

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Maneio Reprodutivo de Equinos, Aplicação de Técnicas de  
Reprodução Assistida e Descrição de um Caso de Placentite Atípica**

Maria Helena de Magalhães Guimarães

Orientador:

**Professor Doutor António Luís Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha**

Co-Orientador:

**Doutor Tiago Pessanha Guimarães**

Porto, 2017

## Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

### **Maneio Reprodutivo de Equinos, Aplicação de Técnicas de Reprodução Assistida e Descrição de um Caso de Placentite Atípica**

Maria Helena de Magalhães Guimarães

Orientador:

**Professor Doutor António Luís Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha**

Co-Orientador:

**Doutor Tiago Pessanha Guimarães**

Porto, 2017

## RESUMO

As atividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular são descritas neste relatório, entre as quais se inclui o manejo reprodutivo das éguas, colheita, avaliação e processamento de sémen e inseminação artificial.

Foram acompanhados diversos casos clínicos, descrevendo-se um caso de placentite, que pela relevância e impacto na fertilidade da égua e sobrevivência fetal e do neonato, bem como pelas características particulares do caso, se considerou de grande interesse clínico.

O crescente nível de interesse na utilização da inseminação artificial tem vindo a aumentar a pesquisa de técnicas de processamento de sémen equino. Uma dessas técnicas, centrifugação através de uma camada única de um colóide de sílica, permite selecionar subpopulações de espermatozoides com elevada motilidade, percentagem reduzida de anomalias e DNA intacto. No entanto, verificou-se que o protocolo usado tinha como desvantagem a obtenção de baixas taxas de recuperação, limitando o seu interesse comercial no caso de alguns garanhões em que essas taxas eram muito reduzidas. Deste modo, foi desenvolvido um trabalho laboratorial com o objetivo de verificar se, alterando o protocolo de tratamento de sémen com Androcoll®-E, seria possível aumentar as taxas de recuperação sem prejudicar a qualidade dos parâmetros analíticos do sémen.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, por me terem sempre apoiado ao longo deste percurso, especialmente quando tudo ficava mais cinzento.

Ao meu Irmão, por me fazer rir, e por estar comigo mesmo quando sou insuportável (que são mais vezes que as que deveriam!).

À Inês, Catarina, Luísa C., Carolina e Luísa T.! Sem vocês, a minha passagem pelo ICBAS não tinha sido a mesma coisa. Obrigada por terem estado lá, por me aturarem, por se rirem comigo, e por me ouvirem (ou fingirem bem) quando estou a “mandar vir com o mundo”.

Ao restante pessoal do ICBAS e do CICBAS, que de uma forma ou outra se juntaram ao meu percurso, e sem dúvida adicionaram mais cor a esta fase da minha vida.

Ao Professor António Rocha, por ter aceite ser meu orientador; pelas histórias, pela boa disposição, e por me ter dito para “acreditar em mim”. Ao Doutor Tiago Guimarães, pelo tempo que disponibilizou para me ensinar e pelo conhecimento que partilhou comigo, que me ajudará a ser uma melhor profissional. A ambos muito obrigada pela enorme ajuda na elaboração deste relatório!

À Professora Eugénia Nunes, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, muito obrigada pela disponibilidade e ajuda indispensável no tratamento estatístico dos dados da experiência laboratorial.

À Sónia, por me ter feito sentir tão à vontade, por ter infinita disponibilidade para me ajudar e ouvir, e pelas nossas conversas... Contigo foi mais fácil, e sem dúvida muito melhor!

Ao Paxá, meu Paxolita, que a cada dia revela ser um pouco mais perfeito, e o único que, nos dias piores, sabe como me pôr de bom humor e me faz esquecer, nem que seja momentaneamente, todos os problemas. Obrigada!

À Alice, Buissa, Cangocha, Castanha, Costelinha, Diana, Galiota, Gorongosa, Inhame, Josefina, Lolita, Mamparra, Niassa, Envelope, Imperador e Mui-Bom: acima de tudo tenho de vos agradecer a vocês, pelo que me ensinaram. Trabalharei todos os dias para poder retribuir da melhor forma!

## **ABREVIATURAS**

**300** – grupo centrifugado a 300g

**600** – grupo centrifugado a 600g

**bid** – duas vezes por dia

**bpm** – batimentos por minuto

**°C** – graus Celsius

**C** – grupo controlo

**CASA** – Computer-Assisted Sperm Analysis

**CL** – corpo lúteo

**cm** - centímetros

**CRAV** – Centro de Reprodução Animal de Vairão

**CTUP** – espessura combinada do útero e placenta

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

**EV** – via de administração endovenosa

**FH** – folículo hemorrágico

**G** – força centrífuga

**GIFT** - transferência intrafalopiana de gâmetas

**hCG** – gonadotrofina coriônica humana

**IA** – inseminação artificial

**ICSI** - injeção intracitoplasmática de espermatozoides

**IU** – intra-uterino

**L** - litros

**IM** – via de administração intramuscular

**mg** - miligramas

**min** – minutos

**mL** – mililitros

**mm** - milímetros

**MO** – microscopia ótica

**PFA** – percentagem de formas espermáticas anormais

**PO** – via de administração oral

**ROS** – espécies reativas de oxigénio

**sid** – uma vez por dia

**spz** – espermatozoides

**TE** - transferência embrionária

**UI** – unidades internacionais

**VA** – vagina artificial

**µg** – microgramas

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	I
<b>AGRADECIMENTOS</b>	II
<b>ABREVIATURAS</b>	III
<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>CASUÍSTICA E TRABALHO DESENVOLVIDO</b>	3
<b>CASO CLÍNICO</b>	8
<b>TRABALHO EXPERIMENTAL</b>	15
<b>COMENTÁRIOS FINAIS</b>	21
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	22
<b>ANEXOS</b>	
<b>ANEXO I: Casuística</b>	26
<b>ANEXO II: Ficha clínica (égua com placentite)</b>	27
<b>ANEXO III: Desenho da experiência</b>	31
<b>ANEXO IV: Protocolo da experiência</b>	32

## INTRODUÇÃO

O estágio curricular decorreu na sua totalidade nas instalações do Centro de Reprodução Animal de Vairão (CRAV), entre 01 de Fevereiro e 16 de Junho de 2017.

O CRAV, estabelecido em 2005, providencia a criadores e proprietários de animais um serviço de medicina reprodutiva e aplicação de biotecnologias reprodutivas, oferecendo, entre outros: inseminação com sémen fresco, refrigerado e congelado, biópsia, citologia e microbiologia uterinas, tratamento de patologias reprodutivas, diagnóstico de gestação, redução de gestações gemelares, recolha e transferência de embriões, avaliação da fertilidade potencial do garanhão, colheita e avaliação de sémen, processamento e acondicionamento de sémen refrigerado e conservação de sémen e embriões congelados.

A equipa de veterinários do CRAV trabalha tanto com animais no centro como faz clínica em regime ambulatorio. A maior parte da casuística é em cavalos Lusitanos, de dressage ou equitação de trabalho, em coudelarias ou centros hípicas. No caso de serem cavalos de saltos de obstáculos verifica-se tratar maioritariamente de criadores particulares, com o objetivo de criar e manter o poldro em casa.

A função do cavalo tem vindo a alterar-se: deixa de ser usado como animal de guerra ou no auxílio do trabalho agrícola e meio de transporte, e tem-se assistido ao surgimento do cavalo de lazer ou atleta (Aurich & Aurich 2006). A procura de determinado animal tem em conta a sua performance desportiva ou o fenótipo, e não a capacidade reprodutiva (Varner et al. 2010), como acontece, por exemplo, com os bovinos.

Deste modo, nos últimos anos, verificou-se um desenvolvimento considerável nas técnicas disponíveis no que toca à reprodução equina - uma vez que se lida regularmente com casos de má fertilidade - relativamente ao tratamento de sémen e de éguas suscetíveis a patologias reprodutivas pós-inseminação/cobrição.

O exame andrológico do garanhão e avaliação de sémen, bem como a avaliação ginecológica da égua, permitem avaliar a fertilidade potencial e possibilidade de obter um poldro vivo no final da gestação (Varner et al. 2013; Ricketts 2008)

O sucesso da reprodução assistida depende largamente da qualidade dos gâmetas (Morrell 2006). Para processamento e seleção de sémen equino foi desenvolvido um coloide de sílica (Androcoll®-E, específico para a espécie equina) que permite a seleção da melhor sub-população de espermatozoides, através de centrifugação, eliminando a população morta ou



imatura, morfológicamente anormal ou com danos no DNA; para além disto, também se separa os espermatozoides móveis do plasma seminal, que contém células, detritos celulares e espécies reativas de oxigénio (ROS), bem como microorganismos patogénicos. Desta forma, segundo Morrell (2006), aumenta-se a longevidade do sémen refrigerado, ficando este livre de bactérias e vírus, e também se evita a utilização de antibióticos nos diluidores comerciais, que pode ser prejudicial.

