas últimas razões apontadas como as mais prováveis. No entanto, os embriões com seis dias são menores, mais duros e representam a melhor opção para micromanipulações como bisseção e congelamento. Os embriões com oito dias são os de maiores dimensões que podem ser ainda facilmente colocados numa pipeta de 0.25ml para transferência. Em relação às taxas de gestação, os embriões com mais de oito dias parecem ser menos viáveis à transferência não cirúrgica devido ao seu grande ratio volume/superfície (McKinnon *et al.* 2007).

No dia escolhido para a recolha de embrião a égua dadora é contida num tronco. A cauda é ligada e é levantada para evitar a conspurcação da zona perineal. Procede-se então ao esvaziamento das fezes presentes na ampola retal de modo a minimizar-se a evacuação das mesmas durante a recolha do embrião. Segue-se uma preparação asséptica de toda a zona perineal, lavando-se as vezes necessárias com sabão e água, secando-se a toda a zona após a última lavagem. A secagem é importante que seja feita da comissura ventral da vulva para o ânus e não no sentido contrário, impedindo a contaminação da vulva com algum detrito que ainda esteja no ânus.

O método mais utilizado atualmente na recolha de embriões na égua é o método não-cirúrgico recorrendo a uma lavagem uterina transcervical. Insere-se um cateter Bivona/Foley com comprimento suficiente para ser conectado ao sistema de lavagem e com um balão insuflável. Uma vez em posição, o balão é insuflado com ar e é puxado caudalmente até embater no cérvix, selando assim o lúmen uterino. O cateter deve ser conectado a um sistema de lavagens, sendo o mais utilizado o sistema fechado com um "Y" central que garante uma via de passagem do meio utilizado para o útero e outra via do útero para o filtro (Squires *et al.* 2003; Allen 2005; Daels 2007; Coutinho da Silva 2008; Hartman 2011).

São introduzidos por gravidade 1-2 L de meio pré-aquecido (30 a 35°C). O volume introduzido depende do espaço no útero da égua. Em éguas jovens normalmente é suficiente 720-1000mL, mas em éguas mais velhas ou recém-paridas facilmente se introduz 2L. O meio utilizado pode ser LR ou um meio comercial para recolha de embriões equinos. Todo o sistema deve ser preenchido com o meio antes do início do processo, prevenindo a formação de bolhas de ar. Deve-se então preencher o útero com a solução de lavagem. O útero pode ser massajado através do reto de modo a garantir que todo o lúmen seja lavado, bem como para auxiliar na passagem do embrião das pregas endometriais para o meio de lavagem. O meio é então

recuperado por gravidade para um filtro de 75 μ (Figura 31). Deve-se monitorizar a quantidade de líquido inserido e recolhido do útero (Squires *et al.* 2003; Allen 2005; Daels 2007; Hartman 2011). Hartman (2011) refere alguma tolerância por parte do embrião a alterações de temperatura, permitindo a utilização de meio a temperatura ambiente (20-25°C).

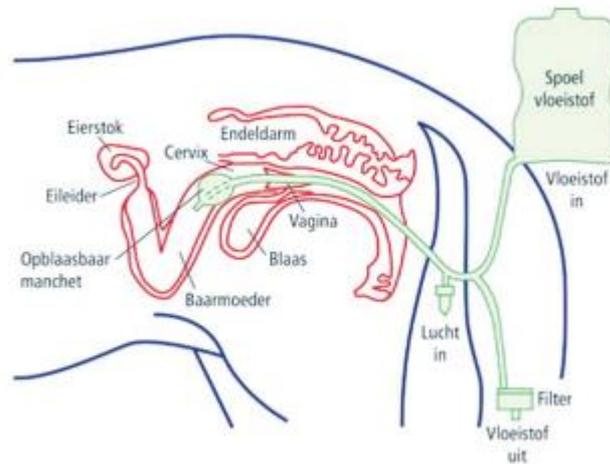


Figura 31 – Esquema do sistema de lavagem para a recolha de embriões equinos. Vandenberghe *et al.* (2012)

Outro método também utilizado é a recolha do líquido novamente para os recipientes que continham o meio inicialmente estéril, podendo igualmente utilizar-se LR ou outros meios comerciais para recolha de embriões. Este método vai simplificar a verificação da quantidade de líquido recolhido do útero e vai manter o embrião mais protegido. Posteriormente os recipientes são transportados para o laboratório, onde vão então ser filtrados (Daels 2007).

O procedimento deve ser repetido pelo menos três vezes. Um estudo com o objetivo de melhorar a recolha embrionária demonstrou que, 31,6% dos embriões são recuperados nos primeiros 3L de solução (Daels 2007). Foi sugerido que a taxa de recolha embrionária aumenta se a solução de lavagem for deixada por algum tempo (cerca de 3 minutos) no útero entre as lavagens, pois pensa-se que durante este tempo o embrião possa passar para a solução devido à sua mobilidade, sendo então recolhido. Também a administração de 20UI de ocitocina por via endovenosa poderá aumentar a taxa de recuperação embrionária pois estimula as contrações uterinas (Allen 2005; Daels 2007). Hartman (2011) sublinha a grande importância de assegurar a remoção completa do meio de lavagem do útero, principalmente na última lavagem, sob pena de predispor a dadora a endometrite.

6.5. Identificação e avaliação do embrião

A cada lavagem uterina o filtro pode ser examinado macroscopicamente para se verificar a presença do embrião. Após a última lavagem o conteúdo do filtro deve ser transferido para uma placa de Petri, prosseguindo-se a procura do embrião com o auxílio de uma lupa com ampliação de 10 a 50 vezes, que é quase sempre necessária para embriões com seis ou sete dias. Embriões com oito dias podem ser visíveis a olho nu pois apresentam um diâmetro médio de 0.5-1mm. De qualquer modo, a lupa é importante para a classificação da qualidade e desenvolvimento do embrião (Daels 2007).