Assim, durante o estágio, foi efetuado um trabalho experimental, com o objetivo de comparar o protocolo original de tratamento de sémen equino com Androcoll® (Morrell 2006) com o desenvolvido no CRAV (Guimarães et al. 2014) e verificar se com o último seria possível aumentar a taxa de recolha de espermatozoides sem prejudicar a qualidade dos parâmetros analíticos do sémen.

## CASUÍSTICA E TRABALHO DESENVOLVIDO

A égua é poliéstrica sazonal, com atividade reprodutiva associada a dias longos (Aurich 2011). Em raças de cavalos menos domesticadas, os ciclos ovulatórios ocorrem entre Maio e Outubro (Aurich 2011). A data de nascimento oficial, no hemisfério norte, para todos os cavalos, é 1 de Janeiro (Aurich 2011, Atayde & Rocha 2011), pelo que há pressão entre os criadores para ter poldros nascidos o mais próximo possível desta data. Cerca de 30% das éguas têm ciclos ovulatórios durante o Inverno (Aurich 2011).

O ciclo éstrico tem uma duração média de 22 dias, com 5-7 dias de estro (Aurich 2011). Os fatores que influenciam a atividade reprodutiva incluem a raça (pôneis tendem a ter ciclos 2 dias mais longos), fotoperíodo (as éguas são estimuladas por dias longos e noites curtas), idade, estado reprodutivo (ciclo mais curto em éguas lactantes), condição corporal (éguas obesas tendem a ciclar todo o ano) e temperatura ambiental (Aurich 2011, Ferreira-Dias 2005).

Um dos objetivos do estágio foi efetuar o maneio reprodutivo das éguas residentes, através da deteção de cios e da realização de palpações e ecografias transretais (anexo I). A deteção de cios foi feita dia sim dia não (de preferência às segundas, quartas e sextas) por rufiação, que tem um efeito benéfico no comportamento sexual e cíclico das éguas no início da época reprodutiva (Ricketts 2008). É importante utilizar um garanhão com boa líbido, mas não agressivo ou “bruto” (Ricketts 2008). A típica égua em estro é submissa aos avanços do garanhão, tem as orelhas para a frente, afasta os membros posteriores, baixa a pélvis, levanta a cauda, urina e faz eversão do clítoris (“winking”) (McCue et al. 2011, Atayde & Rocha 2011); pelo contrário, uma égua em diestro é agressiva para o garanhão, voltando as orelhas para trás e tentando morder ou escoicear (Ricketts 2008, Aurich 2011).

Aos primeiros sinais de estro comportamental as éguas foram apresentadas para exame ginecológico, onde se avaliou a conformação do períneo e vulva, e se realizou vaginoscopia para observar o cérvix (cor, edema, estado de contração) e a vagina cranial (procurar sinais de inflamação e/ou presença de descargas uterinas) (Ricketts 2008). Foram também realizadas ecografias transretais para avaliação do crescimento folicular, alterações de forma, características da parede do folículo e edema uterino (McCue et al. 2011).

Considera-se que uma égua iniciou o período ovulatório quando se identifica a primeira ovulação, através da observação de um corpo lúteo. Folículos anovulatórios, no início da época de reprodução, são indicativos do estado de transição típico das éguas, e que podem induzir em erro, na medida em que estão presentes todos os sinais de estro (Sharp 2011). No entanto,

inseminações neste período não se traduzirão em prenhez, ou haverá morte embrionária precoce associada com a manutenção inadequada do corpo lúteo (Sharp 2011).

A ovulação pode ser prevista quando se observam determinadas características no folículo e útero, ecograficamente: edema uterino, folículos em forma de pera, com aumento da espessura e hiperecogenicidade da parede (Ricketts 2008).

## **INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

Diz a lenda que o cavalo foi o primeiro animal inseminado artificialmente com sucesso, em 1322 (Allen 2005).

A produção de diluidores e crioprotetores de melhor qualidade, aliada ao desenvolvimento de melhores técnicas de indução e sincronização da ovulação, entre outros fatores, levou a um aumento substancial da quantidade de sémen refrigerado e congelado transportado (Allen 2005).

A inseminação artificial (IA) faz parte de um conjunto de tecnologias de reprodução assistida, que incluem também: fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferência embrionária (TE), transferência intrafalopiana de gâmetas (GIFT) e criopreservação de espermatozoides, embriões e, ocasionalmente, oócitos (Morrell 2011).

As vantagens da IA incluem: prevenção da disseminação de patologias infecciosas, permite a reprodução de animais em diferentes localizações geográficas, ou após a morte do macho, e pode ser usada na conservação de espécies raras ou em vias de extinção (Morrell 2011), para além de evitar que éguas com poldros tenham de se deslocar, e permite a avaliação adequada da qualidade do ejaculado (Wilsher 2015). No entanto, esta técnica também acarreta desvantagens: alguns patógenos bacterianos são resistentes aos antibióticos dos diluidores, foi reportada uma diminuição da fertilidade em éguas associada com o aumento da IA e a ênfase no uso de um número limitado de indivíduos pode levar à perda de variabilidade genética (Morrell 2011).

Durante o estágio foram observadas 4 inseminações com sémen fresco, 6 com sémen refrigerado e 5 com sémen congelado, bem como foi realizada 1 inseminação com sémen fresco e outra com sémen refrigerado (anexo I).

Para inseminação com sémen fresco devem ser utilizadas doses com  $500 \times 10^6$  espermatozoides móveis, depositadas no corpo do útero 48-72h antes da ovulação (quando um folículo  $\geq 35$ mm está presente). Pode optar-se por administrar 1500 UI de hCG, de forma a induzir a ovulação. Se a égua não ovular em 48h deve repetir-se a inseminação (Wilsher 2015).

O protocolo de inseminação com sémen refrigerado é semelhante ao fresco, mas uma vez que a fertilidade do primeiro é inferior, a monitorização ultrassonográfica da égua e a indução da ovulação devem ser mais cuidadosas, e a inseminação deve ser efetuada 24h após a indução da ovulação (Wilsher 2015).

O sémen congelado implica monitorização ultrassonográfica diária, até se encontrar um ou mais folículos de diâmetro 35-40mm; segue-se a indução da ovulação com 1500 UI de hCG, via endovenosa, e seguimento ecográfico da égua de 6-6 horas até ocorrer a ovulação (Barbacini & Loomis 2007). É recomendado que a égua seja inseminada 12 horas antes ou 6 horas após a ovulação (Barbacini & Loomis 2007). Se houver possibilidade de inseminar com duas doses pode optar-se por inseminar 24h após a indução da ovulação com hCG, e repetir a inseminação 16h depois, ou seja, inseminar 24h e 40h após indução da ovulação (Wisher 2015).

Doze a vinte e quatro horas após a inseminação deve ser realizada ecografia transretal de modo a verificar a existência de fluído intra-uterino. Éguas que de forma persistente apresentam acumulação de líquido no útero são consideradas suscetíveis a desenvolver endometrite (Canisso et al. 2016). Esta patologia – endometrite pós IA – tem implicações negativas na fertilidade (LeBlanc & Causey 2009), e é caracterizada por uma resposta inflamatória prolongada (superior a 48h) do endométrio ao sémen, afetando 10-15% das éguas (Canisso et al. 2016). O tratamento é feito através de lavagens uterinas seguidas de administração de 10-25 UI EV ou IM de ocitocina ou 250 µg IM de cloprostenol, 4-8h após a inseminação (LeBlanc & Causey 2009).

## **EXAME DA FERTILIDADE POTENCIAL DO GARANHÃO**

O exame, também designado como exame andrológico, tem como objetivo determinar se um garanhão tem os requerimentos físicos e psíquicos necessários para poder ser considerado apto a ejacular sémen com espermatozoides viáveis, livre de patologias infecciosas, e com a capacidade de obter prenhez confirmadas (Crabtree 2010).

A genitália externa deve ser observada e palpada. O pénis deve ser limpo (geralmente este procedimento é realizado após o *teasing*, em que há exteriorização natural) e deve ser verificada a existência de feridas ou lesões inflamatórias e tumorais (Crabtree 2010). O escroto não deve ter sinais de trauma ou lesões, e os testículos devem ser de consistência relativamente firme (testículos brandos ou muito firmes indicam patologia degenerativa, neoplásica ou traumática), com um diâmetro superior a 8cm (Crabtree 2010). O epidídimo, ducto deferente e cordão espermático devem ser palpados e ecografados, juntamente com os testículos (Crabtree 2010).

Deve ser feita ecografia transretal para avaliar a ampola, vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais, cuja secreção produz o plasma seminal, caso se suspeite de algum problema (Crabtree 2010).

## **RECOLHA, AVALIAÇÃO E PROCESSAMENTO DE SÉMEN**

Ao longo do estágio foram efetuadas 9 recolhas de sémen, 14 avaliações de sémen fresco, 5 de sémen refrigerado e 3 de sémen congelado (anexo I).

Para as recolhas foram utilizadas as vaginas artificiais (VA) Colorado e Missouri. A primeira tem a vantagem de ser aceite pela maioria dos garanhões e ser capaz de manter a temperatura interna, embora seja bastante pesada, o que a torna difícil de usar, especialmente no caso de garanhões pouco cooperantes (Allen 2005). A VA Missouri é fácil de usar, leve e bem aceite pelos garanhões; no entanto tende a perder a temperatura interna rapidamente (Allen 2005).

O protocolo de recolha de sémen deve ser otimizado para cada garanhão, com o objetivo de obter um ejaculado com baixo volume e elevada concentração (Aurich 2008). Isto é alcançado através de estimulação sexual mínima e colheita com uma única monta (Aurich 2008).

Após a recolha o sémen é filtrado para remover o gel do ejaculado (Brito 2007), e é avaliada a qualidade do sémen, mantendo sempre o ejaculado a uma temperatura de cerca de 37°C, de forma a evitar o choque térmico (Hodder & Liu 2011). O principal objetivo da avaliação do sémen é identificar garanhões (ou ejaculados) inférteis ou subférteis, ou seja, aqueles cuja fertilidade é, comparativamente a garanhões do mesmo tipo (raça, idade), inferior a 40% (Brito 2007)

A avaliação da motilidade, quer no sémen puro quer no diluído, é um teste fundamental para avaliar a capacidade de fertilização dos espermatozoides no ejaculado (Varner et al. 2013). Deve ser avaliada o mais depressa possível após a recolha, e pode ser aferida com recurso a microscopia ótica, feito subjetivamente por um operador, ou então através de programas informatizados, como é o caso do CASA (Computer Assisted Semen Analysis), que permite obter valores objetivos da motilidade, eliminando assim variações da estimativa da avaliação subjetiva (Hoder & Liu 2011).

A morfologia dos espermatozoides tem um grande impacto na fertilidade, e as diferentes anomalias agrupam-se em várias categorias: acrossoma, cabeça, cabeça solta, gotas proximais e distais, peças intermédias anormais e caudas dobradas ou enroladas (Brito 2007). O garanhão médio apresenta aproximadamente 50% de espermatozoides morfologicamente normais (Brito

2007); mais de 30% de defeitos da cabeça, >25% de gotas proximais ou <40% de espermatozoides normais são motivo para preocupação (Brito 2007).

Determinar a concentração de espermatozoides no ejaculado é essencial quando se quer preparar sémen para inseminação artificial (Baumber-Skaife 2011); para tal usam-se métodos de espectrofotometria (Spermacue), ou um hemocitómetro (Baumber-Skaife 2011).

Processar o sémen é essencial para a sua utilização em programas de inseminação artificial. Retira-se o plasma seminal, essencial para o aumento da qualidade do sémen refrigerado, e utilizam-se diluidores, cujo ingrediente base é leite ou gema de ovo (Aurich 2008). No CRAV, o diluidor utilizado é EquiPlus® (Minitube). Dilui-se o sémen para uma proporção mínima de 1 parte de sémen e 3 de diluidor, com o objetivo de se obter uma concentração final de  $50 \times 10^6$  spz/mL.

## CASO CLÍNICO – ÉGUA COM PLACENTITE

A placentite é uma causa importante de aborto e de patologia neonatal. A infecção bacteriana é mais frequente que a fúngica. Os agentes bacterianos mais comuns são *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Leptospira* sp. (Troedsson & Macpherson, 2011)

Existem quatro tipos de placentite, tendo em conta as lesões e patogénese: ascendente (mais comum, associada a estreptococos beta hemolíticos e coliformes), mucóide focal (nocardioforme), difusa (hematógena) e multifocal. (Canisso et al. 2015).

Os agentes infecciosos associados à placentite ascendente acedem ao útero através da vagina/cérvix, colonizando o polo caudal da corioalantóide (Canisso et al. 2015); a estrema cervical é a região geralmente mais afetada (Troedsson & Macpherson 2011).

Os principais sinais clínicos são o desenvolvimento prematuro do úbere e o possível surgimento de descargas vulvares (Canisso et al. 2015).

O diagnóstico é baseado na ultrassonografia e nos sinais clínicos. Através de ecografia transretal são feitas três medições da espessura combinada do útero e placenta (CTUP), na porção ventral da placenta para evitar o edema fisiológico que se pode observar na porção dorsal no último mês de gestação (Troedsson & Macpherson 2011), sendo comparadas com os valores normais (Canisso et al. 2015). CTUP aumentada, associada a sinais clínicos e áreas de separação da placenta são sugestivos de placentite ascendente (Canisso et al. 2015).

As estratégias de tratamento desta patologia estão ainda pouco definidas, sendo que muitos dos protocolos são extrapolados de outras espécies (Troedsson & Macpherson 2011). O objetivo é combater a infecção, reduzir a inflamação e controlar a atividade do miométrio (Troedsson & Macpherson 2011).

**Caso clínico:** Deu entrada nas instalações do CRAV uma égua Sela Francês no dia 03/02/2017, de 18 anos de idade, com 241 dias de gestação, tendo os proprietários referido que havia um corrimento sanguinolento na vulva, havendo encontrado também sangue vivo na cama. Também notaram que o volume abdominal tinha aumentado. O comportamento da égua continuava normal, comia e bebia normalmente.

**História progressa:** em meados de Janeiro de 2016 foi diagnosticada uma placentite. A égua manteve-se no seu domicílio e estabeleceu-se a terapêutica aconselhada (progestagénio e antibioterapia diária). O parto ocorreu aos 306 dias de gestação, parindo um poldro prematuro, mas viável (nenhum sinal de prematuridade e parâmetros vitais normais). A placenta apresentava alterações de cor, com três áreas castanhas (10 x10 cm) no corno grávido. Após o nascimento, o poldro foi considerado de risco e foi tratado com antibiótico de largo espectro (ceftiofur) durante 8 dias, exibindo uma condição normal (parâmetros vitais e atitude). Após o fim da antibioterapia o poldro começou a mostrar sinais clínicos de poliartrite (tumefação generalizada das articulações, febre e prostração), tendo falecido aos 15 dias pós-parto.

Três meses após o parto o aparelho reprodutivo a égua foi reavaliado ecograficamente, e não foi observada nenhuma alteração compatível com patologia uterina. A égua foi reintroduzida no programa de reprodução assistida, tendo ficado prenha após duas inseminações artificiais com sémen fresco.

**Descrição do caso:** Após a entrada da égua nas instalações do CRAV na data referida (03/02/2017) foi executada ultrassonografia transretal e transabdominal para determinar a espessura combinada do útero e placenta (CTUP) (figura I) e a viabilidade fetal (contagem de batimentos cardíacos). Foi também realizada vaginoscopia e o desenvolvimento do úbere foi monitorizado (anexo II).

- **Exame geral:** temperatura normal, sem alterações de atitude e comportamento
- **Desenvolvimento do úbere:** não tinha
- **Exame ginecológico:**
  - **Vaginoscopia:** o cérvix encontrava-se cerrado, sem qualquer sinal de saída de sangue ou qualquer outra secreção; foi observado, no entanto, varicocele de vasos da prega vaginal transversa.
    - **Diagnóstico:** Varicocele na parede vaginal
  - **Ultrassonografia aparelho reprodutivo:** a ecografia transretal revelou um espessamento patológico da placenta (Tabela I).
    - **Diagnóstico:** Placentite ascendente provável



**Tabela I: medições da espessura combinada do útero e da placenta (CTUP) em milímetros (mm)**

Data	CTUP (mm)
03/02/2017 (241 dias de gestação)	17 / 17 / 19
05/02/2017 (243 dias de gestação)	11 / 11,2
06/02/2017 (244 dias de gestação)	12,1 / 9,7
07/02/2017 (245 dias de gestação)	7
15/02/2017 (253 dias de gestação)	8 / 7
18/02/2017 (256 dias de gestação)	7,7 / 8,5

Medidas normais: < 7 mm dos 151-270 dias de gestação (Bucca 2011).



**Figura I.** Medição de espessura combinada do útero e da placenta da égua com 244 dias de gestação (imagem gentilmente cedida pelo Dr. Tiago Guimarães)

#### **Tratamento implementado:**

- Ceftiofur (Excenel® 50mg/mL) 10mL IM, sid, 5 dias consecutivos
- Pentoxifilina 4g PO, bid, 4 dias consecutivos
- Flunixin-Meglumina (Finadyne® 50mg/mL, MSD) 10mL EV, sid, 4 dias consecutivos

- Alternogest (Altresyn® 0,08mg/kg, Ceva) 10mL PO, sid, até aos 330 dias de gestação (interrompido aos 321 dias – parto)
- Trimetropim Sulfa (Trimeto-TAD Pó 48%, 30mg/kg, aniMedica) 45g PO, bid, até aos 330 dias de gestação (interrompido aos 321 dias – parto)

Aos 257 dias de gestação (19/02/2017) não foi possível detetar movimento do feto, mesmo após estimulação, e a ecografia transretal apresentou imagens compatíveis com vários diagnósticos: morte fetal com cordão umbilical anormal, intestinos do feto, hidrópsia, vasos linfáticos da placenta ou cordão umbilical extremamente dilatados (figura II).