Aquando de uma falha na fertilização, o ócito não fertilizado é normalmente retido no oviduto, não podendo ser recuperado nas lavagens. Caso um ócito não fertilizado seja encontrado, assume-se que provenha de um ciclo antigo e que acompanhou o embrião na sua passagem para o útero. Estes ócitos distinguem-se dos embriões pela sua aparência achatada, acelular e granular. Caso apenas o ócito seja encontrado, devem observar-se atentamente tanto o filtro como a placa de Petri para se tentar localizar o embrião (Daels 2007; McCue *et al.* 2010; McDowell & Sharp 2011).

Existem diversos métodos de lavar o embrião. O objetivo desta lavagem é eliminar qualquer microrganismo introduzido durante a recolha ou já presente no útero da dadora, de modo a não se infetar a recetora. Daels (2007) refere que o embrião pode ser passado por 12 placas de Petri com um a dois mililitros do meio utilizado. Hartman (2011) refere as placas de multi-poços como as mais práticas, aconselhando 10 lavagens (Figura 32).



Figura 32 - Lavagem do embrião em placa de multi-poços. Hartman (2011)

Um embrião de qualidade reduzida, verificada com o auxílio da lupa, reduz a probabilidade de estabelecimento de uma gestação na égua recetora, aumentando a incidência de PEP. A maioria dos embriões recuperados apresentam uma boa qualidade morfológica (mais de 90% são de grau 1 ou 2, Tabela 4), pois os embriões que degeneram em fases iniciais do seu desenvolvimento não conseguem completar o seu trânsito no oviduto. Tem-se verificado também que os embriões de grau 3 e 4 resultam em taxas de gestação significativamente mais baixas que os de grau 1 ou 2, 40% versus 68%, respetivamente. Gestações resultantes de embriões de grau 2 ou superior originam maiores perdas embrionárias ao 50º dia de gestação, 26% de perda embrionária precoce versus 12% de embriões grau 1. Mórulas ou blastocistos muito pequenos recolhidos no sétimo ou oitavo dia de gestação têm menor probabilidade de

resultar numa gestação viável, enfatizando que o atraso no desenvolvimento pode ser um sinal de baixa qualidade embrionária (Vanderwall 2000; Daels 2007; McCue *et al.* 2010).

Pouca coisa se pode fazer para remediar a má qualidade embrionária, podendo-se apenas tentar evitar as predisposições que reduzem a qualidade embrionária. Estas predisposições incluem a endometrite pós-cobrição e a idade materna avançada. As dadoras idosas não só influenciam na recolha embrionária como também reduzem a probabilidade de estabelecimento de uma gestação após transferência, com aumento da PEP. A avaliação com o auxílio da lupa apenas mostra algumas anomalias morfológicas do embrião, sendo necessárias técnicas mais complexas e mais demoradas para analisar certos aspetos da qualidade embrionária. Porém, um maior conhecimento da qualidade do embrião, nomeadamente o número de células mortas, não modifica a decisão de transferir ou não um embrião; quanto muito permite dar ao proprietário um prognóstico mais aproximado da realidade no estabelecimento de uma gestação (Daels 2007).

Tabela 4 - Classificação de embriões equinos - adaptado de Lira et al, 2009

Grau 1	Excelente	Embrião esférico com blastómeros de tamanho, cor e textura uniformes.
Grau 2	Bom	Com formato irregular ou com blastómeros extrusados.
Grau 3	Razoável	Alterações bem definidas mas não severas, como blastómeros extrusados, células degeneradas ou blastocele colapsado.
Grau 4	Mau	Alterações severas. Blastocele colapsado, bastantes blastómeros extrusados e muitas células degeneradas.
Grau 5	Morto ou não fertilizado	Embriões totalmente degenerados, ruturados ou oócitos não fertilizados.

6.6. Implantação do embrião na recetora

Quando se começou a praticar a TE em equinos, esta era realizada cirurgicamente. Realizava-se uma laparotomia com incisão na linha média ventral, sob anestesia geral, ou através do flanco, com sedação da recetora e anestesia local. Atualmente o método cirúrgico caiu em desuso. O método não cirúrgico apresenta vantagens tais como ser mais rápido, mais barato, sem os riscos inerentes a uma cirurgia para a recetora, melhor para o seu bem-estar e ainda permite que a mesma recetora seja utilizada mais vezes, porque não ficam cicatrizes. Quando

se trabalha com recetoras de boa qualidade, os operadores experientes conseguem taxas de gestação acima dos 80% com o método não cirúrgico (Vanderwall 2000).

Hartman (2011) refere que o aparelho utilizado para transferir o embrião não é tão importante como a técnica utilizada. A transferência transcervical do embrião pode ser efetuada com o auxílio de uma pistola de transferência do tipo Cassou, depois de se colocar o embrião numa palhinha de 0.25 ou 0.5mL. A escolha do tamanho da palhinha depende do tamanho do embrião. Aconselha-se que o embrião não tenha mais de 60-70% do diâmetro da palhinha, sendo normalmente utilizadas as palhinhas de 0.25mL para embriões de sete dias e palhinhas de 0.5mL para embriões de oito dias. A palhinha é carregada com três colunas de meio, separadas por duas colunas de ar, sendo o embrião colocado na segunda coluna de meio. A primeira coluna de meio serve para lubrificar a extremidade da pipeta, enquanto que a terceira garante que o embrião possa ser empurrado para fora da mesma (Squires *et al.* 2003; Daels 2007; Hartman 2011).

Antes da transferência do embrião pode ser administrada acepromazina à recetora de modo a tranquilizá-la e a obter relaxamento. À semelhança do que foi feito à dadora, a cauda da recetora é ligada, a sua ampola retal é esvaziada e a zona perineal é ainda mais cuidadosamente lavada do que na dadora.