**Figura II.** Imagens ecográficas obtidas entre os dias 257-260 de gestação, quando não se detetaram movimentos fetais. (imagens gentilmente cedidas pelo Professor António Rocha)

Após três dias sem qualquer movimento fetal (pelo menos quatro palpções e ecografias por dia), foi detetado novamente movimento fetal, e recomeçaram a surgir imagens ecográficas normais. O batimento cardíaco fetal variou entre 80-130bpm (os valores normais, entre os dias

241-270, estão no intervalo de  $99,65 \pm 6,82$  em repouso e  $130,29 \pm 13,66$  em atividade, segundo Bucca 2011), e não voltaram a aparecer imagens ecográficas anómalas.

A égua voltou para o domicílio aos 262 dias de gestação (24/02/2017), tendo sido vista regularmente, em regime ambulatorio, para monitorizar a CTUP e o desenvolvimento do úbere (tabela II). Foi acordado com os proprietários que posteriormente transfeririam a égua para um centro especializado em neonatologia, uma vez que o CRAV não possui esses serviços e se estava perante um parto considerado de risco. No entanto, decidiram voltar a levar a égua para o CRAV aos 302 dias de gestação (05/04/2017), onde se continuou o seguimento.

**Tabela II: Medições da espessura combinada do útero e da placenta (CTUP) em milímetros (mm)**

**espessura do útero e da placenta:**

<b>Data</b>	<b>CTUP obtida (mm)</b>
22/02/2017 (260 dias de gestação)	10 / 10 / 11
07/03/2017 (273 dias de gestação)	9,5 / 9,4 / 10,6
17/03/2017 (283 dias de gestação)	9,0 / 8,6 / 9,0
27/03/2017 (293 dias de gestação)	9,6 / 9,4 / 10,4
05/04/2017 (302 dias de gestação)	12,7 / 12,2 / 12,0
11/04/2017 (308 dias de gestação)	13,0 / 12,0 / 11,0
17/04/2017 (314 dias de gestação)	11,4 / 11,8 / 10,4
19/04/2017 (316 dias de gestação)	20,0 / 19,0 / 19,0

Medidas normais: 8mm dos 270-300 dias de gestação; 10mm dos 300-330 dias; 12mm a partir dos 330 dias (Troedsson & Macpherson 2011).

Aos 321 dias de gestação, por volta das 8:00 da manhã, e apesar de não ter havido interrupção da administração do progestagénio (e do antibiótico), a égua pariu um poldro vivo, considerado “pequeno” (não foi pesado), mas sem sinais de prematuridade/dismaturidade. O exame de estado geral encontrava-se normal (temperatura normal, reflexo de sucção presente, cordão umbilical de aspeto e palpação normais). O mecónio foi retirado manualmente (luva e gel lubrificante) e o umbigo desinfetado com  $\pm 5\%$  de solução iodada (iodopovidona 10%, Agadine®), e cerca de 2h após o nascimento verificou-se que este mamava o colostro e que era capaz de expulsar o mecónio. Pelas 14h observou-se o poldro a urinar. Iniciou-se de imediato o tratamento com ceftiofur (Excenel®, Zoetis) 2,5mL sid IM (aumentou-se a dose para 3mL aos 15 dias), e manteve-se a terapêutica durante 21 dias.

Três horas após o parto a placenta da égua não tinha sido libertada, iniciando-se então o protocolo terapêutico para resolução de retenção placentária. Administrou-se ocitocina (Placentol®, 20UI EV), que estimulou as contrações uterinas, mas a placenta continuou retida. De seguida optou-se por fazer lavagens uterinas com água morna e solução iodada, 8L em cada

lavagem (iodopovidona 10%, Agadine®), sem tração da placenta. Entre lavagens a égua era mantida em movimento a passo durante 5 min, após nova administração de 20UI de ocitocina. A placenta libertou-se depois de 4 lavagens, 11 horas após o parto. A placenta do corno grávido foi a última parte a ser libertada.



**Figura III.** Placenta após a sua libertação, onde se podem notar áreas de alteração de cor.

Após o nascimento interrompeu-se toda a terapêutica da égua (progesterona e o AB), tendo, no entanto, sido administrada flunixin-meglumina com o objetivo de evitar o aparecimento do complexo metrite-laminite-septicémia. O leite foi analisado 2 dias após o parto, apresentando valores de proteína, gordura e açúcar normais, respetivamente de 2,88%, 1,91% e 9,71%.

**Tabela III: Composição do leite da égua**

Semanas de lactação	Energia (kcal/100g)	Proteína (%)	Gordura (%)	Lactose (%)	Sólidos totais (%)
1-4	58	2,7	1,8	6,2	10,7
5-8	53	2,2	1,7	6,4	10,5
9-21	50	1,8	1,4	6,5	10,0

(McCue & Sitters 2011)

O poldro foi tratado diariamente com ceftiofur durante 21 dias, como anteriormente referido, após os quais se interrompeu o tratamento e monitorizou-se a temperatura duas vezes por dia. Sete dias após o fim do tratamento, não se tendo verificado nenhuma alteração dos sinais clínicos da égua ou do poldro, foi decidido que poderia sair das instalações do CRAV, sendo que os proprietários continuam a vigilância do estado de saúde de ambos.

A placentite foi um achado fortuito durante o exame da égua, uma vez que a queixa principal dos proprietários (sangramento na vulva e na cama) se deveu a varicocele dos vasos da prega vaginal transversa. O diagnóstico da infeção placentária permitiu iniciar imediatamente o tratamento, tendo sido controlada até ao parto. No entanto a égua fez retenção placentária,

demorando quase 12h até à sua libertação. O poldro, apesar de não ter sinais de infeção, foi considerado de risco, e o protocolo de tratamento foi também instaurado de imediato. O facto de se ter feito o diagnóstico antes do aparecimento de sinais clínicos pode ter contribuído para o aparente sucesso do tratamento, apesar da placentite ser uma patologia ainda pouco compreendida no que toca à patogénese (Canisso, 2015) e estratégias de tratamento (Macpherson 2005).

# TRABALHO EXPERIMENTAL

## RESUMO

Um dos problemas verificados na utilização do Androcoll-E® no Centro de Reprodução Animal de Vairão foi a obtenção de baixas taxas de recuperação de espermatozoides em alguns garanhões. O objetivo do trabalho foi verificar se uma modificação do protocolo original permitia obter maiores taxas de recuperação de espermatozoides sem diminuir a qualidade dos mesmos. Para tal calculou-se a taxa de recuperação de espermatozoides de ejaculados de três garanhões após centrifugação com Androcoll-E® utilizando 2 forças centrífugas: 300G (protocolo original) *versus* 600G (protocolo modificado). Comparou-se ainda a motilidade e morfologia, imediatamente após a recolha (fresco) e durante a refrigeração. Concluiu-se que a aplicação do Androcoll-E® (protocolo original e modificado) no sémen fresco melhora a quantidade de espermatozoides morfológicamente normais e que se obtém maior taxa de recuperação com o protocolo modificado (600G) sem que se tenham vistos efeitos deletérios na motilidade ou morfologia espermática.

## INTRODUÇÃO

Na Europa, a inseminação artificial com sémen refrigerado é o método de reprodução mais utilizado em equinos, sendo a égua inseminada 24-36h após a recolha e refrigeração do sémen (Lindahl et al. 2012). Enquanto que o sémen de alguns garanhões apresenta boa capacidade de refrigeração (Lindahl et al. 2012; Aurich 2008), um número significativo produz sémen de baixa qualidade, com alta sensibilidade à refrigeração (Costa et al. 2012), sendo estimado que 20% dos garanhões são bons refrigeradores, 60% refrigeram de forma aceitável e 20% são maus refrigeradores (Guimarães et al. 2015).

Deste modo, começaram a desenvolver-se várias técnicas para melhorar as características do sémen recolhido (Morrell 2006). Um dos métodos tem como objetivo selecionar a melhor subpopulação de espermatozoides, prolongando a durabilidade das doses de sémen e melhorando a fertilidade potencial de garanhões subfêrteis (Lindahl et al. 2012), para além de maximizar a resistência do sémen à refrigeração (Costa et al. 2012).

Foi, então, desenvolvido um método de centrifugação diferencial de sémen através de uma única camada de um colóide de sílica, específico para a espécie equina: Androcoll-E®. Este processo permite a seleção de uma subpopulação de espermatozoides móveis, morfológicamente normais e com DNA intacto (Johannisson et al. 2009, Morrell et al. 2009). Com este método, vários

estudos verificaram que apesar de haver uma deterioração progressiva do sémen ao longo do tempo, esta é menos notória com o tratamento, encontrando-se uma maior proporção de espermatozoides móveis e normais nas amostras tratadas (Costa et al. 2012; Morrell et al. 2011; Morrell et al. 2009).

No entanto, foram reportados casos em que o tratamento não foi eficaz em ganhões com problemas de fertilidade conhecidos. Num estudo (Gamboa et al. 2016) não houve diferença na qualidade do sémen e na fertilidade potencial dos animais, comparando ejaculados tratados e não tratados, tendo os autores concluído que os benefícios desta técnica de centrifugação poderão ser ganhão-dependentes.

A equipa do CRAV, ao utilizar o protocolo de tratamento do ejaculado com Androcoll-E®, verificou que as taxas de recuperação em alguns ganhões eram muito baixas, dificultando a utilização comercial desse sémen tratado (Rocha A, comunicação pessoal). Assim, executámos um estudo em que se comparam dois protocolos - original (Morrell 2006) e modificado (Guimarães et al. 2014) -, com o objetivo de verificar se é possível aumentar as taxas de recuperação através de um aumento da força centrífuga durante a centrifugação diferencial, e qual é o efeito, nos parâmetros seminais, do protocolo modificado, após o tratamento e durante a refrigeração.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Durante os meses de Março e Abril de 2017 foi recolhido sémen de três ganhões Puro Sangue Lusitano, com idades compreendidas entre os 8 e 27 anos (três ejaculados de um, dois ejaculados dos restantes). As colheitas foram efetuadas uma vez por semana, utilizando VA Missouri (6 recolhas) ou Colorado (1 recolha) com pressão ajustada para cada ganhão e temperatura a variar entre 45-50°C. A montagem das VA e as recolhas de sémen foram feitas por dois operadores, com recurso a manequim ou uma égua em cio.

Imediatamente após a recolha, o sémen foi filtrado (filtro descartável de celulose –Minitube) e avaliado para motilidade progressiva subjetiva e total objetiva, para morfologia e concentração. Durante a manipulação, e até à refrigeração, o sémen foi sempre mantido em placa térmica aquecida a 37°C.

A motilidade total objetiva foi aferida com recurso ao software CASA (ISAS®, Proiser R+D), após diluição (diluidor sem antibiótico EquiPlus – Minitube Ibérica) do sémen até obter uma concentração de  $100 \times 10^6$  spz/mL. A concentração do sémen fresco foi estimada utilizando um espectrofotómetro (Spermacue® - Minitube), e no caso de se obterem valores  $\leq 150 \times 10^6$  spz/mL optou-se por contagem direta de espermatozóides numa câmara de Neubauer (MTG Medical

Tecnology Vertriebs-GmbH). A morfologia foi avaliada sempre pelo mesmo operador, através de “Wet-mount” (gota de sémen não corada diluída em glutaraldeído a 0,2%) por microscopia de contraste de fase, com ampliação de 1000x e utilização de óleo de imersão. Avaliaram-se 100 espermatozoides para obter a percentagem de anomalias na amostra.

Imediatamente após avaliação dos parâmetros seminais, uma parte do sémen com o *extender* foi diluído a uma concentração de  $50 \times 10^6$  spz/mL (grupo controlo – C). O restante sémen diluído a  $100 \times 10^6$  spz/mL foi pipetado cuidadosamente (15mL) no topo de 15mL de Androcoll-E®, previamente colocados em dois tubos de centrifuga de 50mL (Falcon™, Fisher Scientific). Depois, um dos tubos foi centrifugado a 300G (grupo 300 – 300) e o outro a 600G (grupo 600 – 600). A centrifugação foi feita em simultâneo, ambas durante 20min e utilizando duas centrífugas da mesma marca e modelo (Sigma 2-16P, Sigma).

Após a centrifugação retirou-se a maioria do sobrenadante e homogeneizou-se o pellet de sémen num volume de aproximadamente 3 mL de plasma seminal, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros seminais: motilidade total objetiva (CASA), morfologia (“Wet-mount”, microscopia de contraste de fase, ampliação de 1000x) e concentração dos pellets homogeneizados (câmara de Neubauer). Esta concentração foi utilizada para se calcular a taxa de recuperação de espermatozoides para cada tratamento (300 vs. 600), através da seguinte fórmula:  $[(n^\circ \text{ total de espermatozoides recuperados} \div n^\circ \text{ total de espermatozoides centrifugados}) \times 100]$ . De seguida diluíram-se as amostras dos grupos 300 e 600 para uma concentração de  $50 \times 10^6$  spz/mL e refrigeraram-se num Equitainer®, juntamente com o grupo C. Às 24h, 48h e 72h após refrigeração o sémen foi avaliado para motilidade total (subjativa e objetiva) e morfologia (apenas às 48h, “Wet-mount”, ampliação de 1000x) (Anexo III).

Fez-se uma análise de variância para comparar o efeito dos tratamentos (C, 300 e 600) na motilidade, morfologia e taxa de recuperação de espermatozoides, considerando-se a interação tratamento\*ganhão e o efeito de réplica. Estabeleceu-se como diferença significativa o valor de  $p < 0,05$ . Para parâmetros em que a diferença foi significativa, utilizou-se o teste de Duncan para separação de médias. Os dados foram analisados utilizando o programa SAS (SAS Institute Inc.1989).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa no volume dos ejaculados entre ganhões ( $p < 0,05$ ) e uma interação significativa ( $p < 0,05$ ) ganhão\*réplica para este parâmetro (Tabela IV).



**Tabela IV. Média  $\pm$  desvio-padrão dos volumes (mL) do ejaculado fresco filtrado, por garanhão**

<b>GARANHÃO</b>	<b>Volume (mL)</b>
<b>Garanhão E</b>	33,5 <sup>b</sup> $\pm$ 3,5
<b>Garanhão M</b>	59,7 <sup>a,b</sup> $\pm$ 20,4
<b>Garanhão I</b>	62,5 <sup>a</sup> $\pm$ 9,2

Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Diferenças significativas no volume do ejaculado entre garanhões são expectáveis, embora o efeito significativo de réplica no volume do ejaculado do mesmo garanhão já não o seria, de acordo com Pickett et al. (1975). Tendo em conta que o espaçamento utilizado entre as colheitas de sémen não deveria influenciar as reservas espermáticas extragonadais, consideramos que o efeito de réplica no volume do ejaculado para o mesmo garanhão não está relacionado com sobreutilização dos garanhões, mas outros fatores de variação terão de ser considerados, nomeadamente variações no estímulo fornecido durante a colheita, variações na pressão e temperatura da vagina artificial, no modelo (Conboy, 2011) ou no operador. No entanto, o volume não é de grande importância no que diz respeito à fertilidade potencial do garanhão; apenas se pode referir que existe uma razão inversamente proporcional entre o volume do ejaculado e a concentração de espermatozoides: quanto maior o volume menor tende a ser a concentração (McKinnon et al. 2011).

A motilidade total do sémen fresco em todos os grupos não demonstrou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ; Tabela V). Contraditoriamente, diversos os estudos indicam que a motilidade dos espermatozoides melhora após os tratamentos aplicados (Costa et al. 2012, Johannisson et al. 2009, Macías García et al. 2009). Este resultado pode ser influenciado pelo facto da amostra experimental ser reduzida, bem como pela eficácia do Androcoll-E® ser garanhão-dependente, como é reportado por Gamboa et al. (2016).

**Tabela V. Média  $\pm$  desvio-padrão da motilidade total (% , CASA) do sémen não tratado e tratado com Androcoll-E® a 300g e a 600g, após colheita (fresco) e às 24h, 48h e 72h de refrigeração**

<b>Fresco e Horas de Refrigeração</b>	<b>Controlo</b>	<b>300</b>	<b>600</b>
<b>Fresco</b>	54,0 <sup>a</sup> $\pm$ 11,9	50,8 <sup>a,b</sup> $\pm$ 23,2	50,7 <sup>a,b</sup> $\pm$ 17,3
<b>24h</b>	32,8 <sup>c,d</sup> $\pm$ 11,1	28,8 <sup>c,d</sup> $\pm$ 16,8	36,4 <sup>b,c,d</sup> $\pm$ 7,8
<b>48h</b>	31,2 <sup>c,d</sup> $\pm$ 15,5	21,8 <sup>d</sup> $\pm$ 14,6	40,6 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 19,0
<b>72h</b>	26,7 <sup>c,d</sup> $\pm$ 11,6	21,2 <sup>d</sup> $\pm$ 12,6	31,2 <sup>c,d</sup> $\pm$ 13,2

Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Só houve diferenças significativas para motilidade total do sémen refrigerado ( $p < 0,05$ ) entre os grupos 300 e 600 às 48h de refrigeração. Contrariamente, vários autores indicam que o Androcoll-E® melhora a motilidade do sémen refrigerado (Costa et al. 2012, Johannisson et al.

2009). Estes resultados podem ser devido ao facto da amostra experimental ser reduzida, bem como pela eficácia do Androcoll-E® ser ganhão-dependente, como é reportado por Gamboa et al. (2016). A motilidade do grupo 600 é superior às 48h, comparativamente às 24h, o que é difícil de explicar. Assim, temos de considerar este resultado com reserva, pois não só foi uma amostragem reduzida, como podem ter existido erros influenciados pelo operador.