A técnica utilizada para manipular a pistola de implantação através do cérvix até ao útero difere entre os operadores. No entanto, o essencial é assegurar que esta entre no útero sem agentes contaminantes da vagina ou da vulva e com o mínimo traumatismo possível no canal cervical e no endométrio. Daels (2007) refere a pistola de inovulação com três camadas protetoras (Figura 33). A primeira é uma bainha que termina numa peça de metal redonda, com orifícios laterais, por onde sairá o embrião para o útero da recetora. Tem como função não ser traumatizante aquando da passagem pelo cérvix. A segunda camada é uma fina manga de plástico, que protege as anteriores da contaminação na vagina. Esta manga de plástico deve ser rasgada quando o conjunto que protegia já se encontra inserida na cérvix, de modo a que apenas este seja inserido no útero. A terceira camada protetora é uma luva de palpação com a mão cortada. O técnico deverá calçar uma luva de palpação, segurar a pistola de inovulação com a palhinha que contém o embrião, já protegida pela bainha e a manga de plástico, calçar a segunda luva de palpação e segurar na palma da sua mão a ponta cortada dessa luva. Deve então introduzir o conjunto na vulva da recetora, abrir a mão e deixar a luva com a mão cortada para trás de modo a não contaminar a parte cranial da vagina. O conjunto deve ser introduzido na cérvix e então deve-se rebentar a segunda camada protetora, a manga de plástico, de modo a que apenas a pistola de inovulação com a palhinha que contém o embrião, protegida pela bainha sejam introduzidas no útero (Squires *et al.* 2003; Daels 2007).

Cerca de três por cento dos embriões ficam retidos na peça metálica da pipeta. É então recomendado que após a transferência se lave cuidadosamente a ponta da pipeta com o meio utilizado e se procure o embrião. No caso de se encontrar o embrião pode-se voltar a montar a "arma Cassou" e transferir o embrião novamente (Daels 2007; Hartman 2011).

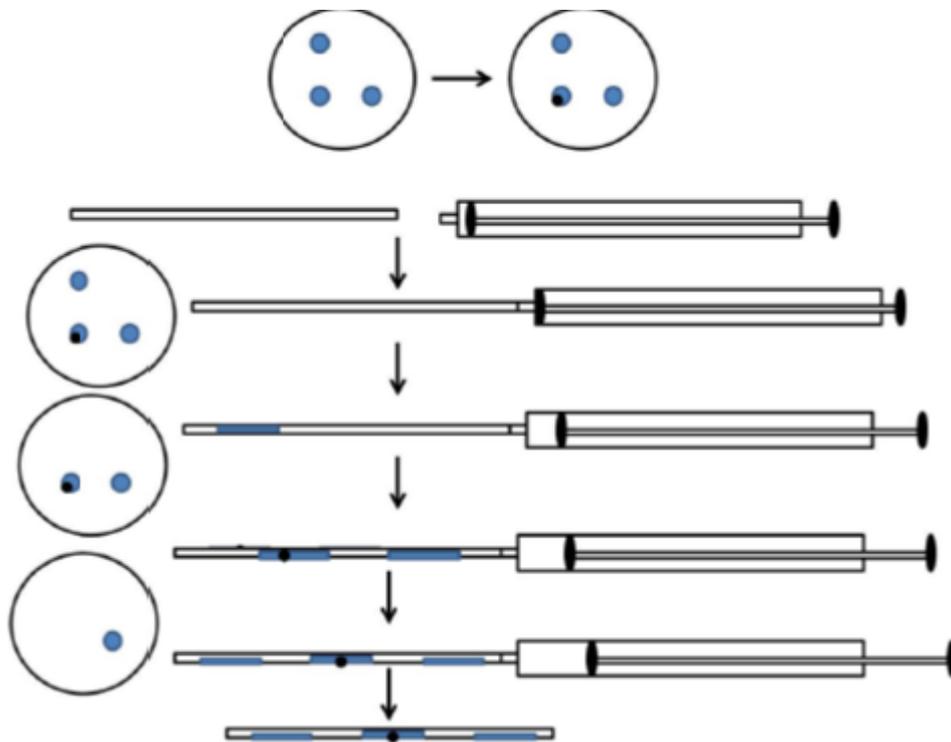


Figura 33 - Representação esquemática da preparação da palhinha carregada com o embrião

Sabe-se que o traumatismo e os estímulos mecânicos do trato genital podem ativar a cascata do ácido araquidônico, resultando na síntese e liberação de vários mediadores da inflamação nomeadamente da $\text{PGF2}\alpha$. É então legítimo questionar se a manipulação do trato genital aquando da TE não cirúrgica, poderá causar a liberação de $\text{PGF2}\alpha$ em quantidades que leve à luteólise. Um estudo realizado em 1997 (Kask *et al.*) verificou que as éguas respondiam à manipulação do trato genital com liberação de $\text{PGF2}\alpha$ mas a luteólise não era induzida. No entanto, a possibilidade de que a liberação da hormona possa afetar o embrião e o seu ambiente deve ser levada em conta e deve-se, portanto, causar o menor traumatismo possível.

6.7. Conservação e transporte de embriões

6.7.1 Refrigeração:

Já é possível conservar embriões, no meio Ham's F-10 gasificado com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, a uma temperatura de 5°C durante 24h sem decréscimos acentuados na sua viabilidade, o que tornou a TE mais acessível. Atualmente os embriões podem ser recolhidos a campo e transportados para centros especializados que têm recetoras e técnicos especialistas em TE. Isto vai permitir aos veterinários de campo fornecerem o serviço de TE sem terem os custos inerentes à manutenção de recetoras, possibilitando ainda uma escolha mais rigorosa destas. Atualmente há o inconveniente de, no caso de não se obter embrião na recolha, o meio Ham's F-10 depois de gasificado não poder ser armazenado (Squires *et al.* 2003; Stout 2006; Daels 2007).

Foi testada a utilização do meio Ham's F-10 com os tampões Herpes e BSA na conservação de embriões a 15-18°C até 18h, tendo-se concluído que esta conservação não diminui as taxas de gestação obtidas após implantação (Squires *et al.* 2003).

6.7.2 Congelação:

Existem dois grandes entraves à utilização de embriões congelados. Um que é o facto de algumas das raças não aprovar a inscrição no livro genealógico poldros de transferência de embriões congelados (TEC), o outro entrave é o pouco uso de tratamentos de superovulação nas éguas. A ovulação dupla espontânea nas éguas acontece com alguma frequência, sendo que nesses casos se pode optar por congelar um dos embriões, se o proprietário assim o desejar (Squires *et al.* 2003).