Tal como descrito na literatura (Stoll et al. 2013, Costa et al. 2012, Morrell & Rodriguez-Martinez 2009), observamos que no sémen fresco em ambos os grupos submetidos ao tratamento com Androcoll-E® (300 e 600) foram seleccionadas subpopulações de espermatozoides com menor percentagem de formas anormais (PFA;  $p < 0,05$ ; Tabela VI), quando comparados com o grupo C. No entanto, às 48h após refrigeração, não se encontraram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os três grupos, ao contrário do que foi previamente descrito (Hoogewijs et al. 2011, Costa et al. 2012). É possível que este efeito do Androcoll-E® não seja pronunciado em alguns ganhões, como sugerido por (Gamboa et al. 2016), o que limitaria a sua utilização como tratamento universal. De qualquer modo, a inexistência de diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para percentagem de formas espermáticas anormais entre os grupos 300 e 600 (Tabela VI) indica que o protocolo modificado (600) não teve qualquer diferença relativamente ao protocolo original (300), no que toca à morfologia espermática.

Está descrito que a refrigeração do sémen pode aumentar os danos na célula espermática, em particular no que diz respeito à membrana celular e acrossómica (Aurich 2008, McKinnon et al. 2011). Assim não seria de esperar uma diminuição da PFA em todos os grupos após 48h de refrigeração. Após observação dos dados das anomalias individuais constatamos que houve uma elevada percentagem de gotas citoplasmáticas proximais e distais, que numericamente diminuem ao longo do tempo. Assim podemos especular que a diminuição da PFA se deve à eliminação das gotas citoplasmáticas. Uma análise estatística do efeito do tempo de refrigeração nas anomalias individuais será feita no futuro para melhor entender quais as anomalias que tiveram uma diminuição significativa após 48h de refrigeração.

**Tabela VI. Média  $\pm$  desvio-padrão da percentagem de espermatozoides anormais (PFA) nas amostras controlo e tratadas com Androcoll-E® a 300g e 600g em ejaculados frescos e às 48h de refrigeração**

Fresco & Horas de Refrigeração	PFA Controlo (%)	PFA 300 (%)	PFA 600 (%)
Fresco	60,0 <sup>a</sup> $\pm$ 13,4	41,6 <sup>b</sup> $\pm$ 19,6	42,9 <sup>b</sup> $\pm$ 19,6
48h	41,0 <sup>b</sup> $\pm$ 10,2	36,5 <sup>b</sup> $\pm$ 20,1	39,6 <sup>b</sup> $\pm$ 16,9

Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

A taxa de recuperação de espermatozoides usando o protocolo modificado (600g), comparativamente ao protocolo original, foi superior ( $p < 0,05$ ; 55,1% $\pm$ 16,5 vs. 24,3% $\pm$ 9,6), como

seria expectável. O facto de se recuperarem mais espermatozoides quando aplicado o protocolo modificado, sem prejudicar a morfologia ou a motilidade, será benéfico na medida em que se poderão obter mais doses inseminantes para utilizar. No entanto, deve ser realçado que neste trabalho não se encontraram melhorias muito relevantes nos parâmetros seminais avaliados (sémen refrigerado) após qualquer um dos tratamentos, e a integridade do DNA, que pode ser afetada pela força centrífuga (Len et al. 2010, Hoogewijs et al. 2010, Gutiérrez-Cepeda et al. 2012), não foi avaliada.

## **CONCLUSÃO**

Neste trabalho confirma-se que as taxas de recuperação utilizando o protocolo do CRAV são superiores às obtidas pelo protocolo original, sem que os parâmetros seminais sejam, no geral, significativamente alterados. Isto é particularmente importante no que toca a ejaculados com poucos espermatozoides normais e móveis, na medida em que com o protocolo original pode não se conseguir obter doses inseminantes suficientes.

Não se verificaram melhorias na motilidade total, comparando o grupo C com os tratados (com a exceção do grupo 600 às 48h), mas apenas na morfologia e entre o sémen fresco e ambas as amostras tratadas. Melhorias na qualidade do sémen refrigerado seriam mais relevantes para utilização comercial. Dada a amostragem limitada e possíveis erros no processamento das amostras, estes resultados deveriam ser confirmados por estudos com maior número de observações, e dever-se-ia, em próximos trabalhos, incluir a análise do efeito dos tratamentos na integridade do DNA.

Em resumo, a aplicação do Androcoll-E® melhorou a percentagem de espermatozoides morfologicamente normais no sémen fresco e obteve-se maior taxa de recuperação com o protocolo modificado.

## COMENTÁRIOS FINAIS

O estágio curricular dividiu-se em dois grandes grupos: prática clínica e trabalho laboratorial.

Foi possível acompanhar o manejo reprodutivo de éguas e garanhões, que é parte essencial do sucesso de qualquer programa reprodutivo. Sem o exame clínico-genital da égua e do garanhão, e sem o seguimento ecográfico e deteção de cios, torna-se muito difícil conseguir prever com sucesso a altura da ovulação, ficam ciclos éstricos por detetar, e não se pode prever a fertilidade potencial do macho e da fêmea. Assim, a taxa de éguas vazias aumenta, ou ficam prenhas mais tarde, e conseqüentemente o parto é mais longe do início do ano, ficando estes poldros em desvantagem nutricional e competitiva em relação aos nascidos no início do ano, uma vez que a data oficial de nascimento é, para muitas associações de raças, o dia 1 de Janeiro. Estes factos acarretam custos adicionais aos proprietários. Assim, com o estágio, fui capaz de perceber a realidade da reprodução equina em Portugal, e os problemas e patologias mais comuns. Uma vez que me foi permitido fazer a maioria dos procedimentos da clínica, bem como laboratoriais, fui capaz de adquirir diversas competências, particularmente ao nível do saber fazer.

Por outro lado, o trabalho experimental permitiu conhecer mais de perto o mundo da investigação científica, e o rigor que lhe é inerente.

## BIBLIOGRAFIA

Allen WR (2005) "The Development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding"

Atayde LM, Rocha A (2011) "Selected Ovarian Ultrasonographic Characteristics During Vernal Transition are Useful to Estimate Time of First Ovulation of the Year" **Reproduction in Domestic Animals** 46, 240-246

Aurich C (2008) "Recent advances in cooled-semen technology" **Animal Reproduction Science** 107, 268-275

Aurich C (2011) "Reproductive cycle of horses" **Animal Reproduction Science** 124, 220-228

Aurich J, Aurich C (2006) "Developments in european horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction" **Reproduction in Domestic Animals** 41, 275-279

Barbacini S, Loomis P (2007) "Artificial Insemination (AI) using Cooled and Frozen Semen" **BEVA Equine Stud Medicine Course**

Baumber-Sakife (2011) "Evaluation of Semen" Em: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD **Equine Reproduction** 2nd edition, 1278-1291

Brito LFC (2007) "Evaluation of Stallion Sperm Morphology" **Clinical Techniques in Equine Practice** 249-264

Bucca S (2011) "Ultrasonographic Monitoring of the Fetus" Em: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD **Equine Reproduction** 2nd edition, 38-54

Canisso I (2015). "Update on placentitis in mares: diagnosis and treatment" Disponível em: <http://vetmed.illinois.edu/wp-content/uploads/2015/08/13.-Update-on-Equine-Placentitis-in-Mares.pdf>

Canisso I, Ball BA, Squires EL, Troedsson MHT (2015) "Comprehensive Review on Equine Placentitis" **AAEP Proceedings** vol. 61, 490-509

Canisso IF, Stewart J, Coutinho da Silva M (2016) "Managing Persistent Post-Breeding Endometritis" **Veterinary Clinics: Equine Practice** 32, 465-480

Conboy, HS (2011) "Management of Stallions in Artificial Insemination". Em: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD **Equine Reproduction** 2nd edition, 1198-1207

Costa AL, Martins-Bessa A, Rebello de Andrade A, Guimarães T, Rebordão MR, Gamboa S, Pinto Bravo P, Correia MJ, Colaço J, Gaivão I, Rocha A (2012) "Single Layer Centrifugation with Androcoll-E improved progressive motility and percentage of live spermatozoa with intact acrosome of chilled stallion semen but did not have an effect on DNA integrity" **Open Journal of Animal Sciences** Vol.2, No.3, 159-165

Crabtree J (2010) "Prebreeding examination of the stallion 1. Physical examination" **In Practice** volume 32, 22-28

Ferreira-Dias G, Claudino F, Carvalho H, Agrícola R, Alpoim-Moreira J, Robalo Silva J (2005) "Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status" **Domestic Animal Endocrinology** 29, 203-213

Gamboa S, Quaresma A, Castro F, Bravo P, Rebordão MR, Oom MM, Rocha A (2016) "In vivo fertilizing ability of stallion spermatozoa processed by single layer centrifugation with Androcoll-E™" **Saudi Journal of Biological Sciences** 1-8

Graham JK (2011) "Principles of Cooled Semen". Em: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD **Equine Reproduction** 2nd edition, 1308-1315

Guimarães T, Lopes G, Pinto M, Silva E, Miranda C, Correia M, Damásio L, Thompson G, Rocha A (2015) "Colloid centrifugation of fresh stallion semen prior to cryopreservation decreased microorganism load of frozen-thawed semen without affecting seminal kinetics" **Theriogenology** 83, 186-191

Gutiérrez-Cepeda L, Fernández A, Crespo F, Ramírez MA, Gosálvez J, Serres C (2012) "The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation Dynamics of thawed equine sperm DNA" **Acta Veterinaria Scandinavica** 1-8

Hodder ADJ, Liu IKM (2011) "Spermatozoal Motility" Em: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD **Equine Reproduction** 2nd edition, 1292-1296

Hoogewijs M, Morrell J, Van Soom A, Govaere J, Johannisson A, Piepers S, De Schauwer C, De Kruif A, De Vliegheer S (2011) "Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions" **Equine Veterinary Journal** 43, 35-41

Hoogewijs M, Rijsselaere T, De Vliegheer S, Vanhaesebrouck E, De Schauwer C, Govaere J, Thys M, Hoflack G, Van Soom A, de Kruif A (2010) "Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation" **Theriogenology** 74, 118-126

Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez (2009) "Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity" **Animal Reproduction Science** 116, 119-128

LeBlanc MM, Causey RC (2009) "Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility" **Reproduction in Domestic Animals** 44, 10-22

Len JA, Jenkins JA, Eilts BE, Paccamonti DL, Lyle SK, Hosgood G (2010) "Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine semen" **Theriogenology** 73, 225-231

Lindahl J, Dalin A, Stuhmann G, Morrell JM (2012) "Stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation are capable of fertilization after storage for up to 96h at 6°C prior to artificial insemination" **Acta Veterinaria Scandinavica** 54, 1-5

Macpherson M (2005) "Treatment strategies for mares with placentitis" **Theriogenology** 64, 528-534

Macías García B, Morrell JM, Ortega-Ferrusola C, González-Fernández L, Tapia JA, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ "Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen" **Animal Reproduction Science** 114, 193-202

McCue PM, Scoggin CF, Lindholm ARG (2011) "Estrus" Em: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD **Equine Reproduction** 2nd edition, 1716-1727

McCue PM, Sitters S (2011) "Lactation" Em: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD **Equine Reproduction** 2nd edition, 2277-2290

Morrell JM (2006) "Update on Semen Technologies for Animal Breeding" **Reproduction in Domestic Animals** 41,63-67

Morrell JM (2011) "Artificial Insemination: Current and Future Trends" **Artificial Insemination in Farm Animals** cap. 1, consultado em: <https://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-current-and-future-trends>

Morrell JM, Johannisson A, Strutz H, Dalin AM, Rodriguez-Martinez H (2009) "Colloidal Centrifugation of Stallion semen: changes in sperm motility, velocity and chromatin integrity during storage" **Journal of Equine Veterinary Science** vol.29, No.1, 24-32

Morrell JM, Macias Garcia B, Pena FJ, Johannisson A (2011) "Processing stored stallion semen doses by Single Layer Centrifugation" **Theriogenology** 76, 1424-1432

Morrell JM, Rodriguez-Martinez H (2009) "Biomimetic Techniques for Improving Sperm Quality in Animal Breeding: A Review" **The Open Andrology Journal** 1, 1-9

Pickett BW, Sullivan JJ, Seidel Jr. GE (1975) "Reproductive Physiology of the Stallion. V. Effect of Frequency of Ejaculation on Seminal Characteristics and Spermatozoal Output" **Journal of Animal Science** vol. 40, no. 5, 917-923

Ricketts S (2008) "Management of the broodmare" **Proceeding of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association** 212-215

SAS Institute Inc. (1989). **SAS/STAT User's Guide**, Version 6, 4th Edn, Vol 1. Cary, NC, USA

Sharp DC (2011) "Vernal Transition into the Breeding Season". Em: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD **Equine Reproduction** 2nd edition, 1704-1715

Squires EL (2011) "Reproductive Parameters from Light Horse Stallions". Em: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD **Equine Reproduction** 2nd edition, 1367-1376

Stoll A, Love CC, Ball BA (2013) "Use of a Single-Layer Density Centrifugation Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved-Thawed Equine Spermatozoa" **Journal of Equine Veterinary Science** 33, 547-551

Troedsson MHT, Macpherson ML (2011) "Placentitis" Em: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD **Equine Reproduction** 2nd edition, 2359-2367

Varner DD, Blanchard TL, Love CC, Brinsko, SP (2013) "Ancillary tests for stallions: which ones to use and what do they mean" **Clinical Theriogenology** volume 5, 343-358

Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Bliss SB, Carroll BS, Macpherson ML (2010) "Breeding-Management Strategies and Semen-Handling Techniques for Stallions – Case Scenarios" **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP** 215-226

Wilsher S (2015) "Insemination protocols for fresh, cooled and frozen semen". Notas gentilmente cedidas pela autora ao Professor Doutor António Rocha (apontamentos de Teriogenologia II 2015)



## ANEXOS

### ANEXO I: Casuística Efectuada ou Observada no CRAV e em vinte saídas de clínica ambulatória.

	Efetuated	Observado
Detecção de cio	179	162
Palpação retal/Ecografia	285	129
Montar vagina artificial	7	1
Recolha de sémen	9	34
Avaliação de sémen fresco	14	8
Avaliação de sémen refrigerado	5	1
Avaliação de sémen congelado	3	0
Refrigeração de sémen	6	6
Congelação de sémen	0	2
IA sémen fresco	1	4
IA sémen refrigerado	1	6
IA sémen congelado	0	5
Monta natural	NA	8
Recolha de amostra do pénis (microbiologia)	0	1
Recolha de amostra do clítoris (microbiologia)	0	4
Vaginoscopia	1	7
Biópsia uterina	7	5
Lavagem uterina	8	10
Citologia uterina	1	2
Avaliação de citologia uterina	3	NA
Infusão uterina	0	11
Flushing para recolha de embrião	0	1
BSE garanhão	0	8
Saída de Clínica ambulatória	20	NA

NA – não se aplica.