O embrião equino tem características biológicas únicas, formando a cápsula - uma membrana proteica acelular - que impede a penetração do crioprotetor e dificulta o congelamento dos blastocistos. Realizou-se um estudo em que congelaram embriões recolhidos no dia seis pós-ovulação e embriões recolhidos no sétimo dia pós-ovulação. Após descongelados e implantados nas recetoras, oito de dez (80%) dos blastocistos com seis resultaram em gestações, mas apenas um de sete (14%) blastocistos (recolhidos no sétimo dia pós-ovulação) resultou em gestação (Squires *et al.* 2003; Allen. 2005).

A congelação de embriões é utilizada para criar um banco de embriões (como um método de preservar material genético) e é também já utilizada comercialmente, especialmente quando não há recetoras disponíveis. Squires *et al.* (2003) preveem que a congelação de embriões possa sofrer um grande desenvolvimento quando a superovulação de éguas se tornar prática comum. Os mesmos autores também defendem que os embriões congelados (EC) são a maneira mais económica de transportar material genético pelo mundo.

IV. ACOMPANHAMENTO DE UM CASO CLÍNICO

1. Identificação da dadora e da recetora

Dadora: Senadora - seis anos. Égua de desporto com carreira ativa, da qual o proprietário pretendia ter vários poldros em 2014.

Recetoras: eguada com éguas entre os cinco e os nove anos.

2. Anamnese, sincronização de ciclos éstricos e manejo reprodutivo

Tanto a égua dadora como as possíveis recetoras eram observadas na exploração de origem.

A Senadora já tinha parido um poldro. Não tinha história de PEP nem foi detetada nenhuma alteração na palpação transretal nem no exame ecográfico reprodutivo.

A Senadora foi controlada ecograficamente para observação e seguimento do crescimento folicular e quando se previa a ovulação nas próximas horas sujeita a cobrição natural assistida em dias alternados até à deteção ecográfica da(s) ovulação(ões).

Quando a veterinária assistente detetava a ovulação da Senadora, avaliava ecograficamente a eguada de recetoras disponíveis à procura de uma adequada. Quando não era encontrada nenhuma recetora em boas condições, segundo os seus parâmetros, procurava uma recetora em estro e administrava hCG para induzir a ovulação. A recetora era novamente avaliada passado dois dias para verificar a ovulação.

Dadora e recetora eram, então, transportadas para a clínica, onde era efetuada a TE.

3. Primeira tentativa de recolha de embrião

Tabela 5 - Cronologia da 1ª tentativa de TE

Data	Hora	Procedimento
08.Jan.2013		Beneficiada por monta natural. Garanhão: Guapito.
09.Jan.2013	AM	Controlo ecográfico: CL
		<u>Recetora</u> - Controlo ecográfico: folículo ovárico deformado, com 47mm de diâmetro. Foi administrada hCG.
11.Jan.2013		<u>Recetora</u> - Controlo ecográfico: CL
17.Jan.2013		TE: não se obteve embrião; lavado limpo.

Os procedimentos foram realizados conforme exposto na Tabela 5. O Guapito apresentava história de dificuldade em deixar éguas prenhas na época reprodutiva anterior. Por outro lado foi a primeira cobertura da época reprodutiva de 2013, o que por si só pode significar uma baixa na qualidade do seu sémen, visto que os espermatozoides já se encontram armazenadas há vários meses e já não tem a mesma qualidade de espermatozoides mais jovens. Realizou-se então um espermograma ao Guapito (Anexo 2), de modo a avaliar-se a sua fertilidade e até que ponto era viável continuar o programa de TE com o seu sémen. Aquando da análise do espermograma o sémen (colhido no dia anterior à análise e imediatamente diluído e refrigerado) apresentava apenas 3% de espermatozoides imóveis, uma motilidade progressiva de 72% e 8% de formas anormais. Assim sendo descartou-se a hipótese de infertilidade do garanhão.

4. Segunda tentativa de recolha de embrião

Tabela 6 - Cronologia da 2ª tentativa de TE

Data	Hora	Procedimento
15.Fev.2013		Beneficiada por monta natural. Garanhão: Guapito. Folículo ovárico de 47mm de diâmetro. Apresentava pouco edema uterino e teve que se utilizar sedação e contenção com o aziar para a conseguirem cobrir.
17.Fev.2013		Controlo ecográfico: CL
23.Fev.2013		TE: a dadora apresentava edema uterino e liquido intrauterino. Cancelou-se a TE e administrou-se oxitocina IM.

Os procedimentos foram realizados conforme exposta na Tabela 6. Suspeitou-se que houvesse uma infeção uterina que estivesse a provocar o edema e a acumulação de líquido intrauterino. Foi realizada uma lavagem uterina no dia 24 de Fevereiro pela veterinária assistente na exploração. Obteve pequena quantidade de líquido intrauterino pouco turvo, no entanto dois dias mais tarde foi feita nova lavagem onde obteve líquido intrauterino em quantidade aumentada. A pouca quantidade de líquido obtido no dia 24 poderá dever-se à administração de oxitocina no dia 23. A oxitocina estimula as contrações uterinas e a expulsão do líquido. A veterinária assistente prescreveu cinco dias de tratamento oral com enrofloxacina.

5. Terceira tentativa de recolha de embrião

Tabela 7 - Cronologia da 3ª tentativa de TE

Data	Hora	Procedimento
18.Mar.2013	PM	Beneficiada por monta natural. Garanhão: Guapito.
19.Mar.2013	AM	Controlo ecográfico: CL. <u>Recetora</u> - administração de hCG.
21.Mar.2013		<u>Recetora</u> - Controlo ecográfico: CL.
26.Mar.2013		TE: não se obteve embrião; lavado inicialmente turvo e com pequenas partículas pretas.

Os procedimentos foram realizados conforme exposto na Tabela 7. A veterinária assistente voltou a prescrever cinco dias de tratamento oral com enrofloxacina, com início a 19 de Março. Após a obtenção do lavado turvo foi realizada uma cultura uterina, a partir do mesmo (Anexo 3), juntamente com um antibiograma. A cultura revelou uma infeção por *Pseudomonas spp.* Foi então realizado um tratamento local com gentamicina durante quatro dias, assim como um novo tratamento oral com enrofloxacina durante nove dias.