## ANEXO II: Ficha clínica (égua com placentite)

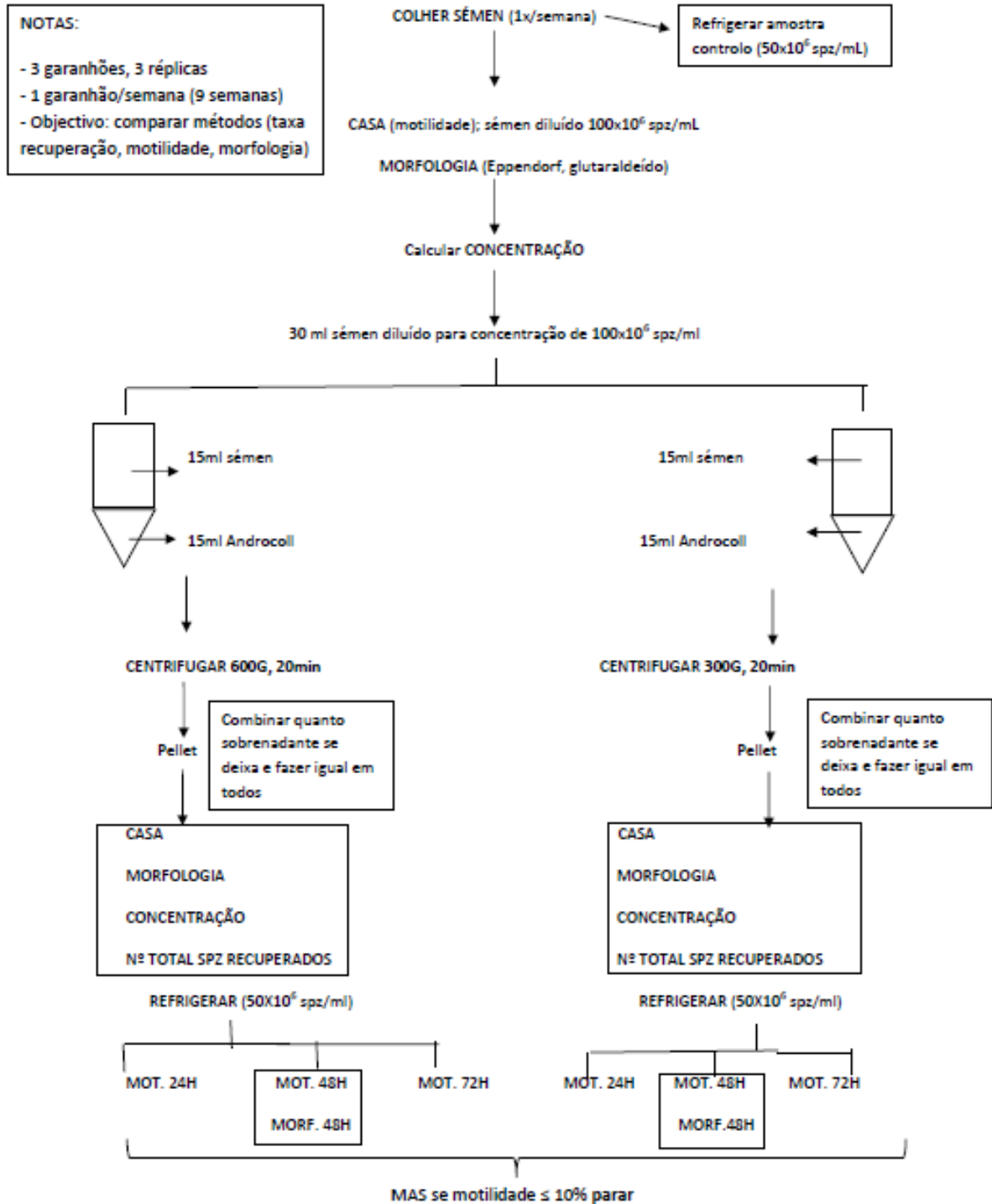
Data	Hora	Observações	Tratamento
03/02/2017 (241 dias de gestação)	15:30	Cérvix fechado Sem sinais de hemorragia Sem desenvolvimento de úbere CTUP: 17/17/19mm	Flunixina meglumina 10mL EV Meloxicam 20mL (80mg) Ceftiofur 10mL IM
04/02/2017	10:10	T 37,4°C Sangue na cama e na vulva	Ceftiofur 10mL IM Flunixina meglumina 10mL EV Altrenogest 10mL PO
	18:44	Sangue na cama Pequenos coágulos nas coxas	Altrenogest 10mL PO
05/02/2017	9:15	Sangue na cama e na comissura ventral da vulva Cérvix fechado Vasos vaginais congestionados mas sem sinal de hemorragia CTUP: 11/11,2	Ceftiofur 10mL IM Flunixina meglumina 10mL EV Atrenogest 10mL PO
	19:20	Sem sangue na cama mas com sangue nas paredes da vulva	
06/02/2017	10:14	CTUP: 12/9,7mm Sangue na cama, comissura ventral da vulva e coágulos nas coxas	Altrenogest 10mL PO Flunixina meglumina 10mL EV Ceftiofur 10mL IM
	16:00	Sem sangue na vulva Pequena abrasão na parte dorsal do clitoris	Altrenogest 10mL PO
07/02/2017	10:20	CTUP: 7mm Menos sangue na cama relativamente aos dias anteriores	Ceftiofur 20mL PO Altrenogest 20mL (10mL manhã+10mL tarde) PO Trimetropim sulfa 45g PO Pentoxifilina 5g PO
08/02/2017		Maior quantidade de sangue na cama Varicocele com hemorragia, pequenas zonas	Trimetropim sulfa 45g PO Altrenogest 10mL PO
11/02/2017	17:30	Sem sangue na cama	Pentoxifilina 5g PO Trimetropim sulfa 45g PO Altrenogest 10mL PO
12/02/2017	10:30	Sem sangue na cama	Trimetropim sulfa 45g PO

			Altrenogest 10mL PO
13/02/2017		Pouco sangue na cama	Trimetropim sulfa 45g PO Altrenogest 10mL PO
14/02/2017			Trimetropim sulfa 45g PO Altrenogest 10mL PO
15/02/2017		CTUP: 8/7mm	Trimetropim sulfa 45g PO Altrenogest 10mL PO
16/02/2017	10:00		Altrenogest 10mL PO
18/02/2017	10:25	CTUP: 7,7/8,5mm Olho: 28x31mm FC: 97,5bpm (?)	Trimetropim sulfa 40g PO Altrenogest 10mL PO
19/02/2017			Trimetropim sulfa 40g PO Altrenogest 10mL PO
20/02/2017			Trimetropim sulfa 40g PO Altrenogest 10mL PO
21/02/2017			Trimetropim sulfa 40g PO Altrenogest 10mL PO
22/02/2017	11:35	CTUP: 10/10/11mm	Trimetropim sulfa 40g PO Altrenogest 10mL PO
	16:30		Trimetropim sulfa 40g PO
23/02/2017	11:00		Altrenogest 10mL PO
	16:30		Trimetropim sulfa 40g PO
07/03/2017	16:05	CTUP: 9,5/9,4/10,6mm Já começou desenvolvimento do úbere	Trimetropim sulfa PO bid Altrenogest PO bid
17/03/2017	15:00	CTUP: 9/8,6/9mm Úbere igual à visita anterior	Trimetropim sulfa PO bid Altrenogest PO bid
27/03/2017	11:30	CTUP: 9,6/9,4/10,4mm	Trimetropim sulfa PO bid Altrenogest PO bid
05/04/2017	15:30	CTUP: 12,7/12,2/12,6mm Poldro vivo	Trimetropim sulfa PO bid Altrenogest PO bid
11/04/2017	11:20	CTUP: 13/12/11mm	Trimetropim sulfa PO bid Altrenogest PO bid
13/04/2017	10:00	Poldro vivo	Trimetropim sulfa PO bid Altrenogest PO bid
14/04/2017	10:05		Trimetropim sulfa PO bid Altrenogest PO bid Flunixin meglumina 10mL EV Cérvix 2 (1-3)
17/04/2017	10:10	CTUP: 11,4/11,8/10,4mm	

		Poldro mexe? Placenta a descolar?	
19/04/2017	14:16	CTUP: 20/19/19mm	
24/04/2017 (321 dias de gestação)	8:00	Pariu poldro vivo	
	10:15	Poldro mamou	
	12:00		Ceftiofur 2,5mL IM (poldro) Ocitocina 2mL IM (égua)
	14:00	Poldro urinou	
	14:00-19:00	4 lavagens uterinas (8L cada)	
	17:00	Corno grávido retido	Ocitocina 2mL IM
	19:00	Placenta saiu	
25/04/2017	11:00		Flunixin meglumina 10mL EV Ocitocina 2mL EV Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
26/04/2017	10:50	37,2°C Líquido no útero	Ocitocina 2mL EV Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
	16:30	37,1°C	
27/04/2017	11:50		Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
	14:30	37,1°C Líquido no útero	Ocitocina 2mL EV
28/04/2017	14:00		Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
29/04/2017	7:20		Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
30/04/2017			Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
01/05/2017	11:50		Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
02/05/2017	11:10		Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
03/05/2017	10:05		Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
04/05/2017	12:00		Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
05/05/2017	11:05		Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
06/05/2017			Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
08/05/2017			Ceftiofur 2,5mL IM (poldro)
09/05/2017			Ceftiofur 3mL IM (poldro)
10/05/2017	9:22		Ceftiofur 3mL IM (poldro)
11/05/2017	9:45		Ceftiofur 3mL IM (poldro)
12/05/2017	9:45		Ceftiofur 3mL IM (poldro)
13/05/2017	7:45		Ceftiofur 3mL IM (poldro)
14/05/2017	10:50		Ceftiofur 3mL IM (poldro)
15/05/2017	11:05	Tpoldro 37,9°C	

	15:30	Tpoldro 38,1°C	
16/05/2017	11:00	Tpoldro 38,3°C	
	16:40	Tpoldro 38,1°C	
17/05/2017	10:05	Tpoldro 37,8°C	
	16:53	Tpoldro 37,9°C	
18/05/2017	10:30	Tpoldro 38,0°C	
	18:15	Tpoldro 37,9°C	
19/05/2017	10:30	Tpoldro 38,0°C	

## ANEXO III: Desenho da experiência laboratorial



## ANEXO IV: Protocolo da experiência laboratorial

- Recolher sémen
- Filtrar o sémen
- Avaliar:
  - Motilidade progressiva subjetiva
  - Motilidade total objetiva (CASA) – após diluir o sémen para uma concentração de  $100 \times 10^6$  spz/mL
  - Concentração (Spermacue; câmara de Neubauer se a concentração obtida não estiver entre  $150-500 \times 10^6$  spz/mL)
  - Morfologia (“Wet-mount” glutaraldeído)
- Diluir uma amostra para uma concentração de  $50 \times 10^6$  spz/mL (controlo)
- Adicionar cuidadosamente 30mL de sémen diluído a  $100 \times 10^6$  spz/mL para dois tubos Falcon de 50mL (15mL em cada) com 15mL de Androcoll-E®
- Centrifugar um dos tubos a 600G durante 20 minutos e o outro a 300G durante 20 minutos
- Aspirar o sobrenadante
- Avaliar as duas amostras obtidas: motilidade subjetiva, motilidade objetiva (CASA), concentração (Spermacue ou câmara de Neubauer)
- Calcular taxa de recuperação de espermatozoides
- Diluir ambas as amostras para  $50 \times 10^6$  spz/mL e refrigerar, juntamente com a amostra controlo, em Equitainer
- Avaliar a motilidade subjetiva e objetiva às 24h, 48h e 72h após refrigeração. Caso se atinjam valores inferiores a 10% antes das 72h interromper
- Avaliar morfologia às 48h após refrigeração