6. Quarta tentativa de recolha de embrião

Tabela 8 - Cronologia da 4ª tentativa de TE

Data	Hora	Procedimento
6.Abr.2013	PM	Beneficiada por monta natural. Garanhão: Guapito.
7.Abr.2013	AM	Controlo ecográfico: CL
9.Abr.2013		<u>Recetora</u> - Controlo ecográfico: CL "recente", mas não se sabe quando ovulou.
15.Abr.2013		TE: obtenção de um embrião de grau II e implantação do mesmo na recetora <u>Recetora</u> - com o cérvix uterino pouco fechado e pouco tónus uterino.
22.Abr.2013		Diagnóstico de gestação positivo.
15.Mai.2013		Confirmação de gestação positiva.

Os procedimentos foram realizados conforme expostos na Tabela 8. Nos três procedimentos de colheita de embrião, foram feitas lavagens com LR utilizando o sistema tradicional descrito por Daels (2007) e McCue (2011). Foi introduzido um litro de LR no útero da égua dadora (Figura 34) que foi depois recolhido por gravidade para um balde. O balde estava graduado (com uma marca a cada litro) para que se pudesse verificar a quantidade recolhida. O fluido recolhido passava por um filtro (Figura 35) onde o embrião ficava retido. O procedimento era repetido quatro vezes. Na última lavagem uterina deixava-se o LR algum tempo no útero, massajava-se este por palpação retal e administrava-se oxitocina (IM) para aumentar as probabilidades do embrião passar para o LR.



Figura 34 - Introdução de 1 L de LR no útero da dadora



Figura 35 - Filtro utilizado para a recolha do embrião

7. Identificação, avaliação e lavagem do embrião

Na quarta tentativa, o embrião foi identificado macroscopicamente ainda no filtro e posteriormente observado à lupa (Figura 36). Foi avaliado em Grau 2 e foi então lavado (Figura 37 e 38). Para a lavagem foram utilizadas três placas de Petri, sendo que cada uma tinha três poças de LR. Fez-se o embrião passar por todas as poças, totalizando-se um total de nove lavagens. O embrião foi então colocado numa palhinha e foi montada a pipeta de inovulação.



Figura 36 - Observação do embrião



Figura 37 - Recolha do embrião para uma pipeta



Figura 38 - Lavagem do embrião

8. Implantação do embrião na recetora

A recetora selecionada pela veterinária assistente da exploração tinha oito anos e não sofreu manipulação do ciclo éstrico para a sincronização com a dadora, mas apresentava um CL recente. No dia da TE a recetora foi transportada à clínica juntamente com a dadora, não havendo portanto uma segunda escolha para implantar o embrião. A implantação foi realizada com o auxílio de uma pistola de inervação (Figura 39) já descrita anteriormente.



Figura 39 - Implantação do embrião na recetora

Após esta primeira TE bem sucedida, o programa continuou e realizaram-se mais duas TE (Tabela 9).

Tabela 9 - 5ª e 6ª tentativas de TE

Data	Hora	Procedimento
22.Mai.2013	PM	Controlo ecográfico: folículo dominante
23.Mai.2013	AM	Controlo ecográfico: CL. Inseminada com sémen refrigerado de outro garanhão.
25.Mai.2013		<u>Recetora</u> - Controlo ecográfico: CL.
31.Mai.2013		TE: não se obteve embrião. Lavado uterino limpo.
08.Jun.2013		Beneficiada por monta natural. Garanhão: Guapito <u>Recetoras</u> - Duas com CL ao controlo ecográfico, mas não se sabe quando ovularam.
09.Jun.2013		Controlo ecográfico: com dois CL
17.Jun.2013		TE: obtiveram-se dois embriões de Grau I, cada um foi implantado numa das recetoras disponíveis.
24.Jun.2013		Diagnóstico de gestação positivo para ambas as recetoras.
18.Out.2013		As três recetoras continuam gestantes.

Foram ainda realizadas mais duas tentativas de TE, conforme a Tabela 9.

9. Discussão

No caso da Senadora foram realizadas cinco tentativas de recolha de embrião, resultando em três recetoras gestantes. Houve uma tentativa cancelada e uma ovulação dupla espontânea, de onde resultaram duas recetoras gestantes. Obteve-se, portanto, um sucesso de 60%, que é significativamente mais elevado do que os 38% apontados por Coutinho da Silva (2008).

Em termos da dadora e das recetoras, foram utilizadas éguas jovens e sem qualquer alteração detetada. No entanto não foram realizados os testes recomendados por Hopkins e Meadows (2003), nomeadamente a biópsia, a cultura e a citologia uterina. No momento da primeira implantação de embrião a recetora também não apresentava todos os requisitos recomendados por Squires *et al.* (2003) e Hartman (2011). Apresentava um cérvix pouco fechado e pouco tónus uterino. Em nenhuma das TE se sincronizou as éguas artificialmente e não se sabia em que dia pós ovulação se encontravam as recetoras.

De salientar que nas vezes em que houve dúvidas relativamente à qualidade do sémen, ao momento da cobrição ou à qualidade do ambiente intrauterino, não se obteve embrião. Isto

demonstra a grande importância de um seguimento rígido de todo o processo envolvido na TE, de modo a se obterem os melhores resultados.

O controlo reprodutivo foi realizado pela veterinária assistente na exploração, sendo a dadora e a(s) recetora(s) transportadas para a clínica apenas para a realização da TE. Não foi possível fazer o acompanhamento recomendado. A dadora e as recetoras deviam ter tido um maior controlo reprodutivo e, conseqüentemente, devia haver mais informação relativamente aos seus ciclos éstricos e à sua sincronização. O ponto mais importante referido na bibliografia que falhou neste processo foi o adequado controlo das recetoras. Não foi possível saber o dia da ovulação das mesmas, não se sabendo se ovularam entre um dia antes a três dias depois da dadora como recomendado (Vanderwall 2000; Carnevale *et al.* 2000; Allen 2005; Hinrichs & Choi 2005). Também não foi possível escolher entre diversas recetoras as que tinham os melhores parâmetros na altura da TE como recomendado por Hopkins e Meadows (2003). Apenas era transportada à clínica a recetora escolhida pela veterinária assistente, não dando escolha no momento de implantar o embrião.

V. Considerações finais

Este estágio foi de extrema importância na minha formação. Foi uma experiência académica e pessoal essencial e singular. Permitiu-me contactar com a prática corrente da Clínica, Cirurgia e Reprodução Equina. Consolidar os conhecimentos teóricos aprendidos durante a minha formação académica e adquirir novos conhecimentos, assim como adquirir alguma prática.

BIBLIOGRAFIA

- ✓ Adkins A.R. (2012) *Establishing a diagnosis of septic arthritis/osteomyelitis – a challenging process*. Equine vet. Educ, 24 (12): 615-617
- ✓ Alexander S.L. & Irvine C.H.G. (2011a) *GnRH*. Equine Reproduction, Wiley-BlackWell, 2ª edição, USA, pp. 1608-1619
- ✓ Alexander S.L. & Irvine C.H.G. (2011b) *FSH and LH*. Equine Reproduction, Wiley-BlackWell, 2ª edição, USA, pp. 1619-1630
- ✓ Allen W.R. (2000) *The Physiology of Early Pregnancy in the Mare*. AAEP, In: <http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2000/338.pdf>, acessado a 27.08.2014
- ✓ Allen W.R. (2005) *The development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding*. Animal Reproduction 40, Blackwell Verlag, Berlin, pp. 310 – 319
- ✓ Allen W.R., Gower S. & Wilsher S (2011) *Fetal Membrane Differentiation, Implantation and Early Placentation*. Equine Reproduction, Wiley-BlackWell, 2ª edição, USA, pp. 2187-2200
- ✓ Annear M.J., Furr M.O. & White N.A. (2011) *Septic arthritis in foals*. Equine vet. Educ, 23 (8): 422-431
- ✓ Anónimo (2010) Regulamento do Livro Genealógico do Cavalo da Raça Lusitana. In <http://www.cavalo-lusitano.com>, acessado a 11.10.2013
- ✓ Baker G.J. & Easley J. (2000) *Equine Dentistry*. W.B. Saunders, Edinburgh, pp. 185 - 205
- ✓ Ball B.A., Little T.V., Weber J.A. & Woods G.L. (1989) *Survival of day-4 embryos from young, normal mares and old, subfertile mares after transfer to normal recipient mares*. J. Reprod. Feril., 85: 187-194
- ✓ Bertone A. (1999) *Update on infectious arthritis in horses*. Equine Vet. Educ, 11 (3): 143-152
- ✓ Betteridge K.J. (2011) *Embryo Morphology, Growth and Development* Equine Reproduction, Wiley-Blackwell, 2ª edição, USA, pp. 2167-2187
- ✓ Bruemmer J.E. (2006) *Collection and freezing of epididymal stallion sperm*. Vet Clin Equine 22: 677–682
- ✓ Caixeta E.S., Fagundes N.S., Caixeta M.S. & Pyles E.S.S. (2008) *Early equine embryonic development*. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias 103: 25-34
- ✓ Caldwell L.A. (2006) *Canine Teeth in the Equine Patient - The Guide to Eruption, Extraction, Reduction and Other Things You Need to Know*. Proceedings of the AAEP, Indianapolis, USA, In: <http://www.ivis.org/proceedings/aaepfocus/2006/caldwell1.pdf>, acessado a 20.06.2014

- ✓ Canesin H. S., Scarpa J. O. S., Silva J. R., Scarpa, F. O., Maia, J. M. S. & Albuquerque F. T. (2010) *Utilização da deslorelina no controle do ciclo estral de éguas da raça Mangalarga Marchador*. Universidade Federal de Lavras, In: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/lavras/resumos/1757.pdf>, acessido a 11.11.2013
- ✓ Carleton C. L. (2011) *Early Embryonic Death e Embryo Transfer* in: *Equine Theriogenology - Blackwell's Five Minute Veterinary Consult*, Wiley-Blackwell, pp: 185-206
- ✓ Carmalt J.L. (2006) *Safety, Restraint and Oral Examination of the Horse*. Proceedings of the AAEP, USA, In: <http://www.ivis.org/proceedings/aaepfocus/2006/carmalt1.pdf>, em 28.06.2014
- ✓ Carnevale E.M. (2006) *Vitrification of equine embryos*. *Vet Clin Equine* 22: 831-841
- ✓ Coutinho Da Silva M.A. (2008) *When should a mare go for assisted reproduction?* *Theriogenology* 70, ScienceDirect: 441-444
- ✓ Cuervo-Arango J., Aguilar J. & Newcombe J.R. (2009) *Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound*. *Theriogenology* 71 (8): 1267-75
- ✓ Christensen B.W. (2011) *Estrogens*. *Equine Reproduction*, Wiley-BlackWell, 2ª edição, USA, pp. 1631-1637
- ✓ Daels P (2007) *Embryo transfer tips and tricks*. Scientific Proceedings Equine Programme - Keros Equine Insemination and Embryo Transfer Center, Belgium, In: http://www.voorjaarsdagen.org/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=21:scientific-proceedings-equine-2007&download=107:daels-embryo-transfer-tips-and-tricks&Itemid=1, acessido a 25.09.2013
- ✓ Decreto-lei nº 123/2013, Diário da República, 1ª série - nº 165, de 28 de Agosto, In: <http://dre.pt/pdf1sdip/2013/08/16500/0519805203.pdf>, acessido a 20.08.2014
- ✓ Dukti S. & White N. (2008) *Surgical Complications of colic surgery*. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*, 28: 515-534, USA
- ✓ Easley J. (2011) *Oral and Dental Examination*. Proceedings of the AAEP, USA, In: http://www.ivis.org/proceedings/aaepfocus/2011_dentistry/Easley1.pdf, acessido a 28.06.2014
- ✓ FEI (2005) *Equine Influenza Vaccination*. Federação Equestre Internacional In: <http://www.fei.org>, acessido em 8.09.2013
- ✓ French N.P., Smith J., Edwards G.B. & Proudman C.J. (2002) *Equine Surgical Colic: risk factors for postoperative complications*. *Equine Veterinary Journal* 34 (5): 444-449
- ✓ Galloway S.S. (2011) *How to Document a Dental Examination and Procedure Using a Dental Chart*. Proceedings of the AAEP, USA, In:

- http://www.ivis.org/proceedings/aaepfocus/2011_dentistry/Galloway1.pdf, acessado a 28.06.2014
- ✓ Gieche J.M. (2013) *Oral examination of equidae*. Proceedings of the AAEP, USA, In: <http://www.ivis.org/proceedings/aaepfocus/2013/Gieche.pdf>, acessado a 28.06.2017
 - ✓ Hafez B & Hafez E.S.E. (2004) *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition, Manole, Philadelphia
 - ✓ Hartman D.L. (2011) *Embryo Transfer*. Equine Reproduction, Wiley-BlackWell, 2ª edição, USA, pp. 2871-2880
 - ✓ Henneke D.R., Kreider J.L & Potter G.D. (1984) *Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares*. Theriogenology 21: 897-909
 - ✓ Hinrichs K. & Choi, Y. (2005) *Assisted Reproductive Techniques in the Horse in Clinical Techniques*. Equine Practice, Elsevier Saunders, pp. 210 – 218
 - ✓ Hopkins F. M. & Meadows D. G. (2003) *Embryo Transfer in Mares*. The University of Tennessee, In: <https://utextension.tennessee.edu/layouts/OSSSearchResults.aspx?k=Embryo%20Transfer%20in%20Mares&cs=This%20Site&u=https%3A%2F%2Futextension.tennessee.edu>, acessado a 24.10.2013
 - ✓ Kask K., Odensvik K. & Kindahl H. (1997) *Prostaglandin F2alpha release associated with an embryo transfer procedure in the mare*. Equine Veterinary Journal 29: 286 - 289
 - ✓ Klohnen, Andreas (2009) *New Perspectives in Postoperative Complications After Abdominal Surgery*. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 25: 341-350
 - ✓ Launois T., Heiles P.H., Desbrosse F., Perrin R., Rosignol F. & Scicluna C. (2006) *Sports Activity After Colic Surgery: Postoperative Outcome Of 100 Procedures*. Proceedings of the 9th Internacional Congress of World Equine Veterinary Association, Marrocos, In: <http://www.ivis.org/proceedings/weva/2006/83.pdf?LA=1>, acessado a 02.08.2014
 - ✓ Lescun T.B., (2011) *Orthopaedic infections; laboratory testing and response to therapy*. Equine vet. Educ., 23 (3): 127-129
 - ✓ Lira R.A., Peixoto G. C. & Silva A.R. (2009) *Transferência de Embrião em Equinos*. Acta Veterinaria Brasilica, 3 (4): 132-140;
 - ✓ Loomis P.R. (2011) *Processing semen for cooled transport*. Proceedings of the 17th Congress of the Italian Association of Equine Veterinarians, In: <http://www.ivis.org/proceedings/sive/2011/lectures/Loomis2.pdf>, acessado a 23.08.2014
 - ✓ Mair T (2011) *Dealing with Postoperative Complications in the Field (Incisional Infection, Hernia, Thrombophlebitis and Laminitis): The Importance of the*

- Veterinarian-Specialist-Client Communication Triad*. Proceedings of the AAEP, USA, In: http://www.ivis.org/proceedings/aaepfocus/2011_colic/Mair3.pdf, acessado a 02.08.2014
- ✓ McAuliffe S.B. & Slovis N.M. (2008) *Color Atlas of Diseases and Disorders of the Foal*. Saunders Elsevier, Inglaterra, pp. 50-51
 - ✓ McCue P.M. (2009) *History of embryo transfer*. Equine Reproduction Laboratory - Colorado State University, In: <http://csu-cvmb.colostate.edu/Documents/Learnmares11-ET-history-apr09.pdf>, acessado a 11.11.2013
 - ✓ McCur P.M., DeLuca C.A., Ferris R.A. & Wall J.J. (2009) *How to Evaluate Equine Embryos*, Proceedings of the 55th Annual Convention of the AAEP, In: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2009/z9100109000252.pdf>, acessado a 22.11.2014
 - ✓ McCue P.M., Ferris R.A., Lindholm A.R., & DeLuca C.A. (2010) *Embryo Recovery Procedures and Collection Success: Results of 492 Embryo-Flush Attempts*. Proceedings of the 56th Annual Convention of the AAEP, In: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2010/z9100110000318.pdf>, acessado a 27.08.2014
 - ✓ McCue P.M., Scoggin C.F. & Lindholm A.R.G. (2011) *Estros*. Equine Reproduction, Wiley-BlackWell, 2ª edição, USA, pp. 1716-1727
 - ✓ McDonnell S.M. (2011) *How to train a stallion to use a dummy mount*. Proceedings of the 57th Annual Convention of the AAEP, In: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2011/037.pdf>, acessado a 23.08.2014
 - ✓ McDowell K.J. & Sharp D.C. (2011) *Maternal Recognition of Pregnancy*. Equine Reproduction, Wiley-BlackWell, 2ª edição, USA, pp. 2200-2211
 - ✓ McKinnon A.O. (2011) *Origin and Outcome of Twin Pregnancies*. Equine Reproduction, Wiley-BlackWell, 2ª edição, USA, pp. 2350-2359
 - ✓ McKinnon A.O., Pycocock J.F. & Samper J.C. (2007) *Current Therapy in Equine Reproduction*. Saunders Elsevier, Missouri
 - ✓ McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. & Varner D.D. (2011) *Equine Reproduction*. Wiley-Blackwell, 2ª edição, USA
 - ✓ Meijer M.C., Van Weeren P.R. & Rijkenhuizen A.B.M. (2000) *Clinical Experiences of Treating Septic Arthritis in the Equine by Repeated Joint Lavage: a Series of 39 Cases*. J. Vet. Med. A 47: 351-365
 - ✓ Morel M. D. (2005) *Breeding Horses*. Blackwell Publishing, Oxford
 - ✓ Muir W.W. (2011) *Complications during anesthesia in horses*. Proceedings of the 17th Congress of the Italian Association of Equine Veterinarians, Montesilvano, Italia, In: <http://www.ivis.org/proceedings/sive/2011/lectures/Muir6.pdf>, acessado a 20.08.2014

- ✓ Murray & Shannon J. (2012) *How to Manage Penetrating Injuries of Synovial Structures in the Field*. Proceedings of the AAEP Annual Convention, Anaheim, USA, 58: 221-227, In: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2012/Murray1.pdf>, acedido a 10.08.2014
- ✓ Ousey J.C. (2011) *Endocrinology of pregnancy*. Equine Reproduction, Wiley-Blackwell, 2ª edição, USA, pp. 2222-2234
- ✓ Paradis M.R. (2006) *Equine Neonatal Medicine - A case-based approach*. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 31-38 e p.184-185
- ✓ Paradis M.R. (2012) *Feeding the orphan foal*. Proceedings of the 58th Annual Convention of the AAEP, In: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2012/Paradis2.pdf>, acedido a 20.08.2014
- ✓ Pashen R.L., Lascombes F.A. & Darrow M.D. (1993) *The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina*. Equine Veterinary Journal 25: 119–121
- ✓ Pycock J.F. (2012) *Stallion and semen evaluation*. Proceedings of the 51st British Equine Veterinary Association Congress, In: <http://www.ivis.org/proceedings/beva/2012/116.pdf>, acedido a 23.08.2014
- ✓ Ramsey I. (2009) *Small Animals Veterinary Formulary*. BSAVA, 6ª edição, Inglaterra, pp. 12
- ✓ Regulamento número 176/2010 da União Europeia (2010) In: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:052:0014:0027:EN:PDF>, acedido a 13.08.2014
- ✓ Rocha A. (2011) *Reprodução equina em equinos: Avanços e perspectivas no mercado nacional*. ICBAS e CECA/ICETA, Universidade do Porto, In: <http://www.omv.pt>, acedido em 11.11.2013
- ✓ Rocha Filho A.N., Pessoa M.A., Gioso M.M. & Alvarenga M.A. (2004) *Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone*. in Animal Reproduction, 1 (1): 91 – 95
- ✓ Samper JC (2009) *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Saunders Elsevier, 2ª edição, Missouri, pp. 33 a 39
- ✓ Schneider R.K., Bramlage L.R., Moore R.M., Mecklenburg L.M., Kohn C.W. & Gabel A.A. (1992) *A retrospective study of 192 horses affected with septic arthritis/tenosynovitis*. Equine vet. J., 24: 436- 442
- ✓ Schumacher J & Stashak TS. (2008) *Management of wounds of the distal extremities*. Equine Wound Management, Black-Wiley, pp. 375–462
- ✓ Sellon D.C. & Long M.T. (2007) *Equine Infectious Disease*. Saunders, USA, pp. 614
- ✓ Shepherd C. (2008) *How to collect a semen sample*. Proceedings of the 47th British Equine Veterinary Association Congress, In: <http://www.ivis.org/proceedings/beva/2008/21.pdf>, acedido em 23.08.2014

- ✓ Smith M. R. W. (2013) *Penetrating injuries of the foot*. Equine vet. Educ., 25 (8): 422-431
- ✓ Squires E.L., Carnevale E.M., Mccue P.M. & Bruemmer J.E. (2003) *Embryo technologies in the horse*. Theriogenology 59: 151 - 170
- ✓ Squires E.L. (2006) *Superovulation in mares*. Vet Clin Equine 22: 819–830
- ✓ Steel C.M., Hunt A.R., Adams P.L., Robertson I.D., Chicken C., Yovich J.V. & Stick J.A. (1999) *Factors associated with prognosis for survival and athletic use in foals with septic arthritis: 93 cases (1987-1994)*. J. Am. vet. med. Ass. 215: 973-977
- ✓ Stout T.A.E. (2006) *Equine embryo transfer: review of developing potential*. Veterinary Journal 38: 467-478
- ✓ Stout T.A.E. (2012) *How to decide when to breed the postpartum mare*. Proceedings of the 58th Annual Convention of the AAEP, In: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2012/Stout2.pdf>, acedido a 25.06.2014
- ✓ Stroud B (2011) *The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals*. International Embryo Transfer Society, 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report, In: http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2011.pdf, acedido a 15.11.2013
- ✓ Tennent-Brown BS. (2012) *Interpreting lactate levels in critically ill horses: diagnosis, treatment, and prognosis*. Compend Contin Educ Vet, 34: E1–E6
- ✓ Vandenberghe L.T.M., Govaere J., Nelis H., Hoogewijs M., Daels P. & Van Soom A (2012) *Embryo transfer in horses: essencial to modern breeding*. In: <http://vdt.ugent.be/sites/default/files/art81503.pdf>, acedido a 22.11.2014
- ✓ Vanderwall D.K. (2000) *Current Equine Embryo Transfer Techniques*. In: <http://www.woodfordequine.com/embryo%20transfer.pdf>, acedido a 14.11.2013
- ✓ Vanderwall D.K. (2008) *Early Embryonic Loss in the Mare*. Journal of Equine Veterinary Science, 28 (11): 691-702
- ✓ Vanderwall D.K. (2011) *Progesterone*. Equine Reproduction, Wiley-BlackWell, 2ª edição, USA, pp. 1637-1642
- ✓ Varner D.D. (2011) *Evaluating the stallion. What does a practitioner need to know?* Proceedings of the 12th International Congress of the world Equine Veterinary Association, In: <http://www.ivis.org/proceedings/weva/2011/58.pdf?LA=1>, acedido a 23.08.2014
- ✓ Wilderjans H. (2008) *Management of Infected joints and tendon sheaths in horses*. Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, Russia, In: <http://www.ivis.org/proceedings/weva/2008/mainsession4/9.pdf?LA=1>, acedido a 17.08.2014